

Școala doctorală în domeniul Științe medicale

Cu titlu de manuscris

C.Z.U: 611.018.4:616.718.5-089.843/.844(043.2)

STOIAN Alina

**PREPARAREA ALOGREFELOR OSOASE PE PEDICUL
VASCULAR – STUDIU EXPERIMENTAL**

321.18 ORTOPEDIE ȘI TRAUMATOLOGIE

Teză de doctor în științe medicale

Chișinău, 2024

Teza a fost elaborată în cadrul Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare și Catedra de ortopedie și traumatologie a USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova.

Conducător

Verega Grigore

dr. hab. șt. med., conferențiar universitar



semnătura

Conducător prin cotutelă

Nacu Viorel

dr. hab. șt. med., profesor universitar

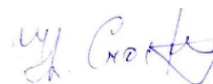


semnătura

Membrii comisiei de îndrumare:

Croitor Gheorghe

dr. hab. șt. med., conferențiar universitar



semnătura

Caproș Nicolae

dr. hab. șt. med., profesor universitar



semnătura

Cociug Adrian

dr. șt. med., asistent universitar



semnătura

Susținerea va avea loc la data de 06.11.2024, ora 14:00, în incinta USMF „Nicolae Testemițanu”, bd. Ștefan cel Mare și Sfânt, 165, biroul 205, în ședința Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat, aprobată prin decizia Consiliului Științific al Consorțiului din 26.06.2024 (proces verbal nr. 46).

Componenta Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat:

Președinte:

Topor Boris,

dr. hab. șt. med., profesor universitar



semnătura

Secretar:

Pulbere Oleg,

dr. șt. med., conferențiar universitar



semnătura

Membrii:

Verega Grigore,

dr. hab. șt. med., conferențiar universitar



semnătura

Nacu, Viorel,

dr. hab. șt. med., profesor universitar



semnătura

Referenți:

Caproș Nicolae,

dr. hab. șt. med., profesor universitar



semnătura

Buzu Dumitru,

dr. șt. med.



semnătura

Vereștiuc Liliana,

dr. ing. mater., profesor universitar



semnătura

Autor

Stoian Alina



semnătura

© Stoian Alina, 2024

CUPRINS

LISTA ABREVIERILOR	4
LISTA TABELELOR	5
LISTA FIGURILOR	6
INTRODUCERE	8
1. INGINERIA TISULARĂ ÎN OBȚINEREA ALOGREFELOR OSOASE DECELULARIZATE	16
1.1 Rolul ingineriei tisulare în regenerarea țesuturilor	16
1.2 Ingineria tisulară în obținerea matricelor extracelulare vasculare	17
1.3 Rolul ingineriei tisulare în dezvoltarea grefelor osoase	19
1.4 Decelularizarea în obținerea matricelor extracelulare osoase	23
1.5 Caracteristicile generale ale matricelor extracelulare osoase decelularizate	25
1.6 Biocompatibilitatea matricelor extracelulare osoase decelularizate	36
1.7 Imunogenitatea grefelor osoase de origine alogenă	37
2. MATERIALE ȘI METODELE DE CERCETARE	39
2.1 Prezentarea generală a studiului	39
2.2 Eseul chirurgical de prelevare a grefelor	39
2.3 Decelularizarea grefelor vasculare și a grefelor osoase avasculare	41
2.4 Decelularizarea grefelor osoase compozite vascularizate	44
2.5 Aprecierea eficacității decelularizării	46
2.6 Examinarea histologică calitativă (H&E, DAPI)	46
2.7 Cuantificarea ADN-ului	48
2.8 Microscopia prin scanare electronică	51
2.9 Testul de biocompatibilitate <i>in vitro</i>	51
3. REZULTATELE STUDIULUI	59
3.1 Rezultatele testului de permeabilitate vasculară pentru grefa osoasă vascularizată	59
3.2 Evaluarea calitativă a eficacității decelularizării pentru grefe cu divers grad de mineralizare	60
3.3 Evaluarea cantitativă a eficacității decelularizării pentru grefele osoase vascularizate	69
3.4 Caracterizarea țesutului osos decelularizat vs nativ utilizând SEM	74

3.5 Testului de biocompatibilitate <i>in vitro</i> pentru MEC vasculară, MEC osoasă avasculară și MECOv	75
4. DISCUȚII	84
CONCLUZII GENERALE	93
RECOMANDĂRI PRACTICE	94
BIBLIOGRAFIA	95
ANEXE	114
Anexa 1 Examinarea calitativă a grefelor vasculare native vs decelularizate (DAPI)	114
Anexa 2 Examinarea calitativă a grefelor osoase native vs decelularizate (SEM)	117
INFORMAȚIA PRIVIND VALORIFICAREA REZULTATELOR CERCETĂRII	119
DIPLOME ȘI DISTINCȚII	124
CURRICULUM VITAE	135
DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII	143

LISTA ABREVIERILOR

AO	Alotransplantul osos
ADN	Acidul dezoxiribonucleic
ARN	Acidul ribonucleic
BM – MSC	Bone marrow derived mesenchymal stem cell (celule mezenchimale stem derivate din măduva osoasă)
BMPs	Bone morphogenetic protein (proteinele macrofage osoase)
CHAPS	Surfactant zwitterioni
CO₂	Dioxid de carbon
DAPI	4', 6-diamidino-2-fenilindol
DNază	Deoxiribonucleaza
EDTA	Ethylenediamine tetraacetic acid (acid etilendiaminotetraacetic)
EGM-2	Endothelial growth medium (mediu endotelial de creștere)
EGTA	Ethylene glycol tetraacetic acid
FBS	Bovine fetal serum (ser bovin fetal)
FDA	Food and drug administration (administrația pentru alimente și medicamente)
GAG	Glicozaminoglicani
GFP	Green fluorescent protein (proteină fluorescentă verde)
H&E	Hematoxină și Eozină
HHP	High hydrostatic pressure (presiune hidrostatică înaltă)
HUVEC	Human umbilical vein endothelial cells (celule endoteliale venei ombilicale umane)
IT	Inginerie tisulară
MEC	Matrice extracelulară
MECOv	Matrice extracelulară osoasă vascularizată
NTIRE	Non thermal irreversible electroporation (electroporare ireversibilă non-termică)
PBS	Phosphate Buffered Saline (soluție tampon salină cu fosfat)
PDGF	Platelet Derived growth factor (factorul de creștere derivat din trombocite)
PPA	Acidul paracetic
RNază	Ribonucleaza
SD	Deoxicolat de sodiu
SDS	Dodecil sulfat de sodiu
SEM	Microcopia prin scanare electronică
SIS	Submucoasa intestinului subțire
TBP	Fosfatul tributilic
TRis buffer	Soluție tampon tris aminometan
VEGF	Vascular endothelial growth factor (factorul de creștere endotelial)

LISTA TABELELOR

Tabelul 1.	Metodele fizice de decelularizare	30
Tabelul 2.	Metodele chimice de decelularizare	32
Tabelul 3.	Metodele enzimaticice de decelularizare	35
Tabelul 4.	Protocolul pentru colorația histologică H&E	47
Tabelul 5.	Cuantificarea ADN-ului. Soluțiile, componentele și standardele utilizate	50
Tabelul 6.	Protocolul de izolare a celulelor stem mezenchimale din măduva osoasă	53
Tabelul 7.	Protocolul pentru colorația PKH26	54
Tabelul 8.	Protocolul pentru colorația Calcein AM	56
Tabelul 9.	Cuantificarea ADN-ului pentru grefa corticospongioasă avasculară	69
Tabelul 10.	Cuantificarea AND-ului pentru MECOv decelularizată după perfuzarea prin artera poplitee	70
Tabelul 11.	Cuantitatea ADN-ului în MECOv decelularizată după perfuzarea diafizară	71
Tabelul 12.	Cuantificarea AND-ului pentru MECOv decelularizată după perfuzarea prin artera poplitee cu o concentrație de 1% SDS	72
Tabelul 13.	Cuantificarea ADN-ului pentru MECOv decelularizată după perfuzare prin artera poplitee și utilizată ulterior la testul de biocompatibilitate	73

LISTA FIGURILOR

Figura 1.	Clasificarea grefelor vasculare după originea MEC	18
Figura 2.	Clasificarea grefelor osoase după originea MEC	22
Figura 3.	Disecția anatomică primară a membrului posterior la animal de laborator (porc).	40
Figura 4.	Disecția gambei. Model animal de laborator (porc)	40
Figura 5.	Grefa osoasă vascularizată. Disecția anatomică.	41
Figura 6.	Testul de perfuzie arterială cu albastru de metilen	41
Figura 7.	Decelularizarea grefei vasculare (artera carotidă)	42
Figura 8.	Procesarea enzimatică a grefei vasculare	43
Figura 9.	Grefa vasculară cu diametru mediu (artera femurală superficială) și mic (artera tibială caudală). Aspect macroscopic	43
Figura 10.	Grefa osoasă avasculară. Disecția anatomică.	44
Figura 11.	Grefa osoasă vascularizată. Aspect macroscopic.	44
Figura 12.	Sistema de perfuzie pentru decelularizarea grefelor osoase vascularizate	45
Figura 13.	Perfuzia soluțiilor de decelularizare pentru grefa osoasă vascularizată	45
Figura 14.	Procesarea enzimatică a MECOv	46
Figura 15.	ADN cuantificarea	49
Figura 16.	Curba standard pentru cuantificare ADN-ului	50
Figura 17.	MEC osoasă avasculară. Testul de biocompatibilitate	55
Figura 18.	Celule stem primare (BM MSC). Colorația PKH26	56
Figura 19.	Celule stem native din măduva osoasă	57
Figura 20.	BM MSC-PKH26. Examinarea microscopică	57
Figura 21.	MECOv. Aspect macroscopic	58
Figura 22.	Testul de biocompatibilitate. Precondiționarea MECOv	58
Figura 23.	Rezultatele testului de perfuzie arterială	59
Figura 24.	Grefa vasculară cu diametru mare (artera carotidă). Examinarea histologică calitativă.	60
Figura 25.	Grefa vasculară decelularizată (artera carotidă). Colorația H&E	61
Figura 26.	Grefa vasculară decelularizată (artera femurală superficială). Colorația H&E	62
Figura 27.	Grefa vasculară decelularizată (artera tibială caudală). Colorația H&E	63
Figura 28.	Grefa osoasă avasculară corticală. Colorația H&E	64
Figura 29.	Grefa osoasă avasculară spongioasă. Colorația H&E	65
Figura 30.	Grefa osoasă avasculară corticospongioasă. Colorația DAPI	66
Figura 31.	Periost. Colorația H&E	67
Figura 32.	Periost. Colorația DAPI	68
Figura 33.	Cuantificarea ADN-ului pentru grefa osoasă corticospongioasă nativă vs decelularizată	69
Figura 34.	Cuantificarea ADN-ului pentru MECOv decelularizată după perfuzare prin artera poplitee	70
Figura 35.	Cuantificarea ADN-ului pentru MECOv decelularizată după perfuzare diafizară	71
Figura 36.	Cuantificarea ADN-ului pentru MECOv decelularizată după perfuzare prin artera poplitee cu o concentrație de 1% detergent	72
Figura 37.	Cuantificarea ADN-ului pentru MECOv decelularizată după perfuzare prin artera poplitee și utilizată ulterior la testul de biocompatibilitate	73
Figura 38.	Recelularizarea MEC vasculare. Precondiționarea – 72 h	76
Figura 39.	Eșecul recelularizării MEC vasculare. Precondiționarea – 24 h	77
Figura 40.	Recelularizarea MEC osoase avasculare. Vizualizarea MB MSC-PKH26. Ziua 2 și ziua 4	78

Figura 41.	Recelularizarea MEC osoase avasculare. Vizualizarea MB MSC-PKH26. Ziua 6 și ziua 8	79
Figura 42.	Recelularizarea MECOv. Celulele MB MSC-PKH26 la ziua a 2-a	80
Figura 43.	Recelularizarea MECOv. Celulele MB MSC-PKH26 la ziua a 4-a	81
Figura 44.	Recelularizarea MECOv. Colorația PKH26 și Calcein. Celulele la ziua a 4-a	82
Figura 45.	Recelularizarea MECOv. Celulele de la nivelul pediculului vascular, ziua a 5-a de. Colorația PKH26 și Calcein	83

INTRODUCERE

Actualitatea și importanța problemei abordate

Defectele osoase de diferită origine (traumatică, tumorală, congenitală, etc.) inițiază la nivelul organismului uman mecanisme naturale de regenerare și, de cele mai multe ori aceste mecanisme sunt suficiente pentru recuperarea golului osos de dimensiuni mici [1].

Procesul de remodelare osoasă este calificat drept unul din cele mai complexe mecanisme. Celulele osoase (osteocitele, osteoclastele, osteoblastele și celulele de căptușeală osoasă) au o comunicare complexă între ele și orchestrează în mod perfect procesul de vindecare (consolidare) osoasă, adaptarea mecanică a scheletului și reglează homeostazia calciului [2]. Cu toate acestea, tratamentul defectelor osoase devine o adevărată provocare atunci când vorbim despre defectele osoase masive, în special cele după traumatisme grave, formațiuni tumorale masive, procese infecțioase localizate și agresive sau, defecte osoase congenitale. Pentru astfel de diagnostice, metodele tradiționale de tratament sunt la ordinea de zi, așa ca metoda Ilizarov, metoda membranei induse, substituenții osoși, alogrefa osoasă și, desigur, „standardul de aur” autogrefa osoasă [3, 4, 5, 6, 7]. Cu toate acestea, pentru defectele osoase ce depășesc lungimea de 4-5 cm, procedurile cunoscute de grefare osoasă pot fi insuficiente [8, 9].

Cererea crescută pentru intervențiile de recuperare a defectelor osoase de diferită etiologie, îmbunătățirea posibilităților tehnice și, desigur, dezvoltarea pe scară largă a ingineriei tisulare (IT) induce abordarea problemei date la un alt nivel [1, 10, 11].

Astfel, alotransplantul osos (AO) a ajuns una din cele mai ambițioase idei ale secolului XXI în domeniul chirurgiei reconstructive și IT. Utilizarea alogrefelor și xenogrefelor osoase preconizează să rezolve problema cantității limitate de autogrefe și să simplifice tratamentul din punct de vedere tehnic, prin excluderea etapei de prelevare a grefei [12].

Din analiza literaturii de specialitate, am identificat sute de cercetări bazate pe studii experimentale preclinice *in vitro* și *in vivo* care urmăresc descrierea metodelor de preparare, conservare, combinare și utilizare a alogrefelor osoase cu scopul eliminării necesității imunosupresiei în tratamentul postoperator. Principalul beneficiu al unei alogrefe este efectul său osteoconductiv, deoarece acționează ca o carcasă pentru celulele osoase și reprezintă un suport mecanic bun. Efectul osteoconductiv este mai accentuat la alogrefa spongioasă față de cea corticală și, depinde în mare parte de conținutul factorilor de creștere. Cu toate acestea, această proprietate de osteoconducție scade într-o alogrefă congelată și depinde atât de donator cât și de metoda de prelucrare a materialului osos. Teoretic, alogrefa proaspătă și neprocesată are cel mai mare potențial osteoinductiv. Printre dezavantajele alogrefei se numără riscul potențial de a transmite bacterii, virusuri, ciuperci, prioni și celule maligne către recipient. Printre alte riscuri relevante se numără reacțiile alergice și, desigur, răspunsul imun [13, 14].

Răspunsul imun rămâne a fi impedimentul de bază în utilizarea pe scară largă a alogrefelor osoase vascularizate neprocesate [15, 16]. Problema respingerii transplantului se încearcă a fi rezolvată prin utilizarea pe termen scurt a terapiei imunosupresive sau excluderea din componența alogrefei a tuturor elementelor ce ar provoca un răspuns imun (osul este demineralizat, decelularizat, deproteinizat) [17, 18]. Un studiu efectuat în 2010 (pe șobolani) de către un grup de medici din China arată că grefa osoasă vascularizată din cadrul alotransplantului compozit poate crea chimerism și toleranța organismului recipient, acest proces fiind condiționat de utilizarea preoperatorie a tratamentului imunosupresiv (iradiere corporală + administrarea globulinei antilimfocitare) [19].

Comparativ cu rezultatele studiilor din 1983, unde savanții descriu în mod clar că alogrefele osoase (din componența articulației genunchiului) sunt imunogene, iar utilizarea imunosupresiei și iradierii (postoperator) nu crește semnificativ perioada de supraviețuire a alogrefelor, studiile recente raportează supraviețuirea alogrefei (articulației genunchiului la iepuri) în condițiile inducerii angiogenezei împreună cu terapia imunosupresivă pe termen scurt [20, 21].

Grefele alogene sunt selectate, procesate și conservate în bănci de țesuturi umane, unde sunt supuse unui screening minuțios pentru a exclude transmiterea maladiilor infecțioase. În cele din urmă, alogrefele colectate de la pacienții vii (ex.: capul osului femural după înlăturarea acestuia) sau cei decedați, ajung să fie disponibile sub formă de grefe osoase corticale, spongioase sau matrice osoasă demineralizată în diverse forme și dimensiuni [13, 22]. Studiile clinice și experimentale axate pe evaluarea alogrefelor și autogrefelor osteocondrale mari, avasculare, efectuate de peste 30 de ani în urmă, demonstrează că alogrefele osoase provoacă un răspuns imun la nivelul organismului gazdă și în cele din urmă, acestea eșuează după transplantare din cauza revascularizării inadecvate și mineralizării incomplete [23].

Pe parcursul ultimilor ani, s-a făcut o claritate în ceea ce privește imunogenitatea țesutului osos, răspunsul ce-l poate provoca la nivelul organismului gazdă, și cum acesta poate fi controlat prin procesarea alogrefelor osoase. În literatura de specialitate găsim date despre metodele simple de prelucrare a țesutului osos alogenic, cum ar fi: înghețarea, formalinizarea, radio sterilizarea și liofilizarea. Sun cunoscute și descrise la fel și complicațiilor care survin după astfel de tratamente, complicații precum: lipsa integrării alogrefei, lipsa consolidării osoase, rejețul alogrefei, reabsorbția acesteia în lipsa apariției țesutului osos nou, fracturarea segmentului transplantat [24, 25, 26]. Probabil că din aceste considerente, cercetările din ultimii ani abordează provocarea transplantului osos din alt unghi de vedere. Țesutul osos este privit nu doar ca un material de umplere, ci mai mult ca un material capabil să ghideze umplerea golului osos, cu alte cuvinte, o carcasă (matrice) [27].

Materialul optim pentru grefa (carcasa) destinată stimulării regenerării normale a osului trebuie să posede mai multe caracteristici esențiale. Acestea includ biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, capacitatea de a conduce creșterea osului, capacitatea de a stimula formarea osului nou și, desigur, asigurarea unei rezistențe mecanice adecvate. Printre avantajele utilizării unei matrice extracelulare (MEC) naturale comparativ cu una sintetică se numără, în primul rând, similaritatea MEC natural cu țesutul osos în ceea ce privește morfologia și structura tridimensională. Această asemănare facilitează înlocuirea eficientă a țesutului osos deteriorat sau pierdut cu țesut osos sănătos [28, 29].

Țesutul osos conține relativ puține celule și o cantitate mare de MEC. Matricea la rândul său, reprezintă o rețea structurală foarte dinamică ce poate oferi suport și ancorare celulelor, reglează dinamica și comportamentul celulelor, asigură supraviețuirea, proliferarea, polaritatea, diferențierea, aderența, și migrarea celulară. Având o structură complexă, predominant colagen de tip I și proteine precum: osteocalcină, osteonectină, osteopontină, fibronectină, sialoproteina II osoasă, proteine morfogenetice osoase, factori de creștere, proteoglicani mici bogăți în leucină, inclusiv decorină, biglican, lumican, osteoadherina și proteine serice, MEC ajunge să fie implicată irevocabil în procesele de creștere și regenerare [2, 29, 30].

Factorii de semnalizare moleculară incluși în MEC stimulează activ diferențierea celulelor precursorare sau progenitoare în celule osoase funcționale. Aceste celule osoase, la rândul lor, reglează formarea și remodelarea celorlalte componente ale osului. Prin urmare, osul natural este recunoscut ca fiind osteoconductiv, osteoinductiv și osteogen, iar caracteristicile esențiale ce trebuie luate în considerare pentru MEC osoasă includ rugozitatea suprafeței externe, porozitatea + dimensiunea porilor, capacitatea de degradare, proprietățile mecanice, și biocompatibilitatea [31, 32].

Constrângerile severe de ordin imunologic ce apar în domeniul transplantologiei au dus la dezvoltarea largă a IT. Domeniul dat cuprinde multiple cunoștințe interdisciplinare și are ca unul din scopurile de bază crearea de țesut cu grad scăzut, sau chiar *nul* de imunogenitate pe bază de MEC [33, 34]. Ingineria tisulară în acest moment, are un impact uriaș asupra transplantului de organe, promițând obținerea și utilizarea pe scară largă a MEC de diferită origine, care vor oferi posibilitatea înlocuirii oricărui organ sau segment de organ deteriorat sau nefuncțional [11].

Începând cu 1948, de când a fost introdusă conceptul de decelularizare de către Poel, s-au efectuat numeroase studii privind aplicarea MEC decelularizate [35].

În 1995, echipa lui Badylak a utilizat MEC a submucoasei intestinale subțiri (SIS) pentru repararea tendonului lui Ahile. De atunci, diverse schele biologice derivate din țesuturi decelularizate, sau chiar organe întregi de origine diferită, au fost colectate în vederea utilizării lor ulterioare în cercetări atât *in vitro*, cât și *in vivo*.

Din acestea fac parte:

- pielea, corneea, vase sangvine (vene și artere), mușchi, fascie, tendon, omentul, os;
- rinichi, plămân, ficat;
- segmente întregi de extremități;
- valve cardiace, țesut cardiac, inimă;
- nerv, creier, etc. [29, 35, 36, 37, 38, 39, 40].

În prezent, utilizarea MEC decelularizate sunt în mare parte la etapele experimentale, cu toate acestea, există și unele progrese în aplicațiile clinice. Un exemplu de acest tip este aprobarea de către administrația pentru alimente și medicamente (FDA), în 1970, a unei grefe vasculare decelularizate, care a fost implantată la peste 500.000 de pacienți pentru a fi utilizată ca acces pentru hemodializă sau ca bypass la nivelul extremităților inferioare [41]. MEC dermică este utilizată în diverse domenii, cum ar fi chirurgie ortopedică, chirurgie reconstructivă, tratamentul arsurilor, chirurgie oro-maxilo-facială etc. Rapoartele timpurii despre MEC dermică sunt promițătoare, chiar dacă sunt necesare cercetări suplimentare pentru a determina pe deplin viitorul lor potențial [42]. Un alt progres important în IT este utilizarea valvelor cardiace reînsămânțate cu celule autologe, Serghei Cebotari et al. au raportat pentru prima dată, în Republica Moldova, implantarea de valve cardiace pulmonare repopulate cu celule progenitoare endoteliale autologe la doi pacienți pediatrici, prezentând rezultate bune după mai mult de 3 ani de la intervenție [43].

Scopul ingineriei țesutului osos este de a regenera/repara țesutul cu ajutorul unei grefe (naturale sau sintetice) biocompatibilă și biodegradabilă. Luând în considerare că osul este un țesut foarte bine vascularizat, iar toate etapele sale de regenerare (dezvoltarea, maturarea, remodelarea) depind de o reglare strictă a aportului de sânge, este foarte important elaborarea de strategii care să urmărească vascularizarea rapidă și eficientă a grefei implantate [14, 44].

În Republica Moldova, istoria transplantului osos începe în 1960 odată cu inițierea transplantului de segmente osoase tubulare și spongioase. Mai târziu, în 1962, conform recomandărilor profesorilor universitari Leonid Gladârevschi și Nicolae Testemițanu, a fost înființat în cadrul Stației Republicane de Transfuzie Sanguină, Laboratorul de Prelevare și Conservare a Țesuturilor. La 1 noiembrie 2011, pe baza Laboratorului de Prelevare și Conservare a Țesuturilor s-a înființat Banca de Țesuturi Umane în cadrul instituției publice medico-sanitare Spitalul Clinic de Traumatologie și Ortopedie, sub conducerea profesorului Viorel Nacu. Conform datelor naționale, țesutul musculoscheletal este cel mai transplantat țesut în Republica Moldova, iar necesitățile depășesc de 1,4 ori disponibilitatea de țesut. Chiar mai mult, conform unui sondaj efectuat pe 161 de medici specialiști, dintre care 75 ortopezi-traumatologi din 16 instituții medicale diferite, se determină o necesitate crescută a grefelor osoase prelucrate prin altă metodă decât cea de congelare [45, 46].

În prezent, publicațiile din domeniul IT osoase discută utilizarea grefelor osoase decelularizate din diverse perspective, inclusiv metodele de conservare, utilizarea factorilor de stimulare a consolidării și aplicarea diferitelor tehnici de osteosintează. Cu toate acestea, MEC osoase sunt inițial avasculare, iar hipoxia grefei implantate duce la sechestrarea acesteia. Lipsa sursei de vascularizare și întârzierea angiogenezei imediat după transplantare duc la resorbția sau necroza grefelor mari. Astfel, lipsa substituirii golului osos cu țesuturile recipientului sau complicarea septică, ridică multiple semne de întrebare referitoare la eficacitatea metodelor în tratamentul defectelor osoase mari. Inițierea acestui studiu experimental preclinic *in vitro*, reprezintă o tentativă de elaborare și testare a unui protocol universal de decelularizare, în vederea obținerii unei alogrefe osoase decelularizate vascularizate (MECOv), ce ar putea fi utilizată în reconstrucția defectelor osoase masive [4, 22, 47, 48, 49].

Scopul studiului

Elaborarea protocolului universal de decelularizare a țesuturilor cu divers grad de mineralizare în scopul obținerii grefelor osoase compozite vascularizate cu calități imunogene minime.

Obiectivele studiului

1. Elaborarea eselui chirurgical pentru obținerea grefei osoase vascularizate a osului tibial la animale de laborator;
2. Elaborarea protocolului de decelularizare a grefelor osoase (os tibial) cu păstrarea sursei de vascularizare;
3. Testarea eficacității metodei de decelularizare a grefelor osoase prin metode calitative (H&E, DAPI, SEM) și cantitative (cuantificarea ADN-ului);
4. Determinarea biocompatibilității matricelor extracelulare osoase vascularizate prin recelularizarea *in vitro* utilizând diferite tipuri de celule.

Ipoteza de cercetare

O MEC calitativă (cu o arhitectură păstrată și biocompatibilă) poate dirija proliferarea sănătoasă a celulelor stem și poate facilita dezvoltarea unui nou țesut, suplinind în așa fel chiar și defectele de dimensiuni mari. Necesitatea transportării în interiorul MEC osoase a nutrienților și elementelor cu potențial angiogenic stimulând astfel formarea rețelei vasculare funcționale și susținând viabilitatea ulterioară a MEC m-a adus în fața următoarelor ipoteze de cercetare:

1. păstrarea pediculului vascular va asigura pătrunderea sângelui recipientului în interiorul MEC osoase;
2. chiar și în condițiile obținerii unui pedicul vascular decelularizat trombogen, sângele ajuns în interiorul grefei în primele minute după anastomoză poate fi suficient pentru inițierea

procesului de angiogeneză în interiorul alogrefei osoase stimulând astfel regenerarea segmentului transplantat din interior spre exterior.

Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese

Inițierea studiului experimental în obținerea MECOv, are la bază două elemente majore, cererea crescută față de transplantul osos și dezvoltarea vertiginoasă din ultimii ani a domeniului de IT. Acest studiu experimental a fost efectuat pe probe biologice preluate de la animale de laborator (porci) și are la bază mostre de țesut moale și țesut dur (vase sanguine de origine porcină de trei diametre diferite, periost, grefe osoase avasculare, grefe osoase compozite vascularizate). Pentru aprecierea eficacității protocolului de decelularizare, s-a efectuat analiza histologică (colorația H&E și DAPI) și cuantificarea ADN-ului.

Aprecierea biocompatibilității a fost efectuată prin recelularizarea *in vitro* a MEC, cu utilizarea diferitor tipuri de celule: celulelor endoteliale umane venoase ombilicale (HUVEC) pentru grefele vasculare și celule mezenchimale stem de origine alogenă, din măduva osoasă (de origine porcină) pentru grefele osoase avasculare și cele vascularizate.

Pentru aprecierea schimbărilor microscopice ce au avut loc la nivelul componentei osoase a alogrefei, s-a efectuat microscopia prin scanare electronică (SEM) a mostrelor de os cortical și spongios. Analiza probelor histologice și culturilor celulare s-a efectuat utilizând microscopul optic, microscopul fluorescent și stereo microscopul.

Analiza statistică a datelor obținute și reprezentarea grafică a acestora a fost efectuată cu ajutorul programelor Excel și SPSS.

Inovația și originalitatea științifică a rezultatelor obținute

1. Am elaborat eseu chirurgical de obținere a unei alogrefe osoase de os tibial în complex cu sursa proprie vasculară pentru ulterioara decelularizare. În premieră acest model de greță a fost utilizat ca materie primă pentru obținerea de MEC;
2. Am elaborat și testat protocolul universal de decelularizare pentru obținerea MEC osoase compozite vascularizate;
3. Am analizat modificările microscopice (SEM) ce au loc la nivelul osului cortical și spongios după procesare;
4. Am obținut alogrefe/MECOv biocompatibile *in vitro*, ceea ce denotă funcționalitatea protocolului universal testat;
5. Am realizat recelularizarea *in vitro* a MEC decelularizate prin însămânțarea diferitor tipuri de celule (HUVEC pentru MEC vasculare și BM-MSc pentru MEC osoase).

Problemă științifică rezolvată

Studiul efectuat, prezintă un argument pozitiv la întrebarea dacă putem sau nu utiliza un protocol universal de decelularizare în vederea obținerii MEC osoase compozite vascularizate

(țesut dus + țesut moale). Astfel, putem considera rezultatele obținute, o puternică bază științifică în elaborarea ulterioară a planului de acțiune pentru proiectele de cercetarea în AO vascularizat pe baza studiilor *in vivo*, utilizând MECOV obținută prin IT.

Valoarea aplicativă a lucrării

Studiul dat reprezintă un pas important în susținerea viitoarelor studii preclinice *in vivo* pentru elaborarea unei noi metode chirurgicale în tratamentul defectelor osoase masive de diferită genă la nivelul aparatului locomotor, prin utilizarea alogrefelor osoase decelularizate vascularizate (MECOV).

Implementarea inovației în practică

Rezultatele obținute au fost utilizate în cadrul altui studiu experimental *in vivo* – „Plastia defectelor osoase vaste prin allogrefaj osos vascularizat decelularizat inclus în circuitul vascular adoptiv”. Astfel, preconizăm implementarea în cadrul Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare a USMF „Nicolae Testemițanu”, a unui nou protocol de decelularizare pentru grefele osoase compozite vascularizate.

Aprobarea rezultatelor științifice

Rezultatele studiului au fost prezentate la următoarele forumuri științifice:

1. MedEspera International Medical Congress for Students and Young Doctors, Chișinău, Moldova, 3-5 mai, 2018;
2. Conferința științifică anuală a cadrelor științifico-didactice, doctoranzi, masteranzilor, rezidenților și studenților, USMF „Nicolae Testemițanu”. Chișinău, Republica Moldova, 16-18 octombrie 2019;
3. 11th BAPRAS Congress, 12th National Congress of RSSH and 13th National Congress of RSRM, Cluj-Napoca, România, May 9-11, 2019;
4. MedEspera International Medical Congress for Students and Young Doctors, Chișinău, Moldova, 24-26 septembrie, 2020;
5. Conferința științifică anuală a cadrelor științifico-didactice, doctoranzi, masteranzilor, rezidenților și studenților, USMF „Nicolae Testemițanu”. Chișinău, Republica Moldova, 20-22 octombrie 2021;
6. International european conference on interdisciplinary scientific research. Warsaw, Poland, August 8-9, 2021;
7. 19th National Congress of the Romanian Association of Plastic Surgeons, 14th National Congress of the Romanian Society of Reconstructive Microsurgery, 13th National Congress of the Romanian Society for Surgery of the Hand., Timișoara, România, April 28-30, 2022;

8. Conferința științifică națională a ortopezilor și traumatologilor din Republica Moldova, ediția a XVIII-a “Leziunile locomotorului – principii minim invasive de tratament”, Chișinău, Republica Moldova, 25 iunie 2022;
9. National Scientific Conference with International Participation „Cells and tissues transplantation. Actualities and perspectives” dedicated to the 10 anniversary of the founding of the Human Tissue and Cells Bank and to the 15th anniversary of the founding of the Laboratory of Tissue Engineering and Cells Culture of „Nicolae Testemitanu” State University of Medicine and Pharmacy, Chișinău, Republic of Moldova, March 17-18th 2023;
10. 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering – ICNBME-2023. Chișinău, Republic of Moldova, September 20-23, 2023.

I. INGINERIA TISULARĂ ÎN OBTINEREA ALOGREFELOR OSOASE DECELULARIZATE

1.1 Rolul ingineriei tisulare în regenerarea țesuturilor

IT reprezintă o ramură promițătoare, cu o evoluție uimitoare în ultimii ani care are ca scop regenerarea țesuturilor [44, 50, 51, 52]. IT se bazează pe trei elemente esențiale: (i) diferite tipuri de celule, (ii) biomolecule și factori de creștere, (iii) matrici extracelulare. Scopul final al IT este crearea grefelor de țesut pentru utilizarea efectivă în terapia de înlocuire a organelor sau segmentelor nefuncționale, prin suplینire sau regenerare celulară [53, 54, 55, 56]. Fiind o ramură a medicinei regenerative, IT combină cunoștințele din diverse domenii științifice, inclusiv biochimia, chimia, biologia, fizica, biofizica și ingineria aplicativă [57]. Astfel, metodele utilizate în IT pot fi aplicate la toate organele și țesuturile din organismul uman [58]. Decelularizarea segmentelor de organe sau țesuturi asigură obținerea de matrici extracelulare tridimensionale care poate fi utilizată ulterior ca materie primă în reconstrucție [35, 59].

Studierea contextului de utilizare a MEC decelularizate, oferă o posibilitate unică și atractivă de mimare a complexelor întregi de organe și segmente cu omiterea reacției imune din partea organismului gazdă [35]. MEC joacă un rol esențial în reglarea morfologiei țesuturilor, influențând procese fundamentale precum aderența celulară, diferențierea celulelor și migrarea acestora. MEC furnizează suport structural și semnale biochimice care sunt cruciale pentru dezvoltarea și organizarea corectă a țesuturilor începând încă din perioada embrionară [60, 61]. IT poate oferi soluții pentru crearea organelor artificiale, menținere și îmbunătățirea funcției țesuturilor contribuind astfel la rezolvarea problemelor legate de lipsa donărilor voluntare și creșterea listelor de așteptare pentru transplantare [62]. În zilele noastre, asistăm la o discrepanță semnificativă între cererea și oferta de organe pentru transplant, iar obstacolele imunologice amplifică această problemă. Totuși, studii aprofundate și țintite, analize detaliate și implementarea tehnologiilor avansate în IT și sub-disciplinele sale oferă oportunități pentru o adevărată revoluție în domeniul transplantologiei [63]. În ultimele decenii s-au depus eforturi mari în direcția ingineriei structurilor de țesuturi funcționale și organe vascularizate. Dezvoltarea recentă a acestei ramuri a generat tot mai multe strategii de inginerie microstructurală care pot ajuta supraviețuirea celulelor și îmbunătățirea efectului terapeutic a grefelor obținute prin IT [64, 65].

Relația dintre IT și reconstrucția sistemului osteoarticular se face prin varietatea de materiale obținute prin IT și utilizate ca înlocuitori pentru grefele osoase autogene. Cu toate acestea, capacitatea regenerativă a acestora este încă limitată prin lacunele sale în revascularizare și reintegrare după transplantare, în mod special atunci când sunt utilizate în defectele osoase largi [8]. Astfel, obținerea unei alogrefe vascularizate neimunogene, ar putea deveni în viitor o alternativă mai mult decât utilă în tratamentul defectelor masive osoase [66].

1.2 Ingineria tisulară în obținerea matricelor extracelulare vasculare

Ingineria țesuturilor vascularizate implică dezvoltarea de structuri celulare tridimensionale care conțin vase de sânge funcționale. Această abordare are aplicații extinse în medicina regenerativă, inclusiv în tratamentul bolilor cardiace, vindecarea arsurilor, stimularea cicatrizării și regenerarea țesuturilor, inclusiv a țesutul osos [67, 68, 69]. IT este un domeniu în continuă dezvoltare, cu promisiuni semnificative pentru îmbunătățirea tratamentelor medicale și a recuperării pacienților [70, 71, 72]. Primele mențiuni despre vasele sanguine decelularizate (de origine animală) se întâlnesc în 1960, la aproximativ 10 ani de la primul transplant de organ efectuat cu succes [73, 74]. Primul vas obținut prin IT a fost gândit și proiectat la mijlocul anilor '80 de către Weinberg și Bell, care au utilizat celule endoteliale din aorta bovină, celule musculare netede și fibroblaști într-o matrice inelară din colagen și celule musculare netede [75]. Deși autorii au realizat atunci un vas cu proprietăți mecanice slabe, aceștia au pus baza protocolului ce este utilizat până și astăzi în IT pentru obținerea grefelor vasculare. Acesta are la bază trei elemente: celule multipotente, carcasa sintetică sau naturală extracelulară și factorii de creștere [76].

Paradigma clasică a IT este însămânțarea/înlocuirea celulelor într-o carcasă organ inductoare [73]. Studiile progresive din ultimii ani la acest capitol pot rezolva în viitorul apropiat problema utilizării la indicații constrânse a grefelor vasculare sintetice (utilizate în reconstrucția defectelor vasculare a vaselor cu un diametru $>8\text{mm}$) sau disponibilitatea limitată a autogrefelor vasculare [77, 78, 79]. Cauzele principale ale eșecului unei grefe vasculare obținute prin IT pot fi de natură trombogenă, aterosclerotică sau infecțioasă. Aceste probleme sunt adesea generate de calitatea scăzută a MEC, care influențează aderarea, multiplicarea și funcționarea celulelor. [74]. În mod ideal, o grevă vasculară obținută prin IT ar trebui să fie: disponibilă, rentabilă în obținere și ușor de manevrat. Pentru aceasta, trebuie să utilizăm o MEC vasculară non imunogenă, biocompatibilă, rezistentă la tromboze, stenoze, calcificări și infecții [52, 73, 80, 81, 82, 83, 84]. Studiile din ultimii ani au ca scop obținerea unei MEC vasculare cu perspectivă bună la utilizare *in vivo* [59, 76]. Regenerarea este un proces vascular dependent, iar angiogeneza este dependentă la rândul său de celulele endoteliale, care fiind așezate într-un singur strat căptușesc din interior vasele sanguine pe toată lungimea lor formând în așa fel intima vasului [85]. În cele din urmă, hiperplazia intimei reprezintă cauza cea mai des întâlnită în eșecul grefelor vasculare obținute prin IT, anume modificările la nivelul intimei favorizează apariția complicațiilor [86, 87]. Pentru a face posibilă supraviețuirea grefei, sunt utilizate o serie de terapii adjuvante pentru stimularea angiogenezei, cum ar fi: factorii de creștere (cel mai des utilizat fiind VEGF – factor de creștere endotelial vascular), terapia bazată pe celule (ex.: celulele stem), terapia acelulară (ex.: utilizarea exozomilor – veziculelor extracelulare), utilizarea rețelelor vasculare prefabricate, și alte strategiile chirurgicale, cum ar fi spre exemplu incorporarea buclelor arteriovenoase (ax vascular format

dintr-o venă și o arteră care sunt anastomozate la o buclă arteriovenoasă) a recipientului în alografa transplantată [88, 89, 90, 91].

Așa cum majoritatea cercetările actuale sunt orientate spre obținerea MEC vasculare funcționale în domeniul chirurgiei cardiovasculare, țin să accentuez că ideea studiului dat este obținerea grefei vasculare funcțională ca parte componentă a MECOv. Altfel spus, anume componenta osoasă reprezintă ținta studiului. Se mai cere specificat faptul că termenul de „grefe vasculare obținută prin IT” cuprinde în sine atât grefele obținute pe baza unei carcasi sintetice cât și cele pe baza carcasi biologice (figura 1). Astfel, zona de interes a studiului dat este strict limitată la grefele vasculare decelularizate, de aceea, la fiecare utilizare a termenului de „MEC vasculară” se va subînțelege o matrice naturală, de origine animală, care a fost obținută prin decelularizare.

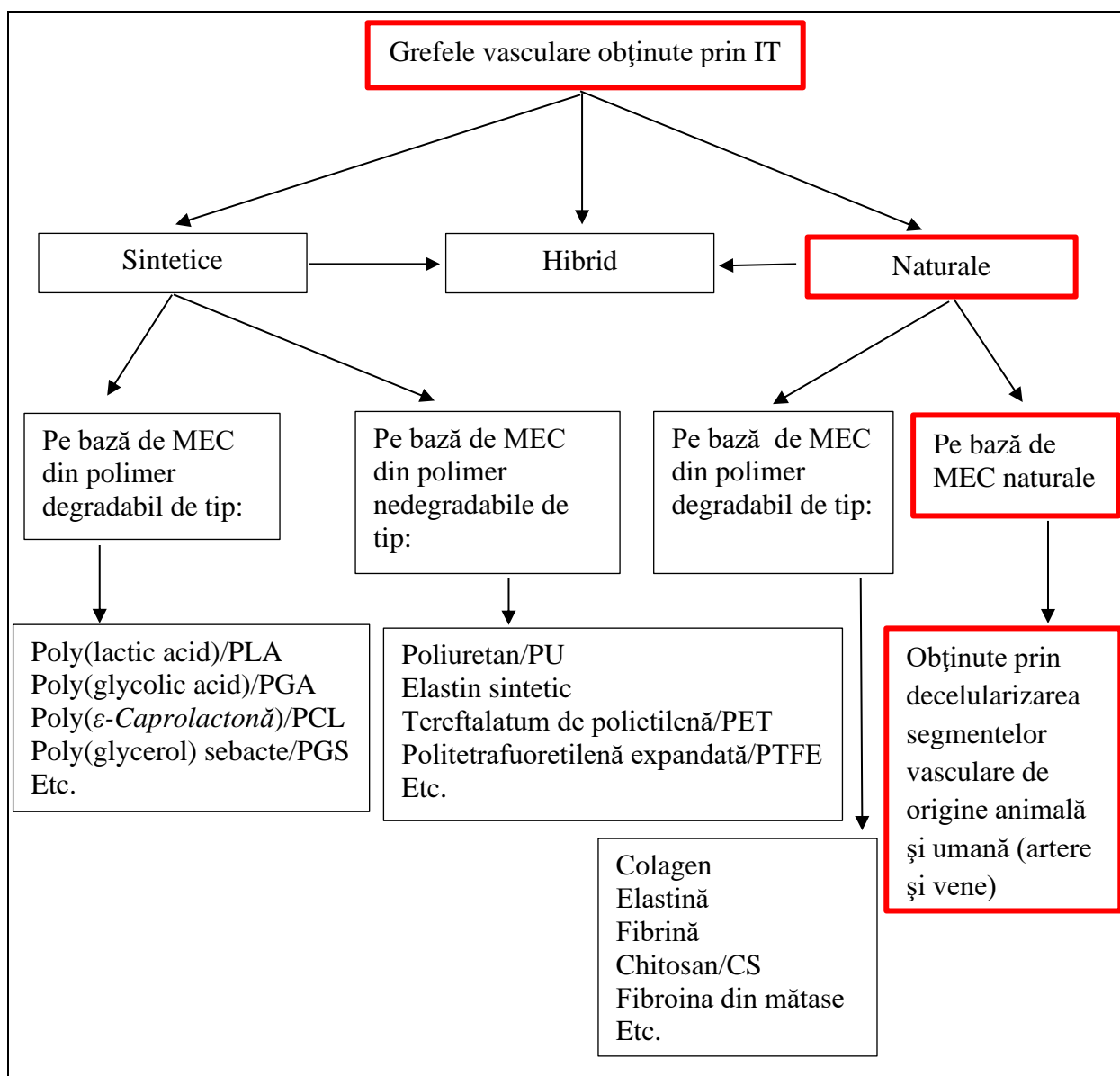


Figura 1. Clasificarea grefelor vasculare după originea MEC (zona roșie – zona de interes)

[73, 74, 76]

1.3 Rolul ingineriei tisulare în dezvoltarea grefelor osoase

Grefele de origine autogenă considerate standardul de aur în reconstrucția osoasă, au o aplicabilitate limitată în reconstrucția defectelor osoase mari, întrucât cantitatea de os ce poate fi colectată este uneori insuficientă pentru repararea acestor defecte, iar morbiditatea locului donator poate încălca în unele cazuri unul din principiile de bază a chirurgiei reconstructive (beneficiile metodei de tratament trebuie să prevaleze asupra prejudiciilor) [92, 93]. După unele surse, țesutul osos este cel mai frecvent transplatat țesut, după sânge. Grefele osoase reprezintă elementul de bază în marea parte a intervențiilor chirurgicale reconstructive pe os. Opțiunile curente, cele mai des utilizate în reconstrucția defectelor osoase sunt variate. Acestea includ utilizarea alogrefelor osoase avasculare (prelucrate termic sau prin autoclavare), utilizarea protezelor, metoda membranei induse sau metoda Ilizarov, fiecare cu avantajele și dezavantajele sale [94, 95].

Istoria alogrefelor osoase începe cu utilizarea acestora după diverse metode de prelucrare, precum prelucrarea termică, chimică sau liofilizarea. Aceste metode au fost dezvoltate pentru a conserva proprietățile grefelor osoase și a reduce riscul de transmitere a bolilor infecțioase, cum ar fi HIV și hepatita B sau C. Cu toate acestea, chiar și în urma acestor metode de prelucrare, rămâne un risc semnificativ de răspuns imun din partea organismului gazdă, deoarece țesutul osos asemenea altor tipuri de țesuturi precum mușchii, vasele sanguine, pielea și ligamentele, prezintă proprietăți imunogene [23, 94, 96, 97, 98]. Alogrefele proaspete sunt foarte rar utilizate, deoarece cresc semnificativ rata riscurilor enumerate mai sus [99]. Grefele congelate sunt similare cu grefele proaspete în ceea ce privește durabilitatea și osteoinductivitatea, dar prezintă un risc crescut legat de răspunsul imun și transmiterea infecțiilor. Pe de altă parte, grefele liofilizate au proprietăți mecanice reduse, însă sunt mai sigure în privința riscurilor asociate răspunsului imun și transmiterii infecțiilor [94, 99]. Astfel, indicațiile clare pentru utilizare alogrefelor osoase, după unele surse mai vechi, sunt: insuficiența grefelor autologe sau necesitatea unui suport structural imediat [94].

Ca o alternativă grefelor enumerate, cercetările din domeniul IT se concentrează intens asupra MEC osoase obținute artificial sau din surse naturale, cum ar fi osul alogen sau xenogen, osul deproteinizat sau decelularizat. Prelucrarea osului prin deproteinizare sau decelularizare urmărește îndepărtarea celulelor și proteinelor imunogene, păstrând în același timp structura și funcția MEC osoase. Aceste noi abordări pot oferi o durabilitate și osteoinductivitate comparabile cu cele ale grefelor proaspete dar cu un risc redus de răspuns imun și transmitere a infecțiilor. Aceste metode sunt utilizate în principal pentru prelucrarea grefelor osoase avasculare, contribuind la crearea unor grefe biocompatibile și eficiente pentru diverse aplicații clinice [1, 100, 101].

În final, procesul de regenerare osoasă poate fi descris ca un lanț complex de reacții post-transplantare, care sunt interdependente, dar și independente în același timp. Răspunsul imun poate

modifică durata procesului inflamator, prelungindu-l. În același timp, inflamația de lungă durată poate influența negativ procesul de revascularizare a grefei transplantate, iar lipsa unei vascularizări adecvate poate opri proliferarea celulară responsabilă de regenerare. Aici ar fi actual să mă opresc separat la fiecare etapă în parte. Respingerea transplantului începe cu recunoașterea antigenelor străine de către celulele imune ale recipientului, ceea ce duce la activarea limfocitelor T. Acestea din urmă reprezintă la rândul său un element de bază în procesul inflamator, iar inflamația la rândul său reprezintă prima etapă a procesului de incorporare a alogrefei [23,97].

Etapele încorporării grefei osoase:

1. Inflamația – are o durată de 14 zile și este mult mai accentuată în cazul alogrefelor;
2. Vascularizația – etapă în care are loc procesul de angiogeneză prin invadarea grefei de către vasele sanguine ale gazdei. Procesul este mai rapid la grefele spongioase comparativ cu cele corticale. Inflamația cronică este un factor care poate conduce la eșuarea formării noilor vase sanguine;
3. Osteoinducția – începe după finalizarea etapei inflamatorii și durează aproximativ până la ziua 21. Este perioada în care are loc diferențierea celulelor multipotente în osteoblaste;
4. Osteoconducția – se caracterizează prin invazia pasivă a țesuturilor recipientului în grefa transplantată (migrarea și proliferarea celulelor osteogene). Această etapă poate dura luni de zile în cazul grefei osoase spongioasă și până la ani de zile în grefele corticale;
5. Remodelarea – procesul continuu prin care osul nou format este adaptat și remodelat în funcție de stresul mecanic și alte condiții [94].

În 1998, progresele în transplantarea osoasă au început odată cu utilizarea alotransplantului vascularizat. Acest tip de transplant este considerat superior altor metode de tratament pentru recuperarea defectelor osoase mari, deoarece furnizează țesut cu o sursă vasculară adecvată, facilitând astfel revascularizarea imediată și o regenerare accelerată. Cu toate acestea, rejetul imun rămâne o problemă majoră, iar specialiștii din domeniu sunt în căutarea soluțiilor pentru a aborda această provocare. Anume această provocare subliniază conexiunile emergente între chirurgia reconstructivă și IT [96,102].

După unele date, grefele osoase alogene au o cotă de aproximativ o treime (1/3) din grefele osoase de pe piața Americii de Nord, iar procedurile de decelularizare sunt necesare pentru înlăturarea componentelor antigenice responsabile de reacția imună [103]. Grefa osoasă obținută prin IT se bazează pe aceleași principii, și utilizează o matrice acelulară, biocompatibilă. Aceasta reprezintă în prezent o alternativă la grefele autologe [101,104]. În calitate de carcasă 3D de cele mai multe ori se folosesc construcții de origine sintetică sau naturală, sau MEC obținute în urma

decelularizărilor segmentelor osoase [105]. Cele din urmă pot oferi indicii biologici pentru aderența și multiplicarea celulară, pe lângă suportul mecanic oferit și de către MEC sintetice.

MEC osoasă este cea mai reușită combinație între caracteristicile macro- și microscopice arhitecturale unice [106]. Carcasele 3D după cum s-a menționat anterior, joacă un rol important în controlul funcției celulare și formarea noului țesut. Acestea oferă pentru început sprijin celulelor, după care mediu natural adecvat pentru migrare, proliferare și diferențiere, iar în final, celulele ajung să producă propria MEC și o înlocuiesc pe cea transplantată [107]. Prin urmare, carcusele ar trebui să fie biocompatibile și biodegradabile [53, 105].

Utilizarea tehnicilor din IT în reconstrucția osoasă încep cu implantarea MEC, asigurând în așa mod un mediu adecvat celulelor pentru funcționalitate în condițiile unui răspuns *nul* [93, 105]. Cerințele specifice față de o carcasă osoasă (3D) ce urmează a fi transplantată (indiferent de originea acesteia) sunt:

1. osteoconductivitatea = capacitatea de a asigura aderența, supraviețuirea și proliferarea celulară;
2. osteogenitatea = capacitatea de formare a țesutului sănătos pentru vindecarea oaselor după leziuni sau fracturi;
3. osteoinductivitatea = capacitatea de a induce celulele pluripotente spre diferențiere în celule osoase [99, 108].

Problema de bază a MEC osoase obținute prin IT indiferent de originea lor, este vascularizația inadecvată. Această problemă reprezintă de fapt una dintre principalele limite ale țesuturilor obținute prin IT: incapacitatea de a furniza suficient sânge către țesutul transplantat pentru a menține sau restabili viabilitatea tisulară în primele faze după transplantare. Vascularizarea rapidă este esențială pentru restabilirea oxigenării care reprezintă un moment critic în metabolismul celular și inițierea angiogenezei [53, 109]. Reieșind din faptul că osteogeneza este un proces vascular dependent, asigurarea vascularizației adecvate imediat după transplantarea grefei este esențială, în special pentru grefele de dimensiuni mari [110, 111]. Revascularizarea MEC prin difuzie din patul vascular înconjurător, se realizează doar la primii max. 100-200 μm din stratul extern al grefei, iar regiunea internă a MEC fiind lipsită de vascularizație urmează să se sechestreze prin necroză sau să se reabsoarbă ducând în ambele cazuri la eșec [112, 113].

Așa cum în literatură de specialitate nu găsim definiție pentru grefele osoase mari sau mici, pot presupune că prin termenul de „grefe mari” se subînțelege grefele ce depășesc lățimea sau/și lungimea de 0.2 mm, adică grefele care pot recăpăta cu siguranță viabilitatea prin revascularizare. Altfel spus, în organismul uman, marea parte a celulelor, nu se află la o distanță mai mare de 100-200 μm de cel mai apropiat capilar, această distanță fiind suficientă pentru asigurarea unei difuzii de oxigen, nutrienți și reziduuri, menținând în așa mod viabilitatea țesuturilor. Recent, s-a

determinat și importanța funcționării adecvate a vaselor limfatice pentru creșterea noilor vase sanguine, astfel, importanța angiogenezei și limfangiogenezei în medicina regenerativă este indiscutabilă, la fel ca și dependența acestor procese de prezența factorilor de creștere, celulelor multipotente și factorilor de transcripție. În concluzie, o MEC osoasă funcțională din acest punct de vedere (angiogenic și limfangeogenic) poate fi obținută prin alimentarea matricei cu factori angiogenici, sau prin creșterea porozității grefei. Cu toate acestea, doar capilarele nu sunt suficiente pentru o perfuzie adecvată, de aceea, un flux satisfăcător de sânge către o grefă de dimensiuni mari poate fi posibilă doar prin intermediul vaselor sanguine mari [111, 114, 115].

La fel ca și în cazul grefelor vasculare, grefele osoase obținute prin IT sunt bazate pe carcasa de diferite origini (figura 2). În lucrarea dată, termenul de MEC osoasă se referă la matricea obținută în urma procesului de decelularizare a grefei osoase de origine animală.

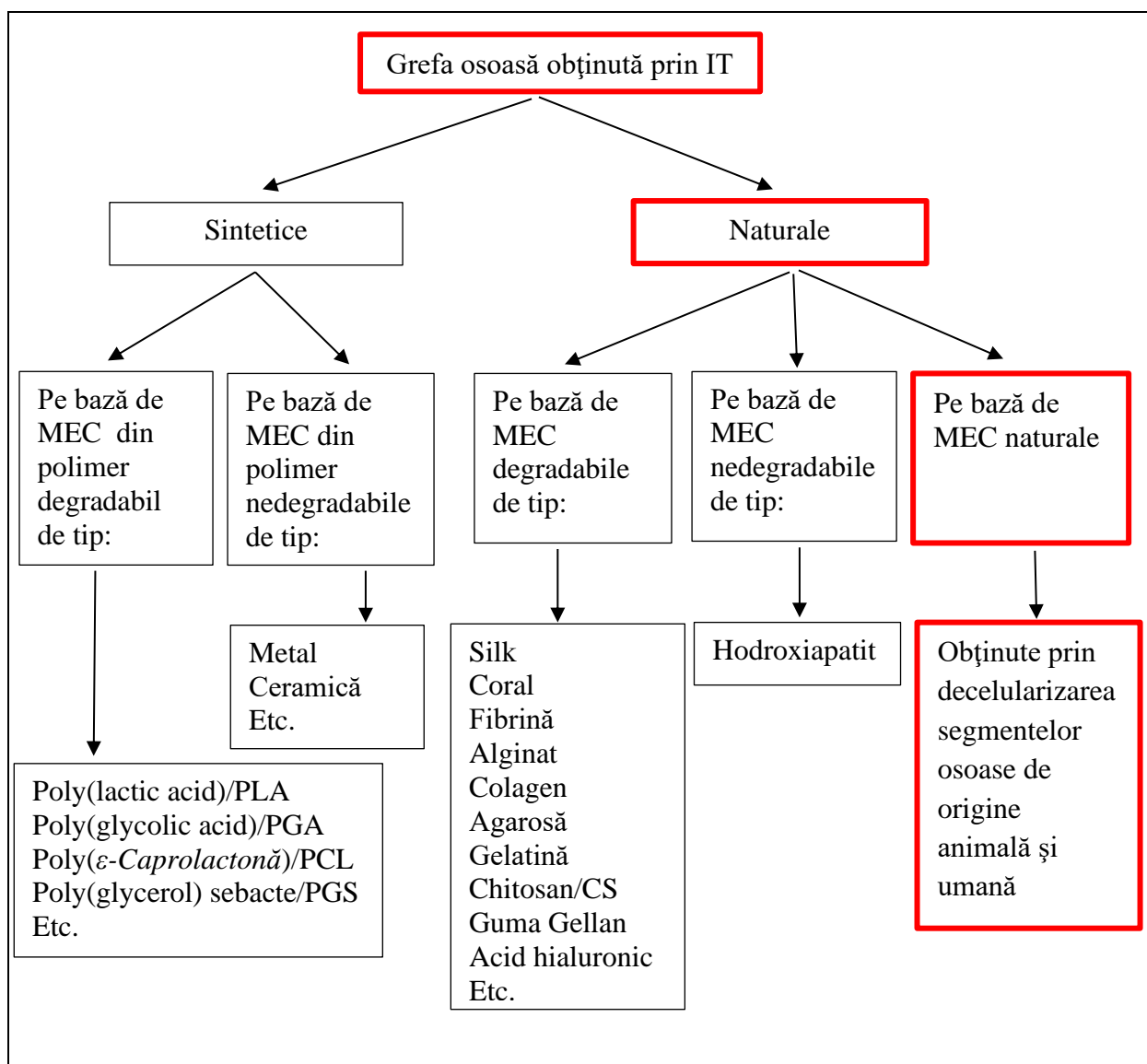


Figura 2. Clasificarea grefelor osoase după originea MEC (zona roșie – zona de interes)

[53, 91, 92, 93, 105, 108, 116]

1.4 Decelularizarea în obținerea matricelor extracelulare osoase

Subcapitolul de față cuprinde analiza metodelor și produselor pentru decelularizare în scopul obținerii unei carcase osoase pe pedicul vascular ce ar permite utilizarea ei ulterioară în contextul recuperării defectelor masive de os.

Țesutul osos posedă proprietăți de autoregenerarea, însă în situațiile când se pierd segmente circulare osoase (defecte osoase masive) autoregenerarea osoasă poate eșua [1, 11, 12, 117]. La moment, problema defectelor masive de os reprezintă unul din pilonii de bază în cauzarea handicapului funcțional [53]. Standardul de aur, care reprezintă în zilele noastre grefa autologă, nu-i nimic altceva decât o combinație perfectă dintre MEC mineralizată, măduvă osoasă și celule osteogenice, formând în așa mod cel mai osteogenic material disponibil, cu proprietăți osteoinductive și osteoconstructive. Totuși, cantitatea disponibilă de astfel de material biologic este limitată [92, 99, 103]. Per ansamblu, lipsa sau limitarea numerică de organe și segmente ce pot fi transplantate este cauzat de numărul mare de cerințe *vs* numărului de organelor/segmentelor disponibile, iar necesitate imunosupresiei constrânge și mai mult indicațiile de utilizare a acestora, accentul fiind pus pe organele cu importanță vitală (inimă, rinichi, plămâni, ficat) [53, 63]. Deși există multiple progrese în obținerea organelor artificiale (*in vitro*), la moment, funcționalitatea inadecvată a acestora le fac inacceptabile pentru transplantare [118, 119].

Începând cu 1998 când s-a realizat primul transplant de mână cu succes în Franța, în chirurgia reconstructivă începe să fie tot mai mult utilizat termenul de alotransplant compozit vascularizat [120]. Ca rezultat, o nouă generație de grefe au devenit disponibile pentru pacienți [96]. În contextul progreselor obținute începând cu acea perioadă în domeniul tehnicilor microchirurgicale și domeniul imunologiei, alotransplantul compozit vascularizat cunoaște un progres enorm. Deja în 2014, doar în SUA existau peste 17 centre academice specializate în alotransplantul de față și extremități [121]. Cu toate acestea, transplantul reconstructiv prin utilizarea alogrefelor compozite vascularizate, procesual, este asemănător cu transplantul de organe solide, cu excepția că respingerea unei grefe poate fi mult mai ușor de diagnosticat în toate cele 3 tipuri de rejet (hiperacut, acut sau cel cronic) [122]. Dezbateră etică și utilizarea terapiei imunosupresoare pe tot parcursul vieții, a umbrit succesul acestor tipuri de grefe. În cele din urmă, s-a născut o strânsă colaborare între laboratoarele de inginerie țesutulară și medicina regenerativă pentru a crea noi tehnologii și a găsi metode efective ce ar simplifica utilizarea grefelor vascularizate compozite în transplantologie și reconstrucție. Una din direcțiile de interes sporit în acest sens este utilizarea MEC a organelor și segmentelor de organe [96, 123, 124]. În ultimii 20 ani diverse țesuturi și organe ale donatorilor și animalelor de laborator, așa ca pielea, os, vase, nervi, tendon, rinichi, valve aortice, inima, plămân, sau chiar întregi membre superioare, au fost utilizate în scopul obținerii matricelor extracelulare pentru o ulterioară utilizare în cadrul ingineriei

biomedicale [110, 125]. Progresele tehnice de decelularizare din ultima perioadă oferă o alternativă promițătoare prin crearea MEC de organe/țesut. MEC cu păstrarea arhitecturii 3D și a rețelei vasculare ar putea permite ulterior schimbul de nutrienți și gaze în momentul transplantării, păstrându-și astfel viabilitatea și funcția în condițiile unui răspuns imun *null* din partea organismului gazdă [118, 126].

Decelularizarea în obținerea MEC este un proces cheie în ingineria țesuturilor. Procesul de decelularizare implică, în general, următorii pași:

1. colectarea țesutului: se colectează țesutul sau organul de la o sursă adecvată, cum ar fi animale sau, în unele cazuri, de la donatori umani;
2. prelucrarea: celulele sunt eliminate prin tratarea țesutului cu substanțe chimice sau enzime specifice. Aceste substanțe pot include detergenți, soluții saline, enzime proteolitice etc. Scopul este de a sparge membranele celulare și de a elimina conținutul celular lăsând în urmă MEC intactă;
3. spălarea și sterilizarea: după îndepărtarea celulelor, MEC rezultată este spălată pentru a îndepărta substanțele chimice sau enzimele utilizate în procesul de decelularizare. De asemenea, este important să se sterilizeze materialul pentru a preveni infecțiile.

În general, decelularizarea este o tehnică esențială pentru a obține MEC utilizabile în diverse aplicații medicale și biotehnologice, contribuind la avansarea cercetărilor în domeniul medicinei regenerative și al ingineriei țesuturilor. Decelularizarea, este mai întâi de toate importantă prin: reducerea reacțiilor imune, păstrarea structurii și componentelor MEC, compatibilitatea cu diferite tipuri celulare, evitarea riscului de transmitere a bolilor, dezvoltarea de organe artificiale [34, 127, 128, 129].

Procesul de decelularizarea deschide oportunități semnificative în avansarea medicinei regenerative și a ingineriei țesuturilor, având implicații profunde în tratamentul bolilor, regenerarea țesuturilor și dezvoltarea de terapii personalizate. Acest proces continuă să fie un subiect intens de cercetare, iar progresele în acest domeniu au potențialul de a aduce beneficii semnificative în îmbunătățirea calității vieții pacienților. Produsul final al decelularizării este carcasa extracelulară, o resursă valoroasă în medicina regenerativă și ingineria țesuturilor. Studiile pe bază de MEC contribuie la dezvoltarea de soluții inovatoare pentru tratarea bolilor și refacerea țesuturilor afectate, iar caracteristicile MEC pot varia în funcție de tipul de țesut sau organ decelularizat și de metoda specifică utilizată în procesul de decelularizare [130, 131, 132]. MEC este considerată scheletul structural esențial pentru menținerea structurii și funcției țesuturilor.

Caracterizarea MEC obținute prin diverse metode de decelularizare implică evaluarea compoziției chimice, arhitecturii 3D și altor aspecte, pentru a confirma potrivirea acestora în vederea utilizării într-o aplicație specifică.

1.5 Caracteristicile generale ale matricelor extracelulare osoase decelularizate

Ce reprezintă de fapt o MEC și cum ar putea fi ea utilizată drept material substituent al oricărui segment sau organ nefuncțional?

În structura osului, pe lângă componenta celulară, avem alte două componente de bază: săruri anorganice și matrice organică (MEC). Această matrice la rândul său este compusă din proteine colagenoase în 90% (în mare parte colagen tip 1), proteine necolagenoase și o cantitate mai mică de proteoglicani mici [2]. În domeniul medicinei regenerative, una din direcțiile de studiu este decelularizarea organelor/segmentelor de organe, adică componentele celulare sunt îndepărtate pentru a produce o MEC care sunt numite altfel schele decelularizate [133]. Procesul de decelularizare se referă la îndepărtarea (chimică, mecanică, enzimatică, etc.) totală sau parțială a componentelor celulare (imunomodulatoare) dintr-un anumit țesut. Unii autori, definesc MEC drept o combinație de proteine structurale și funcționale, proteoglicani, lipide și cristale care are o compoziție unică și proprietăți fizice specifice pentru fiecare organ/țesut. Astfel, elementele structurale ale MEC păstrează parțial funcționalitatea segmentului chiar și în absența componentelor celulare vii [134].

Componentele structurale de bază ale MEC sunt:

- proteinele fibrilare structurale și de adeziune (colagen, elastină, vitronectină, fibronectină, etc.);
- structuri proteice non-colagenice (osteocalcină, osteonectină, osteopontină, fibronectină și sialoproteina II osoasă, proteine morfogenetice osoase (BMP));
- proteoglicani bogați în leucină (glicozaminoglicani (GAG), decorină, biglican, lumican, osteoaderina și proteine serice);
- proteinele specializate (factorii de creștere, proteinele mici din componența MEC, etc.) [2, 125, 135, 136].

MEC decelularizată formează o carcasă biologică ideală pentru aderența, creșterea și diferențierea celulelor noi în procesul de remodelare a diferitelor tipuri de țesuturi sau organe atât *in vivo*, cât și *in vitro* [126, 134, 137].

În acest fel, schelele biologice compuse din MEC decelularizate au o aplicabilitate pe scară largă în repararea/reconstrucția tisulară, atât în studiile preclinice pe animale de laborator, cât și în unele aplicații clinice [138, 139]. Este demonstrată eficacitatea procesului de decelularizare în evitarea sau minimalizarea răspunsului imun la transplantarea de țesuturi procesate, în comparație cu țesuturile neprocesate [140, 141, 142, 143]. Țesuturile decelularizate oferă indicii bioactivi necesari în absența componentelor celulare, evitând astfel problemele imunologice [144]. Din analiza studiilor efectuate pentru acest capitol, pot spune cu siguranță că una dintre problemele de bază în obținerea unei MEC, nu este procesul propriu-zis ci rezultatul final care este adesea o

matrice traumatizată, ceea ce ar putea compromite ulterior recelularizarea după transplantare. Detergenții utilizați în prezent ca element de bază în procesul de decelularizare sunt adesea prea agresivi, în special în cazul segmentelor complexe de os și vas, deoarece un detergent care nu distruge structural osul poate afecta structural vasul, și invers, un detergent care păstrează integritatea vasului poate să nu ofere o decelularizare suficientă a segmentului oso [118, 126].

Cu toate acestea, nu am găsit în literatură argumente suficiente pentru ineficacitatea protocoalelor de decelularizare a vaselor asupra țesutului osos, nici argumente care să sugereze că protocoalele pentru decelularizarea țesuturilor osoase ar fi distructive pentru vase. Decelularizarea țesuturilor dure rămâne un proces insuficient studiat, chiar și în contextul multiplelor metode propuse pentru decelularizare [145, 146, 147].

Unii autori propun utilizarea organelor/segmentelor de organe pentru obținerea MEC utilizată ulterior ca matrice în reconstrucția tridimensională a organelor artificiale. O reconstrucție tridimensională corectă este elementul de bază pentru un organ funcțional, iar dezvoltarea optimă celulară apare atunci când componenta arhitecturală a carcasi este similară structural cu matricea organului nativ, permițând celulelor să se diferențieze în linii celulare specifice [27, 119, 148]. Aceasta de fapt și reprezintă ideea de bază din ultimii ani după care se conduc specialiștii din medicina regenerativă, încercând să utilizeze MEC nu pentru cultivarea organelor artificiale dar, pentru elaborarea protocoalelor în vederea obținerii „alotransplantului ideal”, adică obținerea unui alotransplant ce nu ar necesita tratament imunosupresor după transplantare. Alte surse vorbesc despre termenul de „reciprocitate dinamică”, sugerând că acesta este elementul de bază în procesul de recelularizare. Acest termen reprezintă relația de feedback dintre activitatea metabolică a celulelor rezidente și structura MEC. Carcasa acelulară a organului se schimbă constant în urma activității metabolice curente a celulelor, astfel, vorbim despre o specificitate structurală a fiecărui organ/segment din punct de vedere a ultrastructurii tridimensionale [149, 150]. Drept exemplu, MEC a ficatului este baza ideală pentru hepatocite iar MEC osoasă pentru celulele osoase, regula fiind valabilă pentru toate tipurile de țesut. Acest concept este un argument avantajos major pentru utilizarea MEC naturale ca matrice în inginerie tisulară (pentru restaurarea organelor/segmentelor) și nu a schelelor sintetice. Alți autori utilizează termenul de „reciprocitate dinamică” pentru descrierea mai simplă a interacțiunii dintre celulele rezidente cu MEC și interdependența dintre acestea. Chiar mai mult, aceiași autori susțin că de fapt în momentul transplantării MEC, nu este nevoie de anastomoză directă la recipient deoarece populațiile de celule noi infiltrate, vor fi suficiente pentru a asigura schimbul de oxigen și nutrienți necesari pentru supraviețuirea segmentului transplantat până la finisarea procesului de angiogeneză [151, 152]. Într-un final însă nu am găsit studii eligibile pentru confirmarea acestei teorii. Cu atât mai

mult că un argument de valoare în favoarea utilizării grefelor osoase vascularizate ar fi funcționalitatea acestora inclusiv în defectele septice.

Reieșind din particularitățile diferitor tipuri de țesuturi, la moment nu există un protocol unic de decelularizare, iar metodele variază în dependență de tipul de țesut [153]. Metodele fizice, chimice și enzimatică de decelularizare au fost dezvoltate și optimizate pentru a realiza obiectivul de bază - îndepărtarea ADN-ului și a celulelor responsabile de respingerea hiperactivă la organismul gazdă [151, 154]. Un element important în crearea alogrefelor ideale este posibilitatea generării rețelelor vasculare. Revascularizarea rapidă în câteva zile de la implantarea este vitală pentru funcționarea grefei, așa cum difuzia sângelui din exterior care are loc în momentul implantării, este suficientă doar pentru asigurarea revascularizării stratului extern a grefei (0.1-0.2 mm) [112, 113].

Astfel, mulți autori analizează numeroase abordări urmărind refacerea structurilor vasculare ale țesuturilor decelularizate [110]. Deși este cunoscut succesul în realizarea grefelor vasculare de calibru mare, problema grefelor vasculare cu diametru mic (< 6 mm) rămâne actuală. Studiile în IT vasculară sunt axate pe obținerea unei grefe biocompatibile, non trombogenică, non imunogenă, rezistentă la infecții, cu proprietăți mecanice și fiziologice bune [82]. Paralel cu obiectivele enumerate la conservarea vasului, se țin cont și de un șir de particularități ale țesutului osos (osteogene, osteoconductive și osteoinductive) păstrarea cărora este la fel de importantă. Astfel, în ultimele decenii cercetătorii și clinicienii fac tot mai multe încercări în dezvoltarea substanțelor ce ar ajuta la regenerarea osoasă cu păstrarea concomitentă a elementelor de bază [108].

La moment, nu există un protocol universal de decelularizare. Astfel, metodele fizice, chimice și enzimatică sunt adaptate și aplicate în mod particular după autor și organul decelularizat, încercând în așa mod să se găsească un echilibru între îndepărtarea eficientă a celulelor și afectarea minimă a MEC [153].

La baza viabilității țesuturilor în organismul uman se află distanța dintre celule. Distanța dintre capilare nu depășește 100-200 micrometri, și aceasta asigură difuzia suficientă de oxigen, nutrienți și produse reziduale. Astfel, la moment nu este posibil crearea de țesuturilor funcționale cu o grosime ce depășește câteva sute de micrometri în lipsa unei surse vasculare [32]. Din aceste considerente, pentru supraviețuirea organelor/segmentelor ce depășesc aceste dimensiuni se cer acțiuni suplimentare până la transplantare. Una din abordările de bază în soluționarea problemei de supraviețuire a alogrefei transplantate este stimularea *in vitro* a funcționalității grefei (carcasei biologice). Stimularea poate fi obținută prin diverse tehnici precum utilizarea terapiei celulare, utilizarea factorilor de creștere (VEGF, PDGF, etc.) sau, utilizarea de schelele (grefele) heparin impregnate [115, 155, 156].

Alt element ce poate ajuta la creșterea funcționalității grefelor *in vivo* este creșterea porozității MEC sau canalizarea grefelor. Un studiu în care se descriu două loturi de grefe osoase umane decelularizate în vederea potențialului de recelularizare, au caracterizat grefele de la donatorii tineri (34-49 ani) și grefele de la donatorii înaintați în vârstă (72-84 ani). Una din concluziile făcute de autori a fost, că de fapt, capacitatea osteogenică a alogrefelor osoase colectate de la persoanele în vârstă este mai mare, iar acest lucru poate fi legat cu porozitatea crescută a schelei osoase [10]. Un alt element angiogenic utilizat este potențialul nativ al organismului. Acest potențial este utilizat prin incorporarea diferitor tipuri de celule sau a buclelor arteriovenoase de la recipient în timpul transplantării alogrefelor [157, 158, 159, 160].

Ultimul deceniu a fost cel în care s-au cunoscut elementele de bază în formarea țesuturilor. Astfel, au sporit cunoștințele despre moleculele ce controlează acest proces, despre izolarea factorilor de creștere, s-au determinat căile de semnalizare transmembranare, s-au identificat chiar și genele responsabile de creșterea, diferențierea și formarea țesuturilor. Cu toate acestea, mecanismul responsabil de formarea tridimensională tisulară rămâne incomplet studiată. Ceea ce devine tot mai clar este faptul că un rol important în acest proces complicat revine substanțelor chimice și forțelor mecanice. Matricea osoasă nu se depune la întâmplare, osul este o structură dinamică în care remodelarea are loc datorită acțiunii osteoblastelor și osteoclastelor într-un anumit fel, aceste celule trebuie să fie capabile să răspundă modificărilor forțelor mecanice astfel încât să remodeleze MEC a osului și într-un final să reducă stresul local, și cel mai important ar fi faptul că această remodelare stres dependentă a MEC este specifică tuturor țesuturilor [32, 161].

Din cele studiate și menționate mai sus, pot medita asupra faptului că fiecare organism este unic în felul său prin structura tridimensională a MEC.

La această etapă a analizei, pot spune cu certitudine că o direcție de cercetare în IT este reconstrucția de organe/segmente cu ajutorul unui proces format din 2 etape:

1. decelularizarea organului/segmentului, cu păstrarea maximă a integrității MEC;
2. recelularizarea carcasi (MEC) cu restabilirea rețelei vasculare [162].

La etapa decelularizării, cel mai important este crearea unei carcasi (MEC) biocompatibile, care să poată oferi următoarele funcții de bază:

- ✓ să poată oferi un mediu recunoscut pentru celulele rezident;
- ✓ să poată oferi un suport mecanic;
- ✓ să ofere substrat pentru adeziunea celulară [106].

Dacă analizăm cum o MEC își îndeplinește funcțiile atribuite mai sus, un grup de autori a explicat acest proces încă din 2010. Hoshiba et al, au constatat în cadrul unei analize *in vivo* că celulele se atașează de MEC prin intermediul receptorilor, cum ar fi integrinele, prin urmare, MEC își îndeplinește în așa mod funcția arhitecturală de carcasă 3D.

În ceea ce privește reglarea funcției celulelor, există două mecanisme:

Activarea directă: interacțiunea dintre proteinele MEC și receptorii celulari (de exemplu, integrinele) activează semnalizarea intracelulară. Semnalul activat blochează apoptoza celulară, facilitând supraviețuirea și proliferarea lor.

Activarea indirectă: (i) reglarea activității citokinelor: MEC stochează și reglează activitatea citokinelor, un exemplu fiind procesul în care Decorina se poate lega de BMPs (proteinele macrofage osoase) pentru a-și mări activitatea; (ii) transducția semnalelor mecanice: cultivarea celulelor pe substraturi cu elasticitate diferită induce răspunsuri celulare diferite. De exemplu, când celulele stem mezenchimale sunt cultivate pe substraturi cu elasticitate similară oaselor, aceste celule stem se diferențiază în osteoblaste [107].

Un moment important este că compoziția matricei variază și în dependență anatomia țesutului. Din aceste considerente, în crearea/proiectarea MEC se vor lua în calcul doar țesuturile sănătoase pentru a evita o ulterioară mutație celulară [163, 164].

Eliminarea celulelor dintr-un organ/segment, este bazată pe abordări fizice, chimice sau enzimatic. Procesul are la bază de cele mai multe ori combinarea acestor 3 metode pentru a obține rezultatul final dorit [165, 166].

Mulți autori susțin ideea utilizării țesuturilor alogene umane drept material de bază în crearea MEC adecvate. Argumentul de bază fiind că țesuturile xenogene ar putea transmite agenți biologici și agenți imunogeni [100].

Dezvoltarea protocoalelor de obținere a MEC biocompatibile, cu ulterioara recelularizare și utilizare *in vivo* pot contribui la evoluția medicinei regenerative care în combinație cu progresele tehnice ar permite pentru viitor crearea MEC personalizate.

În continuare, am prezentat metodele și factorii fizici de bază utilizați în procesul de decelularizare. Factorii fizici (tabelul 1) în special deviațiile de temperatură, sunt utilizați pe tot parcursul procesului de decelularizare, chiar dacă nu este metoda de bază [167, 168, 169, 170]. Ciclurile de îngheț-dezgheț este o metodă eficientă în reducerea necesității utilizării altor agenți, cum ar fi substanțele chimice, pentru a realiza o decelularizare eficientă. Zemmyo et al. argumentează că metoda ciclurilor de îngheț-dezgheț are un efect redus în eliminarea structurilor celulare [171]. În același timp, există opinii contradictorii care sugerează eficacitatea metodei atunci când este aplicată în combinație cu un detergent [172]. Mecanismul de bază a acestei metode, este liza celulelor ce are loc în urma ciclurilor de înghețare și dezghețare, numărul ciclurilor fiind dependent de tipul țesutului. Studiile arată că aceste variații de temperatură nu modifică esențial proprietățile mecanice ale MEC, dar, în același timp, sugerează utilizarea unui crioprotector pentru a minimaliza și mai mult reacțiile adverse ale procesului [167, 169].

Tabelul 1. Metodele fizice de decelularizare

Categoria	Substanța/Tehnica	Mecanismul de acțiune
Factorii fizici	HHP	Perturbarea celulelor din țesuturi, spălarea lor ulterioară [167]
	CO ₂ supercritic	Extragerea nucleelor celulare pe contul CO ₂ aplicat cu o presiune > 7.4 MPa și o temperatură peste 31.1 °C [168]
	Deviațiile de temperatură: Îngheț - dezgheț	Are loc repetarea procesului de înghețare, la -80°C apoi revenirea la temperatura biologică de 37°C pentru liza celulară [167]
	Agitația și imersiunea	În combinație cu soluțiile chimice, enzimatică sau/și detergenți [169]
	NTIRE	Crește permeabilitatea membranei celulare față de ioni, ceea ce duce la schimbări ireversibile și moarte celulară [170]
	Ultrasunetul	Alterarea integrității celulare prin omogenizare, dispersare și emulsificare [79]

Notă: HHP – Presiunea hidrostatică înaltă; CO₂ – dioxidul de carbon supercritic; NTIRE – Electroporare ireversibilă non-termică.

Paralel, unele studii, ne vorbesc despre creșterea fragilității schelei obținute prin procesarea pe bază de deviații de temperatură (îngheț-dezgheț) + sonicarea [172].

Agitația și scufundarea țesuturilor, drept tehnici fizice, reprezintă cele mai comune manevre pentru toate protocoalele de decelularizare existente. Scufundarea organelor/segmentelor în diverse substanțe diferă în dependență de duritatea țesuturilor și variază de la câteva ore până la câteva zile. Gradientii de presiune, la fel sunt utilizați pe scară largă pentru a crește eficacitatea decelularizării țesuturilor, prin propulsarea agenților/soluțiilor responsabile de lezarea celulară. Studiile, arată eficacitatea mult mai înaltă a proceselor de decelularizare bazate pe presiune față de cele bazate pe tradiționala agitație rotativă [169].

Alte studii, așa ca cel efectuat de către Park et al. pe inimi de sobolani, face comparația între presiunea constantă a jetului din perfuzia detergentului și jetul cu presiune pulsatilă. Într-un final, autorii au concluzionat că decelularizarea este mult mai rapidă și mai eficientă atunci când se utilizează regimul pulsatil de perfuzare [135]. Găsim și surse care vorbesc despre importanța utilizării presiunii hidrostatice înalte (HHP) și despre eficacitatea sa la înlăturarea componentelor celulare. Utilizarea HHP pentru decelularizarea vaselor sanguine porcine și cornee prin utilizarea HHP *versus* condiții atmosferice normale (în metoda pe bază de detergenți), a arătat o eficiență

mai înaltă a HHP. Această metodă oferă o înlăturare mai calitativă a componentelor celulare și poate fi utilizată pe scară largă ca o metodă de înaltă calitate pentru decelularizare [135, 173, 174].

Zemmyo et al. vorbesc despre faptul că HHP este utilizat în diferite aplicații pentru diferite tipuri de țesuturi. Grupul de autori fac referințe către studii în care s-au obținut decelularizarea vaselor porcine la o amplitudine de 980 MPa a HHP, după care se specifică că alte studii, vorbesc despre distrugerii semnificative a colagenului din cadrul MEC la o aplicare a HHP în jurul valorilor de 320 MPa. Într-un final, concluzia autorilor este, că de fapt, metoda are o eficacitate mai mare la aplicarea ciclică față de aplicarea statică a HHP în aceeași magnitudine, sugerând eficacitatea metodei la o magnitudine mai joasă (conservând astfel componentele de bază a MEC) cu aplicare ciclică în decelularizarea efectivă a țesuturilor [171].

În ceea ce privește metoda de decelularizare tisulară folosind fenomenul de electroporare, aceasta constituie o modalitate de ablație celulară. În acest proces, un câmp electric de intensitate relativ puternică este aplicat, determinând schimbări în stratul lipidic al membranei celulare și provocând moartea acestora prin pierderea homeostaziei celulare [170].

În literatură sunt descrise diferite metode de producere a MEC utilizând electroporația ireversibilă non-termina [175]. Protocoalele de utilizare a acestei metode au mai mulți parametri ce pot fi controlați, spre exemplu:

- lungimea impulsului;
- intensitatea + distribuția câmpului electric;
- numărul + frecvența câmpurilor electrice [170].

Prin urmare, protocoalele de electroporare pot fi adaptate în funcție de structura organului țintă, iar la moment este înregistrată o eficacitate bună asupra decelularizării țesutului cardiovascular (inimi de șobolani) [170].

O altă metodă recent descrisă este utilizarea fluidelor supercritice. Această metodă este întâlnită frecvent în literatura de specialitate, iar dioxidul de carbon (scCO₂) este cel mai des menționat produs, fiind caracterizat ca fiind unul sigur și non-toxic [176]. Viscositatea scăzută și caracteristicile de transport ridicate a unui astfel de fluid permite dezvoltarea protocoalelor simple și rapide care îndepărtează celulele din unele țesuturi după numai 15 minute. Dioxidul de carbon formează în anumite condiții (temperatură de 32°C și presiune de 7.4 MPa) un fluid critic care poate realiza îndepărtarea celulelor cu păstrarea proprietăților de bază a MEC [168, 169]. Cu toate acestea, Gil-Ramírez et al. ne vorbesc despre efectul controversat al scCO₂ la eliminare ADN-ului celular din țesuturi, justificând această părere prin prezentarea rezultatelor discutabile a diferitelor studii. Astfel, eficacitatea scCO₂ la eliminarea ADN-ului poate varia în dependență de originea, tipul, grosimea precum și alte particularități ale țesutului [176].

Utilizarea metodelor chimice de decelularizare, care sunt enumerate în tabelul 2, facilitează mult procesul de eliminare a componentelor celulare din cadrul organelor/segmentelor și reprezintă de fapt elementul de bază în majoritatea protocoalelor [34, 152, 167, 169, 171, 178, 179, 180, 181]. Dacă ar fi să discutăm despre fiecare în parte, atunci dintre toți acizii și bazele, cel mai des utilizat este acidul peracetic (PAA). Acesta, fiind implicat în proces de decelularizare nu prezintă efecte adverse asupra proprietăților mecanice ale MEC, păstrând în același timp factorii de creștere responsabili de adeziunea celulelor [178].

Utilizarea acizilor în concentrații înalte și expunere îndelungată, poate cauza deteriorarea MEC, sau poate duce la denaturarea factorilor de creștere, colagenului și proteinelor din cadrul componentelor structurale a MEC, din aceste considerente, Keane et al. recomand adaptarea corectă a concentrației și timpului de expunere în dependență de structura țesuturilor (moi sau dure) [169].

Reisbig prezintă o metodă de decelularizare a țesutului sinovial utilizând PAA și concluzionează eficacitatea acestuia în păstrarea integrității matricei însă face accent asupra eficacității reduse a acestuia în îndepărtarea AND-ului [182].

Alte studii recente, vorbesc despre utilizarea PAA în diferite concentrații combinat cu DNază pentru decelularizarea vaselor cu diametru mai mic decât 1 mm. Astfel, testarea *in vivo* (pe șobolani) a vaselor decelularizate cu succes, au arătat o scădere a rezistenței vasculare la transplantare, autorii vorbesc despre identificarea rupturilor vasculare la 1 cm distal de anastomoza proximală și la 1 cm proximal de anastomoza distală. Cu toate acestea, la examinarea segmentului central a grefei vasculare s-a determinat că PPA nu întrerupe formarea neointimei vasculare [183].

Tabelul 2. **Metodele chimice de decelularizare** [34, 152, 167, 169, 171, 178, 179, 180, 181]

Categoriza/subcategoriza		Substanța	Mecanismul de acțiune
Factorii chimici	Acizi și baze	Acidul citric Acidul acetic Acidul formic Acidul sulfuric Acidul peracetic Acidul clorhidric Hidroxidul de amoniu Hidroxidul de calciu Hidroxidul de sodiu	Perturbarea celulară cu conservarea matricei și: - solubilizarea membranei celulare - descompunerea acidului nucleic - hidroliza componentelor citoplasmatică

Tabelul 2. Continuare

Categoria/subcategoria		Substanța	Mecanismul de acțiune
Factorii chimici	Detergenți	Ionici SDS SD Triton X-200	- dizolvarea proteinelor asociate ADN-ului și membranei - solubilizează celulele, membranele nucleice, lipidele și ADN-ul cytoplasmatic
		Neionici Triton X-100	Proprietăți biodegradabile cu capacitate înaltă de: - distrugerea celulelor superficiale ale ECM - descompunerea legăturile lipid-lipide, ADN-proteine, lipide-proteine - nu pot distruge legăturile protein-proteină
		Bipolari CHAPS Sulfobetaina 10 Sulfobetaina 16	Proprietățile detergenților ionici, și celor neionici: - dizolvarea proteinelor asociate ADN-ului și membranei - solubilizează celulele, membranele nucleice, lipidele și ADN-ul cytoplasmatic - distrugerea celulelor superficiale ale ECM - descompunerea legăturile lipid-lipide, ADN-proteine, lipide-proteine - nu pot distruge legăturile protein-proteină
	Soluțiile	Hipotonice Hipertonice	Ruperea membranei celulare pe contul șocului osmotic, ceea ce duce la liza celulară
	Alcoolii	Glicerolul Metanolul Cloroform	Produc deshidratarea, eliminarea lipidelor și liza celulei
	Agenții de chelare	EDTA EGTA	Separ ionii de Ca ² și Mg ² , ceea ce duce la distrugerea conexiunilor celulare din collagen și fibronectină
	Solvenții organici	TBP	Distruge structurile proteice

Notă: SDS – dodecil sulfat de sodiu; SD – deoxicolat de sodiu; CHAPS – surfactant zwitterioni; EDTA – ethylene diamine tetraacetic acid; EGTA – ethylene glycol tetraacetic acid; TBP – Fosfatul tributilic.

Referitor altor tipuri de acizi, Lin et al. compară puterea de decelularizare și conservare a matricei cu păstrarea componentele sale de bază (studiu efectuat pe cornee de porc) între acidul formic, acidul acetic și cel citric. Autorii au concluzionat că acidul formic arată un rezultat mai bun în comparație cu acidul acetic și cel citric [177].

Referitor detergenților ionici, cel mai frecvent utilizat agent este dodecil sulfat de sodiu (SDS). Cu toate acestea, deși puterea lui de decelularizare este mai mare în comparație cu a altor detergenți, efectele sale adverse (distructive) asupra ECM la fel sunt mai accentuate. Din aceste considerente, Gerli et al. recomandă înlocuirea SDS-ului cu substanțe mai blânde, spre exemplu SD [178, 184]. SDS poate fi dificil de înlăturat din țesuturi după procesul de decelularizare și este capabil în așa fel să influențeze negativ citocompatibilitate. Din aceste considerente, același grup de autori (Gerli et al.) introduc în protocoalele sale de decelularizare spălări repetate cu apă deionizată sau soluție salină (PBS) pentru a elimina cât mai eficient resturile de SDS sau, propun dispozitive brevetate pentru spălarea efectivă a SDS din componența schelelor [169, 184, 185]. Spălările repetate a SDS-ului după utilizarea lui, este un moment foarte important, nu doar din considerentul îndepărtării resturilor de detergent dar și prin spălarea resturilor celulare, care pot crea nu doar rețet imun, dar și calcificări semnificative în peretele vascular, influențând în așa mod negativ funcționalitatea MEC [186]. Cu toate acestea, puterea de decelularizare a SDS-ului este descrisă minuțios în literatura de specialitate, în special în prelucrarea țesutului cardio-vascular [187].

Deoxicolat de sodiu (SD-ul), reprezintă la rândul său un agent ionic ce poate fi utilizat de unul singur, provocând aglutinarea ADN-ului, sau în combinație cu alte soluții (spre exemplu DNază) pentru obținerea unui efect mai bun. Spre deosebire de SDS, SD produce MEC mai calitative, calitatea schelelor fiind apreciată prin gradul de activitate metabolică, aceasta fiind mai mare la matricele decelularizate cu ajutorul SD față de cele prelucrate cu SDS [58, 167, 188].

Astfel, detergenții anionici, sunt mai eficienți la îndepărtarea celulelor din țesuturile fine (subțiri), pe când cei ionici sunt eficienți în decelularizarea țesuturilor dense, deși prezintă unele efecte negative prin eliminarea factorilor de creștere [189].

Cât despre detergenții bipolari, reieșind din mecanismul de acțiune, aceștia au efecte distrugătoare asupra MEC în timpul decelularizării [152].

Finisez caracterizarea detergenților cu una din concluziile făcute de către un grup de autori, care după părerea mea, este foarte actuală: scurtarea expunerii probelor biologice la acțiunea detergenților în timpul decelularizării, micșorează riscul de deteriorare a MEC [190].

Soluțiile cel mai des utilizate în metodele enzimatică, conform tabelului 3, sunt adesea combinate cu alte tehnici de decelularizare și sunt utile pentru descompunerea elementelor imunogene, cum ar fi ADN-ul, ARN-ul, colagenul, elastina, etc. Scopul principal al soluțiilor enzimatică este îndepărtarea definitivă a celulelor și reziduurilor celulare, pentru a reduce nivelul de inflamație la transplantarea MEC și pentru a susține aderența celulară [34, 152, 167, 169].

Componentele majore ale MEC pot fi vulnerabile la procesul de decelularizare pe bază de tripsină [191]. Tripsina poate deteriora structura MEC prin degradarea colagenului din

componența matricei, și poate afecta negativ atașarea celulelor. Cu toate acestea, examinarea porozității și microarhitecturii realizate prin SEM nu au arătat nicio modificare majoră a probelor decelularizate cu utilizarea tripsinei în comparație cu probele native [192]. Distrugerea structurilor de colagen este specifică și pentru expunerile prelungite la prelucrările cu dispase. Expunerea prelungită poate elimina componentele ECM, cum ar fi fibronectina și colagenul IV.

Colagenaza, la rândul său poate fi utilizată doar în situațiile când conservarea ultrastructurii 3D a MEC și păstrarea maximă de colagenului nu sunt importante [34].

Nucleazele, sunt o opțiune eficientă pentru decelularizare, acești agenți ajută la îndepărtarea completă a celulelor și promovează aderența celulară. Deși utilizarea doar a nucleazelor nu asigură o îndepărtare eficientă a celulelor [193, 194].

Utilizarea enzimelor în procesul de decelularizare reprezintă o metodă eficientă și versatilă pentru îndepărtarea reziduurilor celulare din țesuturi. Enzime sunt de cele mai multe ori combinate cu alte tehnici de decelularizare și sunt utile în descompunerea elementelor imunogene, menținând totodată integritatea MEC. Această abordare permite obținerea unui schele biocompatibile, care poate fi utilizată în diverse aplicații medicale, cum ar fi înlocuirea și regenerarea țesuturilor, fără a induce o reacție imună.

Tabelul 3. **Metodele enzimatic de decelularizare** [34,152,167,169]

Categoria	Substanța		Mecanismul de acțiune
Factorii enzimatici	Tripsina		Clivarea legăturilor peptidice
	Nucleazele	DNase	Catalizează hidroliza lanțurilor de ADN și respectiv ARN
		RNase	
	Dispase		Clivarea anumitor peptide, în special fibronectina și colagenul de tip IV
Colagenaza		Clivarea legăturilor peptidice din colagen	

Notă: DNase – dezoxiribonucleaza; RNase – Ribonucleaza; AND – acidul dezoxiribonucleic; ARN – acidul ribonucleic.

Reieșind din gama largă de metode și soluții propuse pentru procesul de înlăturare a componentelor celulare din cadrul organului/segmentului, nu avem cu certitudine un protocol de orientare, fiecare autor venind cu o sugestie sau idei despre utilizarea unui algoritm anumit format din combinația diferitor procese [145, 195]. Unii autori propun combinarea a mai multor soluții în protocolul de decelularizare [127, 196]. Eyre et al. sugerează utilizarea protoalelor fără detergenți și enzime [36], iar Granato et al. ne vorbesc despre rezultatul ineficient a protoalelor unde se utilizează doar un singur detergent [36, 84]. Cu siguranță că în fiecare caz, fiecare autor are dreptate în momentul în care țesuturile utilizate pentru decelularizare sunt de consistență

diferită (os, vas, creier). Ideea studiului nostru, într-un final, ar fi să găsim acel protocol de mijloc, ce ar ajuta la decelularizarea grefelor compozite. Este evident că, indiferent de metoda utilizată, etapele fizice, chimice și enzimatică vor afecta atât calitatea decelularizării cât și structura MEC într-o egală măsură. Prin urmare, este crucial să se mențină sau să se găsească un echilibru în durata fiecărui pas și concentrația soluțiilor, astfel încât să se atingă obiectivul principal cu un impact minim asupra integrității MEC. Acest lucru este esențial pentru a asigura, menținerea citocompatibilității și funcției schelei [152].

În mod ideal, metoda utilizată la decelularizarea pentru grefelor osoase, ce urmează și poate fi aplicată în ingineria țesuturilor trebuie să întrunească următoarele funcții:

1. să decelularizeze grea complet (sau maxim posibil);
2. să inactiveze agenții patogeni dăunători;
3. să mențină stabilitatea biomecanică;
4. să prezinte proprietăți osteoconductive și osteoinductive;
5. să nu prezinte toxicitate [12].

1.6 Biocompatibilitatea matricelor extracelulare osoase decelularizate

Eficacitatea decelularizării se referă nu doar la înlăturarea componentelor celulare, dar și la calitatea MEC, după cum am menționat anterior, iar o MEC traumată nu poate fi considerată aplicabilă. Biocompatibilitatea la rândul său reprezintă una din caracteristicile de bază a unei schele aplicabile [84]. Biocompatibilitatea se referă la capacitatea unui material de a interacționa favorabil cu țesuturile și celulele organismului fără a provoca reacții adverse. MEC naturală este considerată superioară altor tipuri de MEC în primul rând pe contul proprietăților sale biomecanice. MEC de origine naturală este adaptată la cerințele fiecărui tip de țesut, aceasta asigură o compatibilitate mecanică adecvată, oferind suport structural și elasticitate necesară, acționând ca un ghid pentru celulele care sintetizează propria lor MEC, aceasta din urmă contribuind la menținerea integrității și funcționalității țesutului [197, 198, 199].

MEC naturală conține molecule semnalizatoare și site-uri de recunoaștere care permit celulelor să interacționeze și să comunice cu mediul lor înconjurător. Această recunoaștere facilitează aderența celulară, migrarea și diferențierea celulară în mod coordonat. Astfel, biocompatibilitatea MEC este esențială pentru a asigura o reparare adecvată a țesutului fără declanșarea unui răspuns inflamator sau a respingerii imune. În domeniul medicinei regenerative și al ingineriei țesuturilor, biocompatibilitatea MEC este un aspect crucial. Pentru matricile extracelulare, biocompatibilitatea este, de asemenea, esențială pentru asigurarea succesului aplicărilor lor clinice. Studiile și testele riguroase sunt necesare pentru a evalua biocompatibilitatea MEC înainte de utilizarea lor clinică. Aceste investigații asigură că aceste materiale sunt sigure și eficiente în susținerea regenerării țesuturilor fără a provoca efecte secundare semnificative.

Biocompatibilitatea MEC reprezintă o preocupare centrală în dezvoltarea terapiilor regenerative și în aplicările *in vivo*. Una din metodele de testare a biocompatibilității MEC este testul de proliferare celulară: se analizează capacitatea celulelor de a se multiplica și de a crește în prezența matricii extracelulare. Aceasta oferă informații despre modul în care matricea influențează diviziunea celulară și creșterea [200, 201, 202].

Una din modalitățile de testare a biocompatibilității MEC este însămânțarea *in vitro* a celulelor pluripotente sau diferențiate extrase din măduva osoasă, țesut adipos sau sânge periferic, așa ca:

- ✓ celulele mononucleare;
- ✓ celulele endoteliale;
- ✓ celulele mezenchimale;
- ✓ celule stromale din măduva osoasă;
- ✓ măduvă osoasă proaspătă [93, 203, 204].

1.7 Imunogenitatea grefelor osoase de origine alogenă

Grefele osoase de origine alogenă sunt percepute ca "non-self" de către sistemul imunitar și inițiază în așa mod o reacție imună la nivelul organismului gazdă [98, 122].

Înțelegerea răspunsului imun la transplantarea alogrefelor osoase, implică o recapitulare a etapelor răspunsului imun. Acesta are la bază câteva procese cheie:

1. răspunsul imun inițial: după implantare, alogrefele sunt supuse unui atac imun imediat. Macrofagele și celulele dendritice, vor prelua și vor prelucra antigenii de pe grefă, vor migra către ganglionii limfatici și, vor activa limfocitele T helper, declanșând un răspuns imun celular;
2. răspunsul imun celular: limfocitele T citotoxice (CD8+) la rândul său, pot distruge direct celulele grefei, considerate ca fiind "străine", pe când limfocitele T helper (CD4+) coordonează și reglează răspunsul imun, contribuind la activarea limfocitelor B și la producerea de anticorpi;
3. răspunsul umoral: limfocitele B pot produce anticorpi împotriva antigenilor străini de pe grefă, contribuind la distrugerea țesutului transplantat [205].

La om, a fost demonstrată prezența anticorpilor specifici anti-HLA (Human leukocyte antigens) împotriva alogrefelor osoase liofilizate și cele proaspăt congelate. Alogrefa proaspăt congelată poate genera în continuare reacții imune, în timp ce alogrefele liofilizate prezintă o imunogenitate mai mică, dar și o integritate structurală mai mică. Acest răspuns imun poate avea un efect negativ asupra încorporării grefei și poate crește riscul respingerii [206].

Alegerea unei schele corecte necesită înțelegerea interacțiunii sale cu sistemul imunitar al gazdei. Ca exemplu, după introducerea schelelor sintetice în corpul uman, sistemul imunitar răspunde la corpul străin, inițiind migrarea neutrofilelor și macrofagelor, urmat de producerea de citokine inflamatorii la locul de implantare. Astfel, în câteva zile, macrofagele formează celule

gigante multinucleate de corp străin, care eliberează enzime puternice și accelerează degradarea grefei. În consecință, majoritatea grefelor sintetice sunt acoperite cu o capsulă fibrotică densă și izolate de corpul uman. Acest răspuns imun rămâne activ atât timp cât grefa este complet degradată sau îndepărtată [207].

Importanța de bază a proceselor de decelularizare, este îndepărtarea elementelor imunogene din alogrefe și xenogrefe cu păstrarea intactă a componentelor MEC, astfel încât să reducem la minim eliberarea moleculelor asociate leziunilor după transplantare. Pot spune cu certitudine că interacțiunea dintre antigeni și anticorpi în momentul transplantării unei MEC deteriorată, insuficient decelularizată, toxică sau sterilizată insuficient, activează în continuare cascada imună și creează un cerc vicios ce finalizează cu eșecul transplantării. În pofida rezultatelor încurajatoare privind aplicabilitatea MEC, imunogenicitatea lor poate fi o barieră ce necesită abordată. Cunoașterea factorilor care contribuie la declanșarea răspunsului imun din partea unei MEC va permite găsirea soluții pentru fabricarea de schele cu biocompatibilitate favorabilă și răspuns imun *null* [34, 207].

Atfel, drept concluzie către capitolul dat o să enumăr în continuare câteva din cele mai importante aspecte ce pot influența rezultatele clinice la transplantarea MEC osoase obținute prin IT:

1. tipul MEC: materialele utilizate în ingineria țesuturilor pot declanșa diferite niveluri de reacții imune. Tipul de prelucrare a grefelor la fel pot influența nivelul răspunsului imun declanșat [207];
2. structura MEC: proteinele MEC afectează profund funcționarea fiziologică la nivel celular prin modificarea producerii de mediatori inflamatori și citokine [209];
3. imunosupresie localizată: monitorizarea inflamației în timpul și după implantare, este importantă [17];
4. biocompatibilitate MEC: materialele biocompatibile sunt concepute pentru a minimiza inflamația și pentru a facilita integrarea țesutului obținute prin IT în organism.

2. MATERIALE ȘI METODELE DE CERCETARE

2.1 Prezentarea generală a studiului

Lucrarea dată relatează un studiu experimental, preclinic, efectuat pe material biologic preluat de la animale de laborator. Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică a Cercetării USMF „Nicolae Testemițanu”, cu emiterea avizului favorabil nr. 71 în data de 21.05.2018.

Studiul dat a fost efectuat în cadrul Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare a USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova și Laboratorului de cercetare Leibniz de biotehnologie și organe artificiale (LEBAO), Școla de Medicină din Hannover (MHH), Germania, în perioada anilor 2017-2022. Materialul biologic (grefele vaculare, grefele osoase avasculare, grefele osoase compozite vascularizate) a fost colectat de la animale de laborator, porci (femele și masculi) cu o vârstă de aproximativ 3 luni, masa corporală între 35-40 kg.

Obiectivul de bază a capitolului dat, reprezintă descrierea detaliată a materialului și metodelor care au fost utilizate pe parcursul studiului experimental de obținere a matricei extracelulare osoase compozite vascularizate (MECOv), prin descrierea: (i) eseului chirurgical de obținere a grefelor vasculare, grefelor osoase avasculare și a grefelor osoase pe pedicul vascular, (ii) protocolului de decelularizare utilizat, (iii) metodelor calitative (histologice) și cantitative (de cuantificare) utilizate la testarea eficacității protocolului, (iv) metodei utilizate la testarea biocompatibilității alogrefelor obținute (vasculare și osoase).

2.2 Eseul chirurgical de prelevare a grefelor

Toate grefele au fost prelevate în cadrul Laboratorului de cercetare Leibniz de biotehnologie și organe artificiale (LEBAO) al Școlii de Medicină din Hannover (MHH), Germania.

Disecția membrului posterior la purcel, în prima oră după eutanasiere, a fost ghidată de reperele anatomice (localizarea și traiectul pediculului nutrient major, situat pe marginea posterior-laterală a tibiei) descrise în literatura de specialitate [210, 211]. Astfel, dezarticularea membrului inferior (de la nivelul articulației șoldului) am efectuat-o, după care am colectat segmentului posterior femur-gambă. Disecția a fost efectuată pe 8 membre posterioare, de la 8 purcei diferiți. cu respectarea regulilor de asepsie și antisepsie, după cum urmează (figura 3 și figura 4):

- cu o incizie liniară, am vizualizat fascia superficială a mușchilor;
- am continuat disecția cu excizia și înlăturarea dermului în bloc cu hipodermului;
- am expus compartimentele musculare pe ambele segmente (coapsă și gambă);
- cu un abord chirurgical anterior, am dezgolit articulația genunchiului prin înlăturarea rotulei;
- cu acces anterior, am dezarticulat gamba de la nivelul articulației genunchiului;
- cu abord chirurgical posterior am vizualizat și protejat pediculului vascular (artera poplitee) de la nivelul articulației genunchiului;

- am continuat disecția anatomică pe traiectul vasului (pentru a evita traumatizarea lui);
- am preparat vasul sanguin până la vizualizarea bifurcației acestuia (bifurcația arterei poplitee are loc la nivelul metafizei și continuă cu ramura sa artera nutrientă, care penetrează osul tibial printr-un orificiu situat în treimea proximală a diafizei tibiale);
- cu abord anteromedial, am efectuat disecția mușchilor compartimentului dat, am vizualizat, protejat și finisat disecția arterei tibiale (figura 4B);
- după vizualizarea structurilor vasculare de bază, am înlăturat lamboul muscular cu păstrarea integrității periostului pe tot parcursul osului tibial;
- am efectuat osteotomia (cu ajutorul beschiei manuale) proximală și distală a osului cu obținerea grefei osoase compozite vascularizate (figura 5).

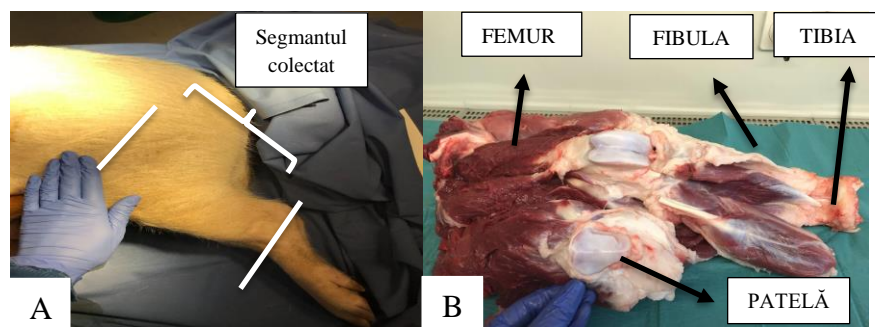


Figura 3. **Disecția anatomică primară a membrului posterior la animal de laborator (porc).**

(A) aspect macroscopic a membrului posterior, (B) reperele anatomice de bază

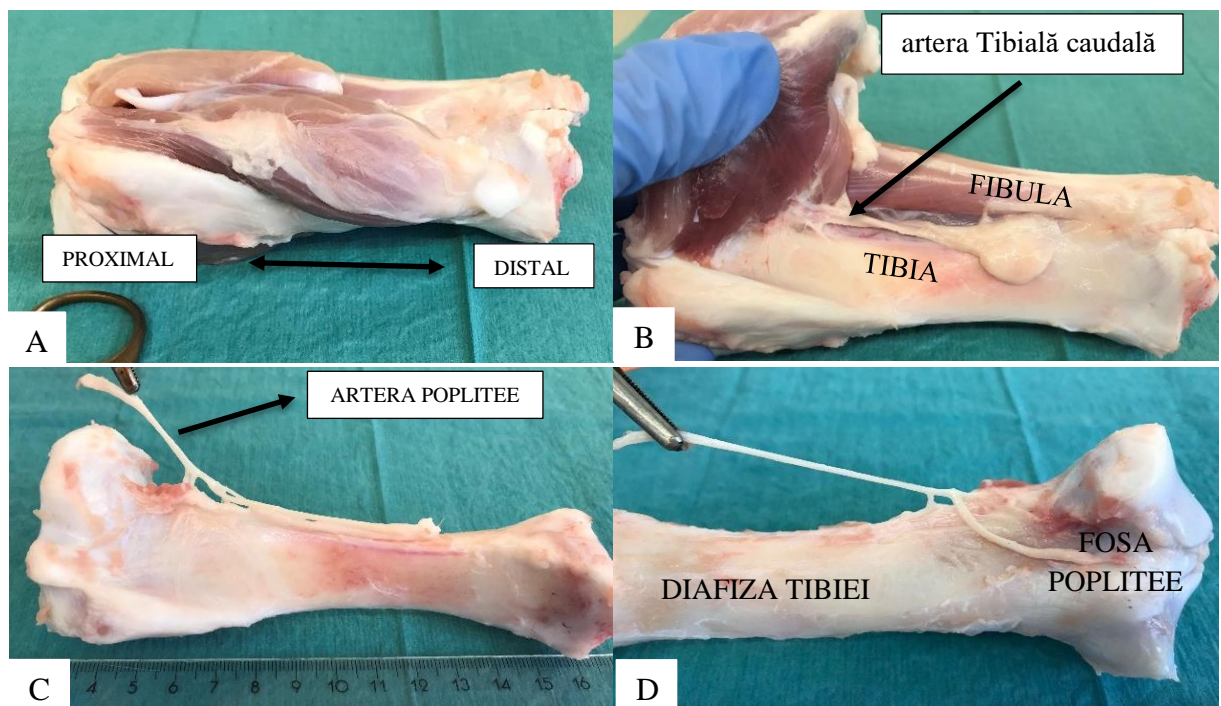


Figura 4. **Disecția gambei. Model animal de laborator (porc).** (A) osul tibial + manșonul muscular anterior, (B) vizualizarea bifurcației arterei poplitee, (C, D) bifurcația arterei poplitee

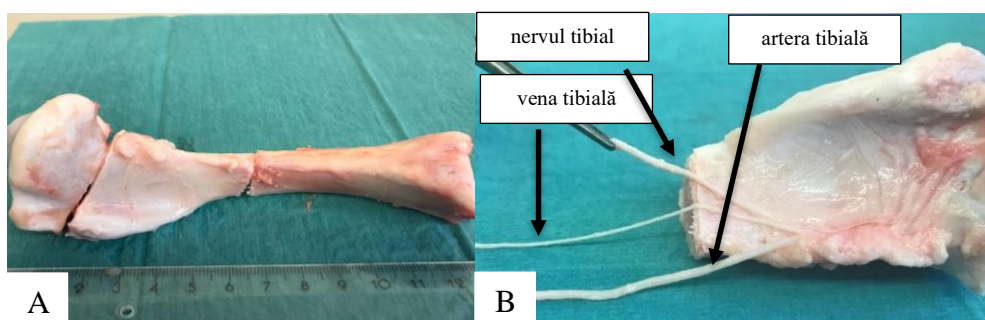


Figura 5. **Grefa osoasă vascularizată. Disecția anatomică.** (A) osteotomia osului tibial, (B) disecția arterei tibiale caudale

După obținerea grefelor osoase compozite vascularizate, acestea au fost depozitate la 4°C în soluție PBS + antibiotic. Soluția a fost schimbată la fiecare 72 h pentru grefele care necesitau o păstrare mai îndelungată.

Pentru a testa funcționalitatea și permeabilitatea pediculului vascular, am perfuzat grefa osoasă cu o soluție ce conține albastru de metilen pentru 24 h, cu ajutorului perfuzomatului (figura 6). După perfuzie, am evaluat gradul de colorare a segmentului de interes, acest lucru poate fi realizat prin compararea intensității și extinderii colorării în albastru între diferite segmente ale grefei. Segmentul care prezintă cea mai intensă și extinsă colorare cu albastru de metilen poate fi considerat segmentul perfuzat, acest lucru indică faptul că soluția perfuzantă a ajuns în acest segment și că fluxul sanguin este activ în această zonă, un moment extrem de important în alegerea corectă a dimensiunii grefei. corectă a dimensiunii grefei.

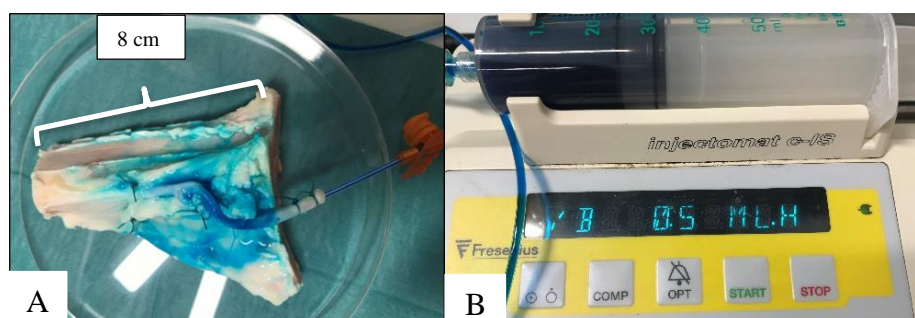


Figura 6. **Testul de perfuzie arterială cu albastru de metilen.** (A) cateterizarea arterei poplitee, (B) parametrii perfuzomatului

2.3 Decelularizarea grefelor vasculare și a grefelor osoase avasculare

Procesarea grefelor vasculare de origine porcină

Un protocol [212] pentru decelularizarea grefelor osoase avasculare mici (țesut dur), a fost preluat și adaptat pentru decelularizarea grefelor vasculare (țesut moale) în vederea obținerii unei MEC vasculară biocompatibilă. Inițial, am folosit artera carotidă porcină, congelată la -80°C în tuburi de 15 ml pe care am dezghețat-o la temperatura camerei, am separat-o în 3 segmente și am procesat-o după pașii protocolului, utilizând un agitator digital cu mișcări oscilante (figura 7):

1. Soluția isotonică (0.1 % EDTA + PBS). Grefa a fost spălată pentru 1 h în soluție isotonică, care s-a obținut din diluarea a 0.5 ml de 0.5 mM (echivalentul a 0.1 g de 372.24 g/mol) EDTA (acid etilendiaminotetraacetic /Ethylendiamine tetraacetic acid) pentru 100 ml soluție PBS (soluție tampon salină cu fosfat/Phosphate Buffered Saline);
2. Agentul de chelare (0.1 % EDTA + Tris buffer). Prelucrarea grefei pentru 16 h cu o soluție ce conține un agent de chelare, care s-a obținut din diluarea a 0.5 ml de 0.5 mM (echivalentul a 0.1g de 372.24 g/mol) EDTA pentru 100 ml TRis buffer 10 mM cu ph 7.5;
3. Grefa a fost spălată pentru 1h cu soluție PBS, fiind pregătită pentru următorul pas;
4. Detergentul anionic (0.5 % SDS). Prelucrarea pentru 24 h cu o soluție ce conține un detergent anionic obținută prin dizolvarea a 0.5 gr SDS (Dodecil sulfat de sodiu/Sodium dodecyl sulfat) în 100 ml Tris buffer 10 mM cu ph 7.5;
5. Spălarea cu soluție PBS pentru 7 h, cu schimbarea soluției la fiecare 1h;
6. Detergent non-ionic (1 % Triton X-100). Prelucrarea pentru următoarele 24 h cu o soluție ce conține un detergent non-ionic care s-a obținut prin diluarea a 1 ml Triton X-100 pentru 100 ml Tris buffer 10 mM cu ph 7.5;
7. grefa a fost spălată din nou cu soluție PBS, fiind lăsată peste noapte, cu schimbarea soluției de 7 ori în prima oră;
8. Sol Enzimatică (DNază 300 U/ml). La această etapă de prelucrare enzimatică, grefa a fost plasată pentru 48 h într-o soluție ce conține DNază 300 U/ml, soluția fiind schimbată la fiecare 24 h. Sol de DNază 300 U/ml s-a obținut prin diluarea a 1 mg DNază cu activitatea de 5279 U/mg în 17.5 ml PBS și 17.5 μl 1 M MgCl₂. Această etapă de prelucrare s-a efectuat la 37°C, utilizând un termomixer. Pentru a reduce costurile acestei etape prin utilizarea rațională a volumului de soluției, grefele de țesut au fost plasate în tuburi Eppendorf 2 ml (figura 8). La finisarea protocolului, grefa a fost depozitată la 4°C în soluție PBS + antibiotic. Soluția a fost schimbată la fiecare 72 h pentru grfele ce au necesitat o păstrare mai îndelungată.

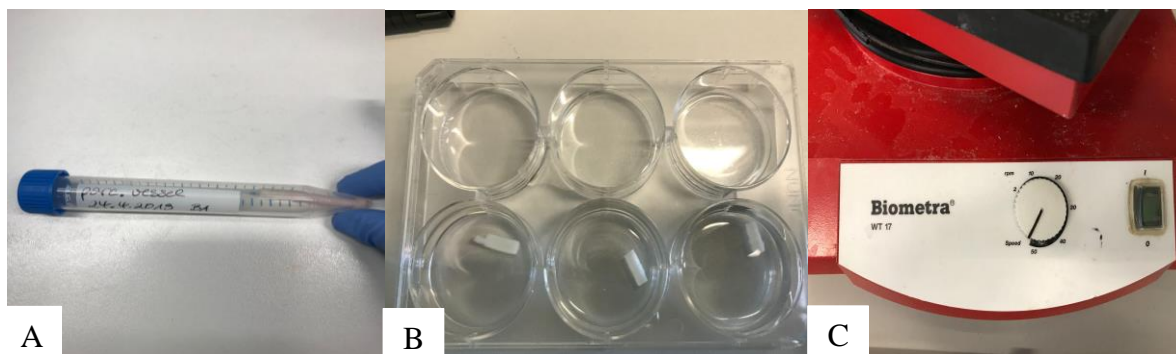


Figura 7. **Decelularizarea grefei vasculare (artera carotidă).** (A) grefa vasculară nativă, (B) aspectul macroscopic a grefei decelularizate, (C) parametrii agitatorului digital cu mișcări oscilante

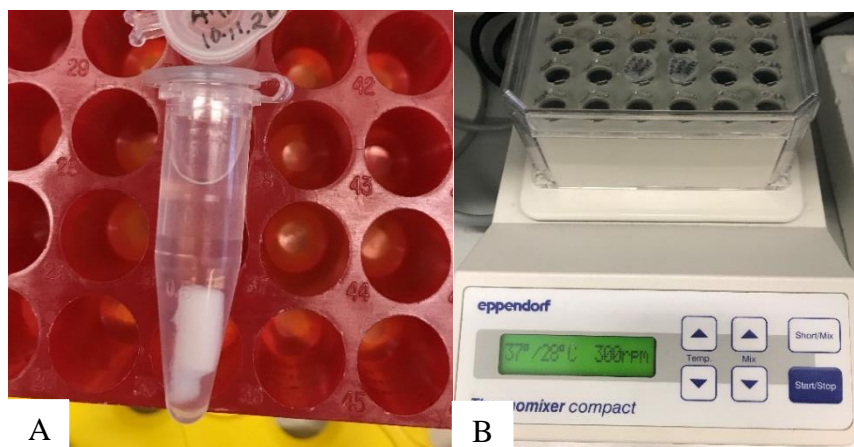


Figura 8. **Procesarea enzimatică a grefei vasculare.** (A) scufundarea grefei în sol. enzimatică, (B) parametrii incubatorului oscilant

Grefele de calibru mediu (diametre diferite), artera femurală și artera tibială caudală, de origine porcină, au fost obținute respectând același protocol chirurgical de disecție și au fost prelucrate respectând în totalitate pașii protocolului de decelularizare. Artera femurală superficială a fost clasificată drept vas cu diametru mediu iar artera tibială caudală clasificată drept arteră de calibru mic) – figura 9.

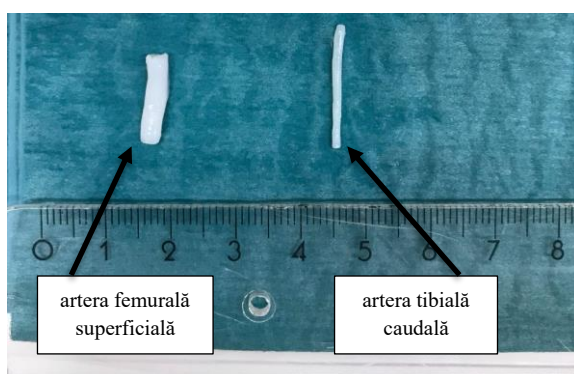


Figura 9. **Grefa vasculară cu diametru mediu (artera femurală superficială) și mic (artera tibială caudală).** Aspect macroscopic

Procesarea grefelor osoase avasculare de origine porcină

În vederea testării variantei de protocol adaptată țesutului vascular, am continuat studiul experimental cu decelularizarea țesutului osos avascular, cortical și spongios. Periostul fiind decelularizat ca parte componentă a grefei osoase. Pentru acesta, osul tibial obținut prin același protocol operator, a fost fragmentat în fragmente mai mici (cu ajutorul beschiei manuale). Segmentele osoase au cuprins toată circumferința osului și au avut o lățime de aproximativ 1-2 cm

(figura 10). Segmentele osoase au cuprins toată circumferința osului și au avut o lățime de aproximativ 1-2 cm (figura 10).



Figura 10. **Grefa osoasă avasculară. Disecția anatomică.** (A) osteotomia primară a osului tibial, (B, C) grefele osoase avasculare

Grefele osoase au fost plasate în tuburi Eppendorf de 50 ml, iar decelularizarea a fost efectuată folosind un mixer de tip ruluu. După decelularizare, pentru ulterioara examinare histologică, un segment din fiecare grefă a fost transferat în vase sterile și înmuiat într-o soluție decalcifiantă, pentru decalcifiere, utilizând un mixer magnetic. Partea rămasă a grefelor a fost depozitată la 4°C în soluție PBS + antibiotic. Soluția a fost schimbată la fiecare 72 h.

2.4 Decelularizarea grefelor osoase compozite vascularizate

Același protocol, utilizat pentru decelularizarea grefelor vasculare de calibru diferite (mare, mediu și mic) precum și pentru decelularizarea grefelor osoase corticale și spongioase, a fost utilizat și pentru decelularizarea grefelor osoase compozite vascularizate (os cortical și spongios + periost + pedicul vascular) (figura 11).

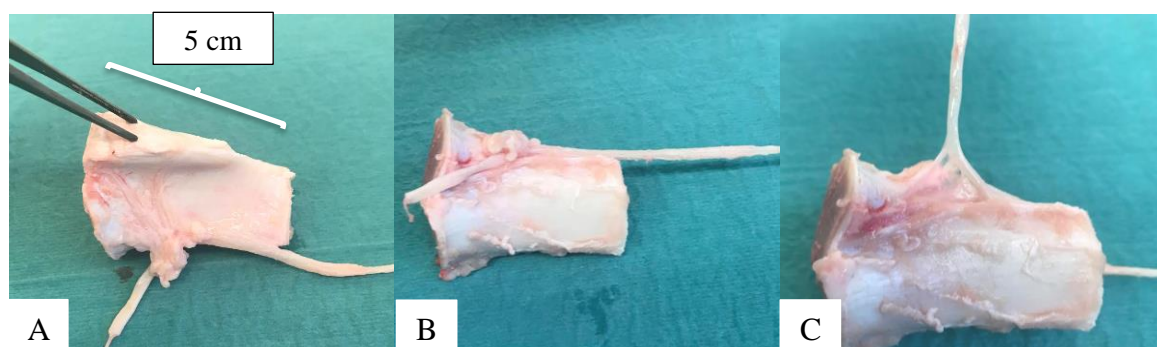


Figura 11. **Grefa osoasă vascularizată. Aspect macroscopic.** (A) lungimea grefei, (B, C) traiecul și bifurcația pediculului vascular

Grefele osoase compozite au fost colectate și decelularizate ulterior urmând aceeași pași ai protocolului, iar pentru perfuzarea soluțiilor, s-a utilizat pompa peristaltică cu un circuit închis a soluțiilor și cu o viteză de 15 ml/h (figura 12) și 2 căi de perfuzare (figura 13).

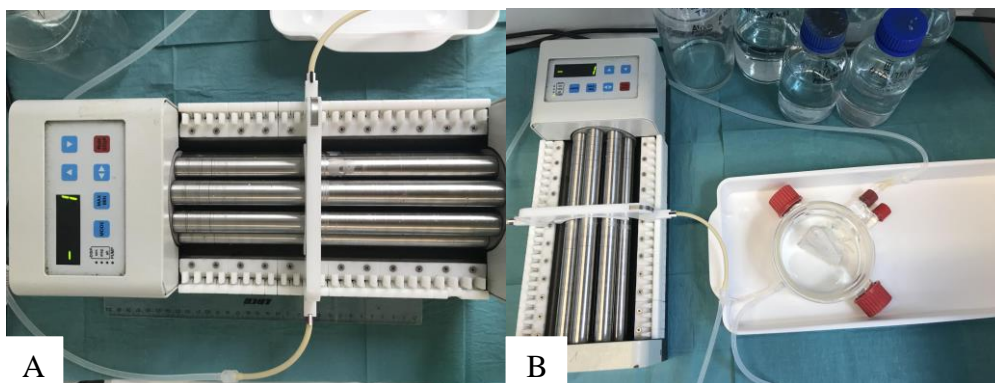


Figura 12. **Sisteme de perfuzie pentru decelularizarea grefelor osoase vascularizate.** (A) pompa peristaltică, (B) circuitului închis a sistemii de perfuzie

Perfuzarea a fost aleasă în acest studiu pentru a obține o distribuție uniformă a soluției de decelularizare. Această metodă permite controlul precis al timpului și intensității perfuziei, optimizând eficiența procesului. Prin perfuzare se păstrează structura tridimensională a grefei osoase, esențială pentru funcționalitatea și biocompatibilitatea acesteia. Dimensiunile grefei, care au fost ajustate după testul de perfuzie cu soluția ce conține albastru de metilen, a constituit aproximativ 5 cm lungime (am selectat segmentul osos colorat cel mai intens în albastru).

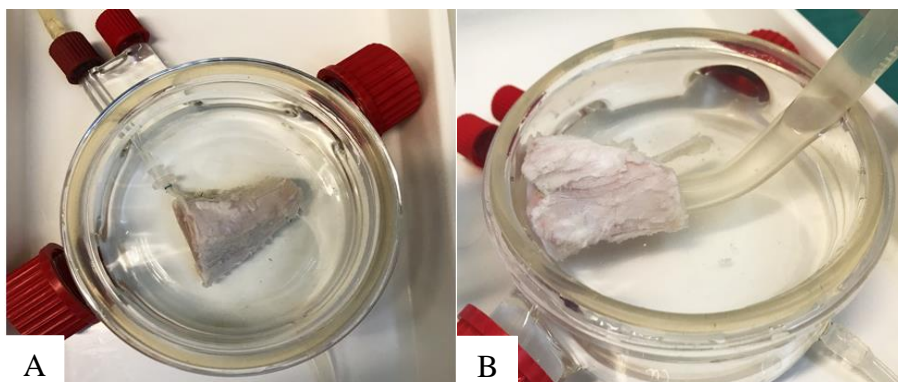


Figura 13 **Perfuzia soluțiilor de decelularizare pentru grefa osoasă vascularizată.** (A) perfuzia prin artera poplitee, (B) perfuzia prin diafiza osului tibial

În a 8-a etapă de prelucrare a grefei, unde s-a utilizat soluția enzimatică, am aplicat măsuri de raționalizare a costurilor cercetării (micșorarea volumului soluției utilizate) și de reducere a numărului de animale necesare studiului (utilizarea replicatelor tehnice). Astfel, am colectat 3 probe de os din segmentul spongios al grefei și 3 probe de os din segmentul cortical (dimensiunile grefei au permis acest lucru). Replicatele tehnice au fost colectate cu ajutorul beschiei manuale (figura 14) și plasate în tuburi de 50 ml, la 37°C, fiind supuse prelucrării enzimatice cu ajutorul unui agitator digital tip rulou. Ulterior, probele au fost examinate calitativ și cantitativ. Grefa rămasă a fost depozitată la 4°C în soluție PBS + antibiotic pentru examinări ulterioare. Soluția a fost schimbată la fiecare 24 h pentru grefele care au necesitat o păstrare mai îndelungată.



Figura 14. **Procesarea enzimatică a MECOv.** Colectarea replicatelor tehnice.

Adițional, am testat același protocol pentru decelularizare grefei osoase compozite vascularizate măbind concentrația detergentului SDS de la 0.5% la 1%. Grefa care a fost decelularizată prin acest protocol a fost procesată perfuzând soluțiile protocolului prin artera poplitee și a fost examinată la cuantificarea ADN-ului.

2.5 Aprecierea eficacității decelularizării

Eficacitatea protocolului de decelularizare a fost testată cu ajutorul examinării histologice calitative și cantitative, precum și a testului de biocompatibilitate *in vitro*. După finisarea decelularizării, grefele vasculare, periostul și grefele osoase avasculare au fost examinate calitativ. Pentru examinarea histologică calitativă am efectuat colorația H&E și colorația DAPI care a permis vizualizarea nucleilor celulari și a ADN-ului. Histologia am efectuat-o în paralel pentru probele de țesut decelularizat vs țesut nativ. Țesutul nativ l-am colectat de la aceeași grefă până la începerea procesului de prelucrare și, a fost utilizată ca probă de control. Pentru grefele osoase avasculare am efectuat adițional testul de cuantificare a ADN-ului. Grefele osoase vascularizate le-am examinat cantitativ (cuantificarea ADN-ului) și calitativ (SEM) separat pentru segmentul cortical a grefei și segmentul spongios (nativ vs decelularizat). Testul de biocompatibilitate *in vitro* l-am efectuat pentru MEC vasculară, MEC osoasă avasculară și MECOv.

2.6 Examinarea histologică calitativă (H&E, DAPI)

Colorația histologică H&E

Colorația cu H&E a fost utilizată în acest studiu ca una din metodele de bază în histologie pentru evidențierea și examinarea microscopică a structurilor celulare și tisulare. Hematoxilina colorează în nuanțe de albastru-violet nucleii celulari iar eozina oferă citoplasmei nuanțe de roz-roșu. Astfel, colorația cu H&E a fost utilă în procesul de decelularizare pentru a evalua eficacitatea îndepărtării celulelor și pentru a confirma păstrarea matricei extracelulare. Secțiunile de țesut decelularizat ar trebui să arate o lipsă a nucleilor celulelor, care sunt colorate cu hematoxilină, în timp ce structura MEC poate fi observată datorită colorației cu eozină.

Colorația histologică H&E pentru probele de țesut moale

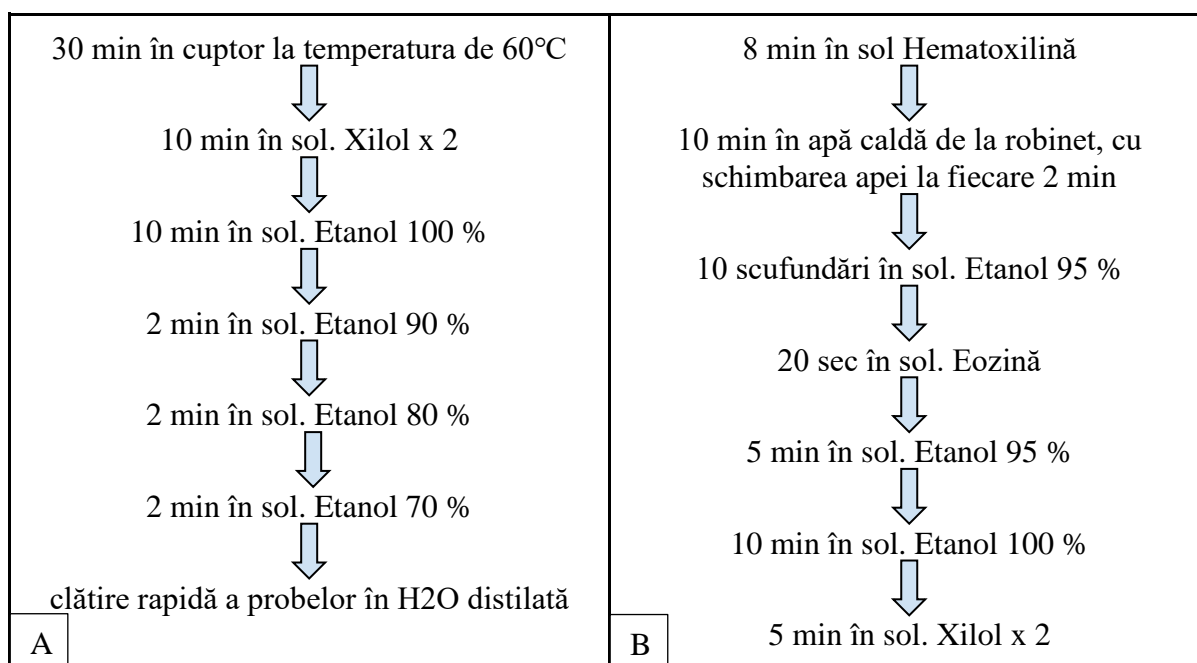
Probele de țesut au fost fixate cu ajutorul sol. Paraformaldehidă 4 %, pentru 2 zile la temperatura camerei. După care s-a efectuat deshidratarea grefelor cu ajutorul unui deshidrator

(HistoCore Pearl, Leica), care a folosit o serie de etape programabile și computerizate de deshidratare, pe bază de xilol și etanol. După etapa de deshidratare, grefele de țesut moale au fost fixate în parafină, fiind puse inițial în forme cu parafină caldă și lăsate să se solidifice peste noapte cu ajutorul tăvii metalice pentru îngheț. Probele încorporate în parafină au fost secționare cu ajutorul microtomului rotativ semimotorizat (Leica RM 2245) în secțiuni de 4 μm, acestea din urmă fiind plasate pe lame de microscop și uscate peste noapte cu ajutorul tăvii metalice pentru uscare. După fixarea și plasarea probelor de țesut pe lame, acestea au fost rehidratate și colorate după schema protocolului prezentat în tabelul 4. Secțiunile colorate au fost acoperite cu lame de protecție folosind corbit balsam și au fost lăsate să se usuce peste noapte. Analiza probelor a fost efectuată cu un microscop cu lumină transmisă.

Colorația histologică H&E pentru probele de țesut dur

Probele de țesut osos cortical și spongios au fost inițial fixate fiind puse în sol. Paraformaldehidă de 4% la temperatura camerei pentru 2 zile. După fixare, probele au fost supuse procesului de decalcifiere timp de 1 lună, cu ajutorul soluției pentru decalcifiere (Decalcifier soft, Solvagreen®) și agitatorului magnetic (RCT basic, IKA LABORTECHNIK). Probele decalcifiate și congelate au fost secționare folosind un Microtome HM 560 Cryostat în secțiuni de 5 μm și plasate pe lame peste noapte la -80°C. După fixarea și plasarea probelor de țesut pe lame, acestea au fost rehidratate și colorate după aceeași schemă (tabelul 4). Secțiunile colorate au fost acoperite cu lamele de protecție folosind soluția pe bază de Xilen, după care lamele au fost lăsate să se usuce peste noapte. Analiza probelor a fost efectuată cu un microscop cu lumină transmisă.

Tabelul 4. **Protocolul pentru colorarea histologică H&E.** (A) etapele rehidratării probelor histologie, (B) colorarea H&E a propriu-zisă



Colorația histologică DAPI

Colorația DAPI a probelor de țesut nativ vs procesat a fost utilizată în acest studiu fiind o tehnică des utilizată în microscopia fluorescentă pentru a vizualiza și identifica ADN-ul celular. DAPI este un colorant albastru fluorescent care se leagă de ADN, permițând astfel observarea structurilor nucleare și a cromozomilor la microscopul fluorescent. La microscopul fluorescent, ADN-ul în celulele colorate cu DAPI va emite fluorescență albastră atunci când este excitat cu lumina ultravioletă sau albastră. Această fluorescență permite vizualizarea și identificarea structurilor nucleare, cum ar fi nucleul și cromozomii, în celulele țesuturilor cercetate. Astfel țesutul ce conține celule (material genetic) va prezenta fluorescență albastră, pe când țesutul decelularizat nu va emite niciun semnal (câmp negru).

Colorația histologică DAPI pentru probele de țesut moale

Probele de țesut au fost fixate cu ajutorul sol. Paraformaldehidă 4 % peste noapte. Probele de țesut fixat și congelate, au fost secționare folosind un Microtome HM 560 Criostat, în secțiuni de 5 μm și plasate pe lame peste noapte la -80°C . Ulterior, acestea au fost fixate în acetonă la -20°C timp de 8 min. Secțiunile au fost încercuite folosind carioca (Dako Pix), după care a urmat spălarea secțiunilor de 3 ori timp de 5 min fiecare într-o cuvă de sticlă care conține PBS, după care au fost incubate timp de 15 min cu DAPI (0.33 $\mu\text{g}/\text{ml}$ în PBS). La final, secțiunile au fost spălate de 3 ori timp de 5 min fiecare în PBS și acoperite cu lamele de protecție folosind montura fluorescentă Shandon Immumount mediu. Probele colorate au fost analizate cu microscopul fluorescent Axio Observer A1.

Colorația histologică DAPI pentru probele de țesut dur

Probele de țesut osos (țesut nativ vs procesat) au fost inițial fixate cu ajutorul sol. Paraformaldehidă de 4 % la temperatura camerei pentru 2 zile. După fixare, probele au fost supuse procesului de decalcifiere, timp de 1 lună, cu ajutorul soluției pentru decalcifiere (Decalcifier soft, Solvagreen®) și agitatorului magnetic (RCTbasic, IKA LABORTECHNIK). Probele decalcifiate și congelate au fost secționare folosind un Microtome HM 560 Cryostat, în secțiuni de 5 μm și plasate pe lame peste noapte la -80°C . Ulterior, pașii au coincis cu cei pentru colorarea țesutului moale.

2.7 Cuantificarea ADN-ului

Testul de cuantificare a ADN-ului a fost utilizat în acest studiu pentru evaluarea cantitativă a materialului genetic rămas în grefa osoasă decelularizată. Această analiză a permis determinarea gradului de decelularizare a grefei prin măsurarea conținutului de ADN rezidual comparativ cu țesutul nativ. Această evaluare cantitativă este importantă pentru asigurarea calității decelularizării și pentru prezicerea compatibilității grefelor decelularizate pentru aplicațiile ulterioare *in vivo*.

Pentru grefele osoase vascularizate, cuantificarea ADN-ului a fost efectuată separat pentru segmentele de os cortical și spongios. Segmente de os nativ spongios și cortical, prelevate de la aceeași grefă, până la începerea procesului de prelucrare au fost folosite ca probă de control.

Probele de os nativ și cele de os procesat/decelularizat au fost înghețate cu ajutorul azotului lichid și măcinate utilizând un dispozitiv de măcinare tip sonicator. Praful osos a fost ulterior liofilizat. Praful de os cortical și spongios a fost liofilizat timp de 22-23 h la 0.018 mbar (Alpha 1-2 LD plus), după care a fost cântărit între 2-10 mg și transferat în tuburi de reacție cu blocare sigură a câte 1.5 ml fiecare (figura 15). Fiecare probă a fost testată în triplicate tehnice.

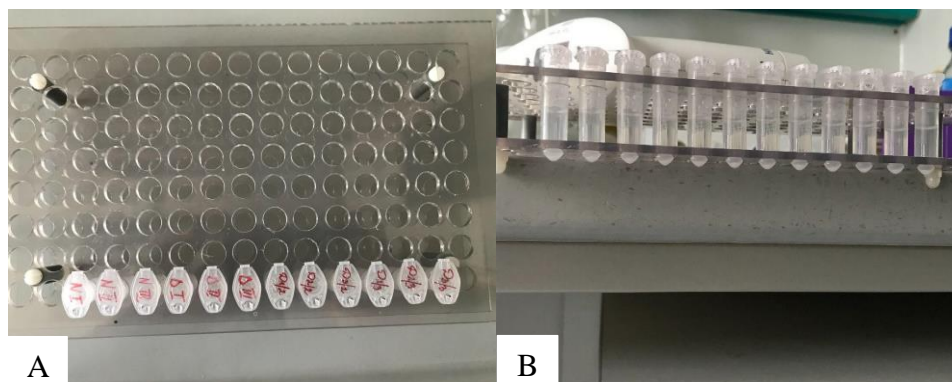


Figura 15. **ADN cuantificarea.** (A, B) repartizarea probelor liofilizate în tuburi de reacție cu blocare sigură, a câte 1.5 ml fiecare

La fiecare tub s-a adăugat 200 μ l de apă sterilă, după care probele au fost fierte timp de 10 min. Probele au fost lăsate să se răcească la temperatura camerei, după care în fiecare tub a fost adăugat 790 μ l de 10 mM Tri (pH = 7.5) și 10 μ l de proteinază K (20 mg/ml în glicerol 40 %, activitate = 850.85 mAnsonU/ml). După aceasta, probele au fost lăsate peste noapte într-un termomixer compact (Eppendorf®) la 60°C și 1000 rpm, pentru a digera țesutul. Probele digerate au fost tratate conform metodei de cuantificare după cum urmează:

1. s-a mixat 100 μ l de probă digerată + 900 μ l sol tampon de diluție a ADN;
2. s-a pregătit sol tampon ADN de diluție în sol. tampon martor ADN, începând cu 20 μ g/ml ADN din spermă de somon;
3. s-a plasat câte 100 μ l de sol. standard și sol. probă în fiecare godeu al unei plăci cu 96 godeuri;
4. am adăugat 100 μ l de Hoechst 33258 soluție (1 μ g/ml în 200 mM NaCl, 10 mM TRIS, pH = 7.5) la fiecare proba în placa cu 96 de godeuri;
5. am măsurăm intensitatea fluorescenței la 465 nm cu o lungime de undă de excitație = 360 nm;

Toate soluțiile, componentele și standardele utilizate în testul de ADN cunțificare sunt enumerate în tabelul 5. Valorile de cuantificare au fost interpolate cu ajutorul curbei standard

(figura 16) și normalizate la greutatea lor uscată. Interpretarea datelor după cantitatea procentuală de descreștere s-a realizat după formula: $\% \text{ descreșterii} = \frac{\text{Proba 1} - \text{Proba 2}}{\text{Proba 1}} \times 100$

Analiza statistică a rezultatelor colectate s-a efectuat cu ajutorul programului Excel din Microsoft Office versiunea 2017. Cu ajutorul aceluiași program, variabilele continue au fost exprimate ca medie \pm DS. Prelucrarea statistică a fost efectuată cu ajutorul programului SPSS (versiunea 17.0). Compararea și aprecierea diferențelor statistice semnificative între valorile medii ale parametrilor evaluați s-a efectuat cu ajutorul testului parametric independent t-Test. Interpretarea valorilor p s-a făcut astfel: $p \leq 0.05$, legătura statistică este semnificativă (S, intervalul de încredere 95 %), $p < 0.01$, legătura statistică este semnificativă (S, intervalul de încredere 95 %), $p < 0.001$, legătura statistică este înalt semnificativă (HS, intervalul de încredere 99.9 %), $p > 0.05$, legătura statistică este nesemnificativă (NS).

Tabelul 5. ADN cuantificarea. Soluțiile, componentele și standardele utilizate

Standardul utilizat	Sperma de somon
Diluant	soluție DNA tampon, începând cu 20 $\mu\text{g/ml}$
Soluție tampon pentru diluția ADN	200 mM NaCl 10 mM TRIS 20 μl of 0.5 % SDS 880 μl of 200 mM NaCl/10 mM TRIS
Soluție tampon martor ADN	200 mM NaCl 10 mM TRIS 40 mM Glycine 0.01 % SDS

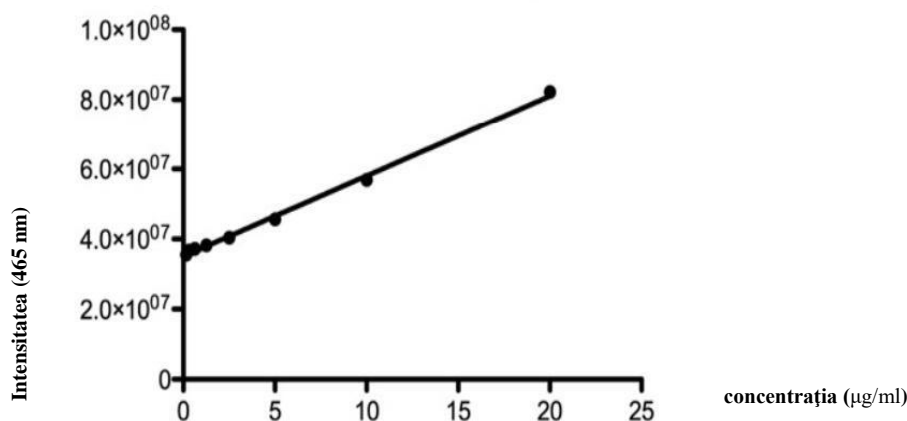


Figura 16. Curba standard pentru cuantificarea ADN-ului. Curba realizată dintr-o concentrație cunoscută a spermei de somon (concentrație inițială = 20 $\mu\text{g/ml}$) diluată în raport 1:1 cu soluție ADN tampon martor [84]

2.8 Microscopia prin scanare electronică

Microscopia prin scanare electronică (SEM) am utilizat-o în acest experiment pentru a examina structura osului nativ și după procesul de decelularizare. Această tehnică a oferit o vedere detaliată a suprafeței osului la nivel microstructural, permițând evaluarea modificărilor induse de decelularizare. Prin SEM, se pot observa detaliile fine ale matricei extracelulare a osului, inclusiv fibrilele de colagen și alte componente structurale. Procesul de decelularizare ar trebui să îndepărteze celulele osului, permițând vizualizarea matricei extracelulare rămase și a modificărilor structurale care ar putea să apară în timpul acestui proces. SEM poate fi util pentru a evalua gradul de traumatizare a matricei extracelulare. Segmentele de os cortical și spongios, nativ și decelularizat, cu dimensiuni de aproximativ 0.5 x 0.5 cm au fost tăiate și prelucrate după cum urmează. Probele tăiate, au fost plasate într-un tub Falcon de 50 ml în care s-a turnat 5 ml de glutaraldehidă 2.5 %. Probele, au fost păstrate pentru 24 h, la temperatura camerei în această soluție, după care, soluția a fost înlocuită cu 5 ml de natrium cacodilat 0.1 M. Soluția a fost îndepărtată din tubul Falcon și înlocuită cu acetonă 30 % timp de 10 minute, 50 % acetonă timp de 10 minute, 70 % acetonă timp de 10 minute, 90 % acetonă timp de 10 minute și 100% acetonă pentru alte 10 min. Toate soluțiile au fost diluate cu apă. După aceasta, probele de os cortical și spongios (nativ și decelularizat) au fost mutate într-un suport de probă și plasate în dispozitiv de uscare cu punct critic. După uscare, probele au fost împrășcate cu particule de aur și vizualizate în ziua următoare pe microscopul electronic de scanare.

Probele, au fost pregătite și vizualizate de către personalul autorizat, din cadrul Institutului de Scanare Microscopică a Universității de Medicină, Hannover, Germania.

2.9 Testul de biocompatibilitate *in vitro*

Biocompatibilitatea MEC vasculare, decelularizate

Testul de biocompatibilitate a matricelor extracelulare vasculare a fost efectuat cu ajutorul celulelor endoteliale umane ombilicale (HUVEC). Celulele HUVEC utilizate în acest studiu au fost transpuse prin transducție lentivirală cu o proteină ce exprimă fluorescență verde (GFP), crioconservate și păstrate la - 80°C. Un flacon de GFP-HUVEC congelate a fost dezghețat.

Pentru a testa biocompatibilitatea MEC vasculară naturală de origine porcină (dcelularizată și depozitată la 4°C în PBS), aceasta a fost preparată prin tăierea longitudinală, deschiderea și plasarea într-o placă de culturi celulare cu 12 godeuri, cu partea luminală în exterior. Vasul a fost imobilizat cu ajutorul inelelor metalice (0.5 cm diametru interior) și au fost incubate (preconđionate) timp de 72 h în mediu EGM-2 + serum fetal de bovină la temperatura de 37°C.

Din intenția de a simplifica procesul de însămânțare celulară, prin scurtarea perioadei de preconđionare, alte două MEC vasculare au fost incubate pentru o perioadă de 24 h vs 72 h cu respectarea ulterioară a tuturor pașilor descriși ulterior.

1 ml de mediu celular EGM-2 (Endothelial growth medium (EGM-2) Lonza, Basel, Switzerland) a fost folosit pentru a dilua celulele și a le muta într-un tub de reacție de 50 ml. Am continuat cu adăugarea altor 8 ml de EGM-2. Tubul cu soluție a fost centrifugată la 300 x g timp de 5 min. Lichidul supernatant a fost substituit cu 20 ml de mediu EGM-2. Suspensia celulară a fost mutată într-un flacon de cultură celulară T175 și incubată la 37°C. La a 3-a zi de incubare, celulele GFP-HUVEC au fost detașate din flaconul de culturi celulare prin clătirea lor cu PBS și incubate timp de 2 min la 37 °C cu 10 ml de sol celulară pe bază de enzime recombinare (TrypleE Select (Gibco™). La 2 min de incubare, s-au adăugat 10 ml de mediu EGM-2 pentru a dilua soluția de celule TrypleE Select. Celulele au fost centrifugate timp de 5 minute la 300 x g, lichidul supernatant a fost aruncat, iar peletul celular a fost diluat în 3 ml de EGM-2. 250 μl de suspensie celulară au fost amestecați cu 250 μl de PBS și numărul de celule a fost determinat cu ajutorul dispozitivului Vi-cell™XR Cell Viability Analyzer.

Numărul de celule însămânțate a fost aproximativ egal cu 8x10 mil celule/ml. Imaginile microscopice pentru monitorizarea celulară au fost făcute la fiecare 2 zile cu ajutorul stereomicroscopului Discover V8.

Biocompatibilitate MEC osoase avasculare decelularizate

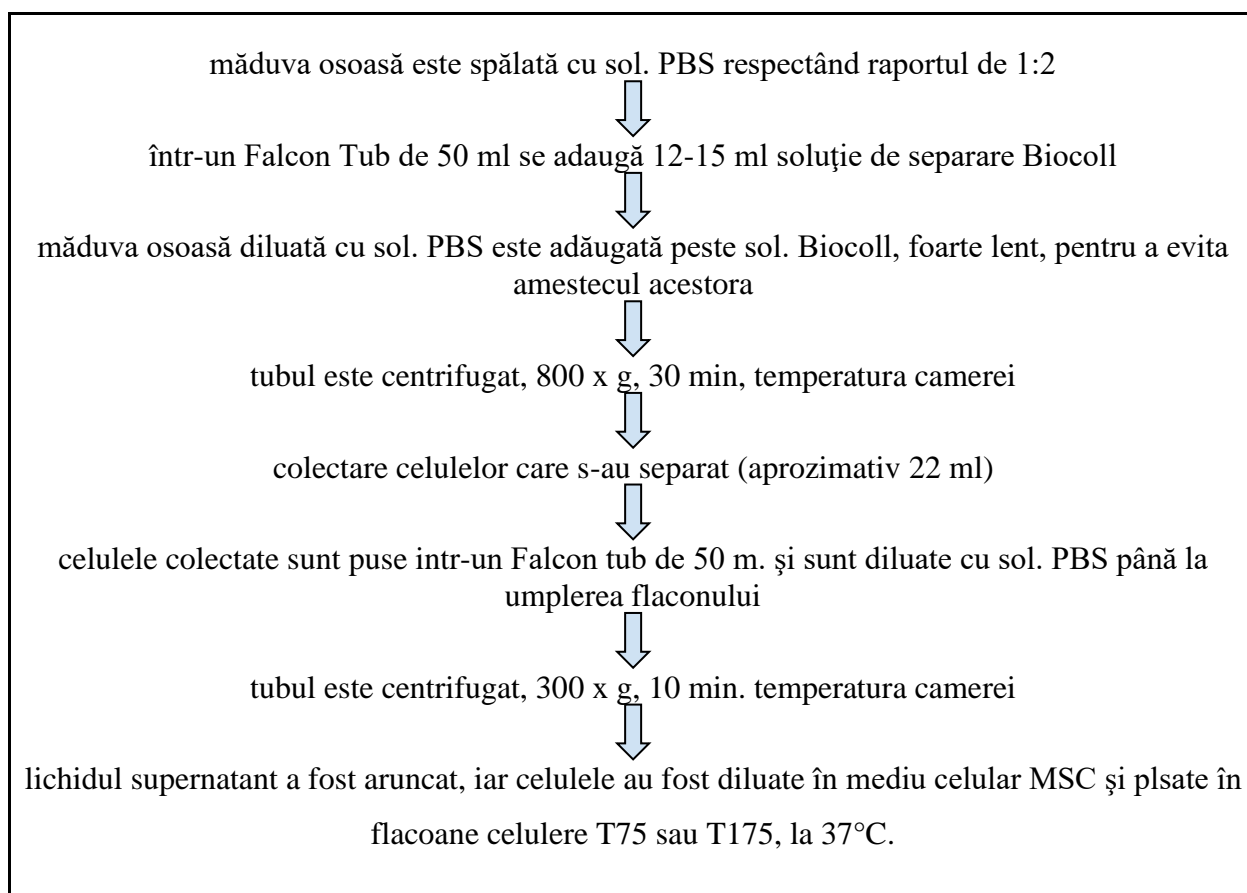
Testul de biocompatibilitate a matricei extracelulare osoase, a fost efectuat cu ajutorul celulelor mezenchimale stem din măduva osoasă de origine porcină (BM-MSC).

Celulele mezenchimale stem alogene, au fost izolate din măduva osoasă colectată de la nivelul osului stern de origine porcină și izolate după protocolul de izolare (tabelul 6).

După izolare, culturile celulare au fost păstrate în mediu celular specific în flacoane celulare T75 la 37°C cu schimbarea mediului celular la fiecare 3 zile până la atingere confluenței de 95%. Mediului celular a avut următoare componență (pentru 500 ml):

- ✓ Earle mediu 199 (PAA: număr de catalog E15-003);
- ✓ Mediul de cultură celulară suplimentat cu ser fetal de vițel (FCS) 10%;
- ✓ Penicilină/Streptomicină 1%;
- ✓ L-Glutamin 1% (Gibco: numărul de catalog 25030);
- ✓ Acid ascorbic 25 mg;
- ✓ Factorul de creștere a fibroblastelor umane de bază recombinant (rh-bFGF, Immuno Tools: numărul de catalog 11343625, 50 μg) se adaugă 10 ng/ml.

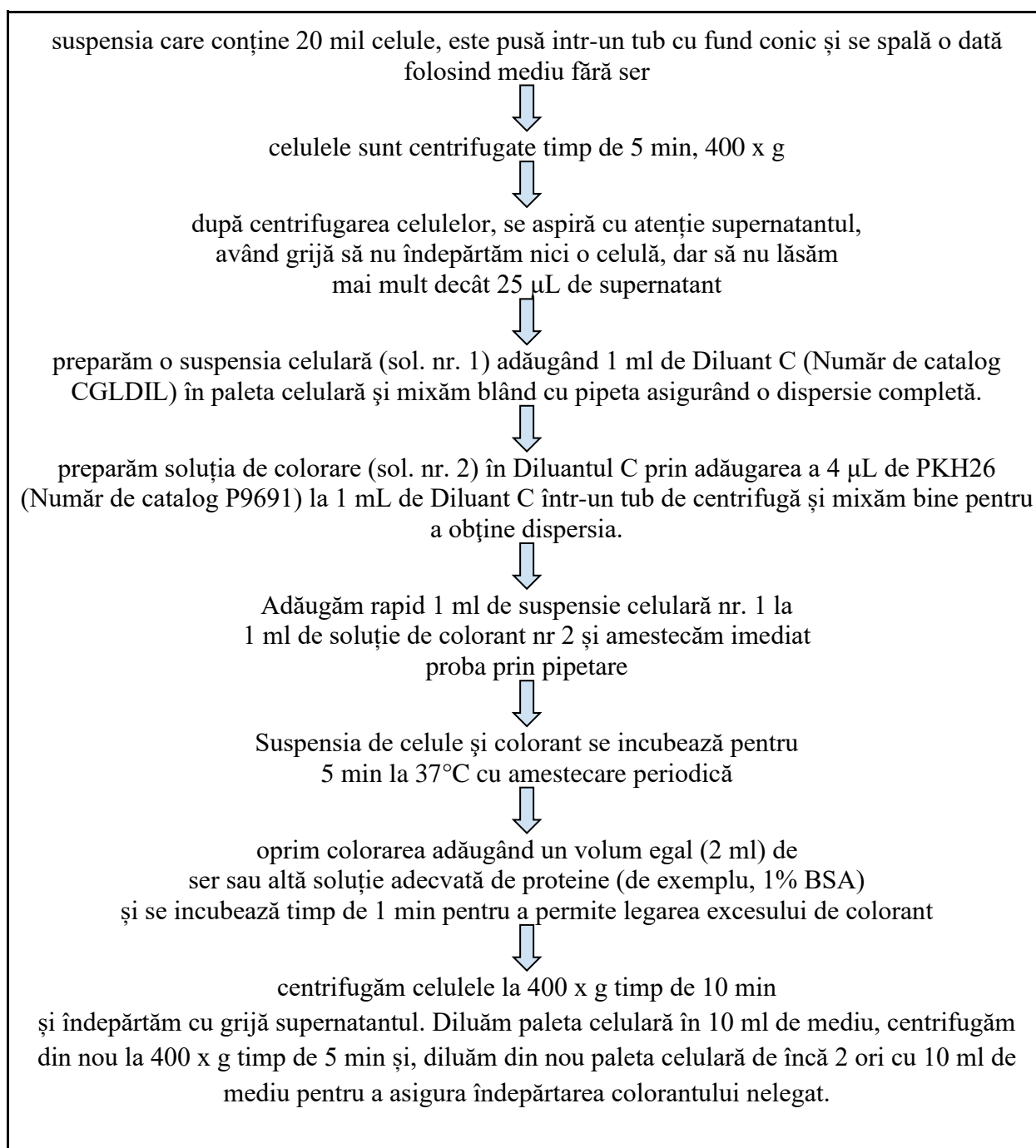
Tabelul 6. Protocolul de izolare a celulelor stem mezenchimale din măduva osoasă



Mediul celular, a fost schimbat la fiecare a 5-a zi. La a 6-a zi, celulele au fost divizate, din flaconul de culturi celulare T75 prin clătirea lor cu PBS și incubate timp de 2 min la 37°C cu 10 ml de sol celulară pe bază de enzime recombinante (TrypleE Select (Gibco™)). La 2 min de incubare, s-au adăugat 10 ml de mediu MSC pentru a dilua soluția de celule TrypleE Select și celulele au fost mutate într-un tub de culturi celulare de 15 ml. Celulele au fost centrifugate timp de 5 min la 1200 rpm, lichidul supernatant a fost aruncat, iar peletul celular a fost diluat în 7 ml de mediu MSC, după care, 1 ml din suspensia celulară a fost transferată într-un flacon celular T175 la care s-a adăugat alte 9 ml mediu celular MSC. A 2-a zi de la separarea celulelor (la al 2-a pasaj celular) $\frac{1}{4}$ din cultura celulară a flaconul T174 a fost transferat în flacon pentru medii celulare T74, iar $\frac{3}{4}$ din cultura celulară rămasă, a fost congelată în ser bovin fetal (FBS) + Dimetilsulfoxid 10% (DMSO) și depozitat la -80°C.

La al 2-a pasaj, celulele au fost marcate utilizând setul PKH26 Roșu pentru etichetarea fluorescentă a membranei celulare (tabelul 7).

Tabelul 7. **Protocolul pentru colorare PKH26 Roșu.** Soluția de colorant etanolic PKH26 (Nr. Cat. P9691)



La a 3-a zi de la etichetarea, celulele au fost detașate din flaconul de culturi celulare prin clătirea lor cu PBS și incubate timp de 2 min. la 37°C cu 10 ml de sol. celulară pe bază de enzime recombinante (TrypleE Select (Gibco™)). La 2 min de incubare, s-au adăugat 10 ml de mediu MSC pentru a dilua soluția de celule TrypleE Select și celulele au fost mutate într-un tub de 50 ml. Celulele au fost centrifugate timp de 5 min la 1200 rpm, lichidul supernatant a fost aruncat, iar peletul celular a fost diluat în 3 ml de mediu MSC. 250 μL de suspensie celulară au fost amestecați cu 250 μl de PBS și numărul de celule a fost determinat cu ajutorul dispozitivului Vi-cell™ MXR Cell Viability Analyzer. Numărul de celule însămânțate a fost egal cu 1 mil celule/ml.

PKH26 este un colorant fluorescent utilizat pentru marcarea și urmărirea celulelor în diferite aplicații, inclusiv în studiile privind celulele stem mezenchimale din măduva osoasă. Acest colorant are capacitatea de a penetra membrana celulară și de a se integra în fosfolipidele acesteia, dând astfel posibilitatea de a colora în mod eficient membranele celulare. Odată ce este introdus în membrana celulară, PKH26 se distribuie în mod uniform în toată membrana, permițând urmărirea și identificarea celulelor marcate. Utilizarea PKH26 în acest studiu a permis urmărirea celulelor marcate în interiorul MEC osoase avasculare precum și în interiorul MECOv.

Pe tot parcursul testului de biocompatibilitate (6 zile), greua osoasă a fost ținută în incubator, la 37°C. Mediul celular a fost schimbat la a 3-a zi.

Pentru a testa biocompatibilitatea, matricea extracelulară osoasă (decelularizată și depozitată la 4°C în PBS) a fost plasată în placă de culturi celulare cu 6 godeuri. MEC osoasă avasculară a fost condiționată timp de 72h în mediu MSC (mediu celular pentru celule mezenchimale stem din măduva osoasă) la temperatura de 37°C (figura 17).

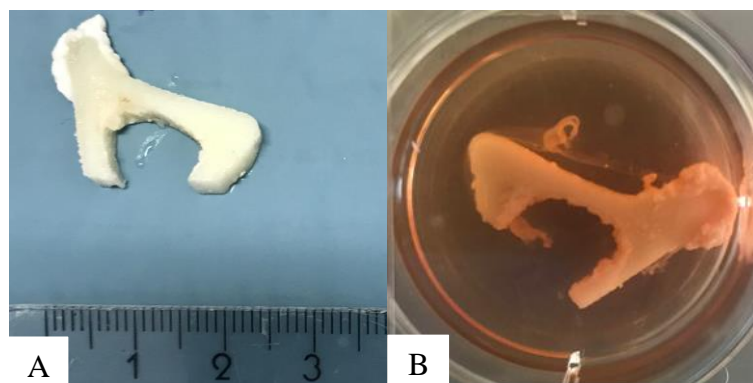


Figura 17. MEC osoasă avasculară. Testul de biocompatibilitate.

(A) aspectul macroscopic a MEC osoase, (B) condiționarea MEC în mediu celular specific

Celulele native mezenchimale stem precum și cele etichetate au fost examinate și fotografiate (până la însămânțare) cu ajutorul microscopului fluorescent Axio Observer A1 (figura 18). Verificarea celulelor, după însămânțare precum și imaginile, au fost făcute la fiecare 2 zile cu ajutorul stereomicroscopului Discover V8.

Așa cum MEC osoasă avasculară avea o lungime de aproximativ 2 cm, a fost important testarea biocompatibilității întregii suprafețe. Din aceste considerente celulele au fost însămânțate în 3 puncte diferite (P1, P2, P3), respectiv urmărirea creșterii celulare a avut loc în fiecare punct separat.

Una din caracteristicile colorantului PKH26 Red, este scăderea impulsului în timpul multiplicării celulare. Scăderea este determinată de diluarea progresivă a acestuia în timpul diviziunii celulare succesive. Această diluare poate afecta vizibilitatea și precizia urmăririi celulelor pe parcursul multiplicării. Astfel, la ziua a 6-a de la însămânțare, s-a efectuat

colorația suplimentară a celulelor cu soluție Calcein pentru aprecierea exactă a numărului total de celule viabile.

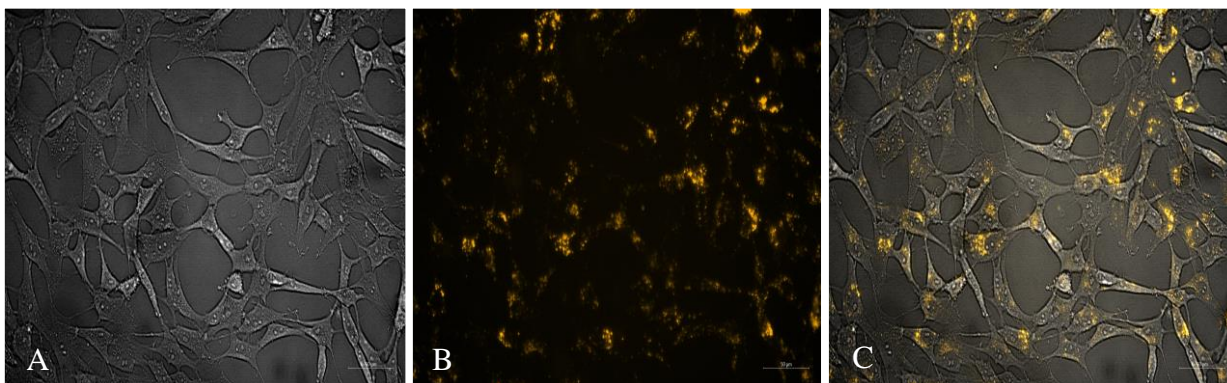
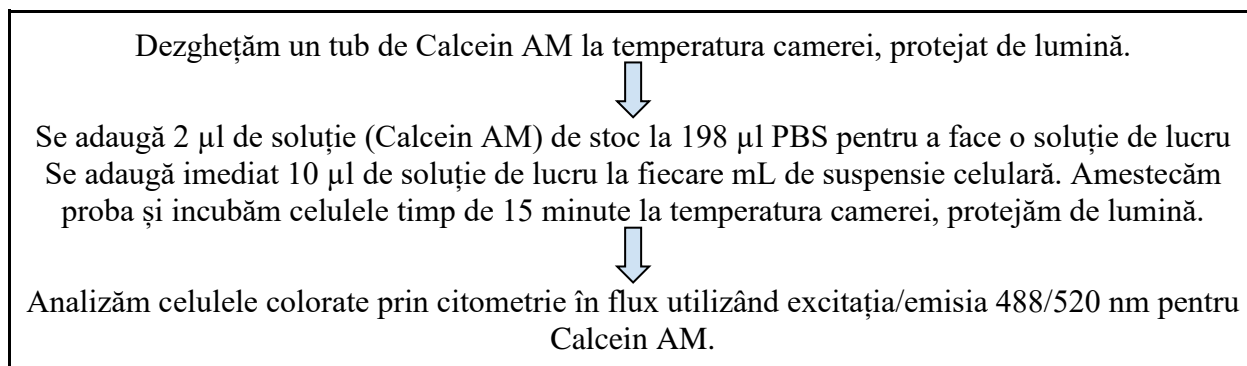


Figura 18. **Celule stem primare (BM MSC). Colorația PKH26.** (A) imaginea celulelor obținute în câmpul luminos, (B) imaginea celulelor obținute în spectrul de absorbție și emisie ale fluorescenței Cy3 (oferă un auriu strălucitor), (C) imaginea celulelor obținute în câmpurile suprapuse (luminos + Cy3). Scala. A, B, C: 50 μ m

Colorația cu calcein (tabelul 8) este utilă pentru evaluarea viabilității celulare și monitorizarea celulară în timp real. Această colorare a fost utilizată în studiu dat pentru a evalua viabilitatea celulelor și pentru a face distincția între numărul celulelor vii și cele moarte (calceinul nu poate pătrunde în membranele celulare compromise și nu poate fi hidrolizat în interiorul acestora). Astfel, celulele viabile emit fluorescență verde intensă și pot fi ușor vizualizate la microscopul fluorescent. Această examinare poate fi utilă și la determinarea gradului de toxicitate a unei MEC.

Tabelul 8. **Protocolul pentru colorarea Calcein AM**



Testul de biocompatibilitate pentru MECOv

Un flacon de celule mezenchimale stem din măduva osoasă, congelat anterior (la colectarea primară a celulelor) a fost dezghețat. Pentru aceasta, 1 ml de mediu celular specific MSC mediu, a fost utilizat pentru a dilua celulele și a le muta într-un tub de reacție de 50 ml. Am continuat cu adăugarea altor 8 ml de MSC mediu, tubul cu soluție a fost centrifugat la 1200 rpm timp de 5 min. Lichidul supernatant a fost aruncat iar cu ajutorul altor 20 ml de mediu s-a solubilizat paleta

celulară. Suspensia celulară a fost mutată într-un flacon de cultură celulară T175 și incubată la 37°C.

Mediul celular a fost schimbat la a 3-a zi. La a 4-a zi s-a efectuat etichetarea celulară cu ajutorul PKH26 Roșu (tabelul 7). La a 3-a zi de la etichetarea celulelor, acestea au fost însămânțate la nivelul grefei osoase compozite vascularizate. Numărul de celule a fost determinat cu ajutorul dispozitivului Vi-cellTMXR Cell Viability Analyzer. Numărul de celule însămânțate a fost egal cu 2 mil celule/ml. Celulele stem au fost examinate și fotografiate (cu ajutorul microscopului fluorescent Axio Observer A1) până la colorația cu PKH26 și după (figura 19 și figura 20).

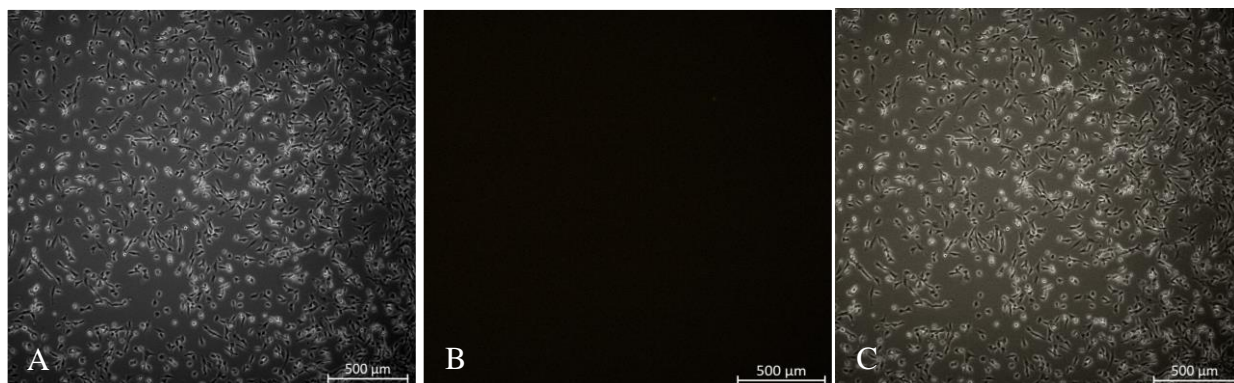


Figura 19. **Celule stem native din măduva osoasă.** (A) câmpul luminos, (B) câmpul Cy3, (C) câmpurile suprapuse (luminos + Cy3). Scala. A, B, C: 500 μm

Lipsa semnalului fluorescent la examinarea celulelor în spectrul de absorbție și emisie ale fluorescenței Cy3 (figura 19B) denotă lipsa colorației celulare cu PKH26, la fel ca și imaginile la suprapunerea câmpurilor (figura 19C). Celulele colorate cu PKH26 emit la examinarea sub microscopul fluorescent semnalul celular care este înregistrat într-o culoare aurie (figura 20).

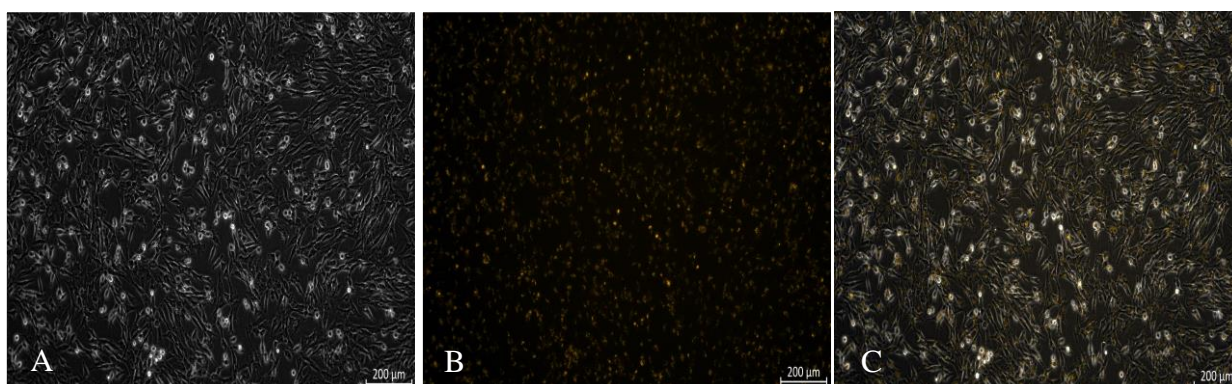


Figura 20. **BM MSC-PKH26. Examinarea microscopică.** (A) câmpul luminos, (B) câmpul Cy3, (C) câmpurile suprapuse (luminos + Cy3). Scala. A, B, C: 200 μm

Semnalul fluorescent al BM MSC-PKH26 (înregistrat într-o culoare aurie) poate fi ușor vizualizat după examinarea celulelor în câmpul Cy3 al microscopului fluorescent (figura 20B și figura 20C).

Pentru a face mai confortabilă însămânțarea celulelor pe suprafața MECOv (depozitată după decelularizare la 4°C în PBS), acesta a fost preparată prin tăierea unei margini osoase, în vederea obținerii unei suprafețe plate de aderare celulară (figura 21). Celulele stem marcate cu PKH26, au fost însămânțate pe suprafața plată a grefei (în 3 puncte diferite) precum și în interiorul pediculului vascular. În final, pe suprafața plată a grefei au fost însămânțate 3 ml de suspensie celulară, ceea ce a reprezentat 6 mil celule. În interiorul pediculului vascular, a mai fost injectat 1 ml soluție, adică 1 mil celule. Astfel, creșterea celulelor a fost monitorizată separat pentru fiecare punct de însămânțare: suprafața osoasă, periostul și suprafața externă a pediculului vascular. La ultima zi de urmărire, depiculul vascular a fost secționat, iar lumenul vasului a fost examinat la prezența celulelor.

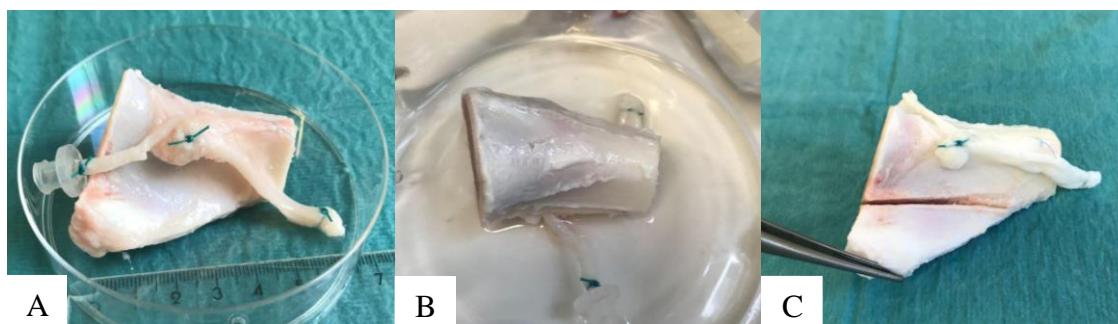


Figura 21. **MECOv. Aspect macroscopic.** (A) grefa osoasă nativă, (B) grefa osoasă decelularizată, (C) osteotomia laterală

Precondiționarea MECOv a avut loc după același protocol utilizat anterior. Grefa compozită vascularizată a fost plasată într-un vas de sticlă steril, incubată la 37°C în mediu specific MSC, pentru 72 h (figura 22).

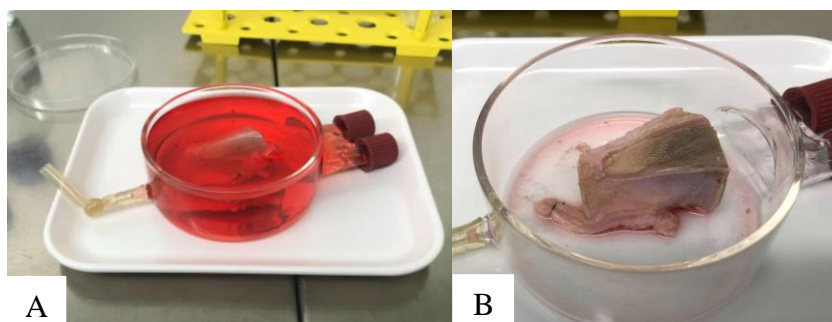


Figura 22. **Testul de biocompatibilitate. Precondiționarea MECOv.** (A) MECOv în mediu specific MSC, (B) MECOv la finalizarea testul de biocompatibilitate

Deoarece intensitatea fluorescenței la celulelor marcate cu PKH26 Roșu scade cu fiecare multiplicare celulară, la ziua a 6-a de la însămânțare s-a efectuat colorația celulelor cu soluție Calcein pentru aprecierea numărului exact de celulelor viabile. Colorația a fost efectuată și pentru celulele din interiorul pediculului vasului după secționarea acestuia. Grefa osoasă a fost păstrată în incubată la 37°C, timp de 6 zile, mediul fiind schimbat la a 3-a zi. Imaginile au fost făcute în fiecare zi, cu ajutorul stereomicroscopului Discover V8.

3. REZULTATELE STUDIULUI

3.1 Rezultatele testului de permeabilitate vasculară pentru grefa osoasă vascularizată

Această metodă de testare a funcționalității pediculului vascular a fost utilizată pentru a evalua perfuzia segmentului osos specific pediculului vascular într-un mediu controlat *in vitro*, ceea ce înseamnă că dimensiunile grefei osoase au fost ajustate în dependență de gradul de colorare în albatru a grefei. A fost păstrată zona colorată cel mai accentuat.

Deoarece vascularizarea osului tibial este asigurată din mai multe surse (artera tibială, periostul, rețeaua vasculară epifizară și metafizară), nu am așteptat o colorația completă a grefei în albastră. Monitorizarea atentă a perfuziei a permis observarea modului în care soluția perfuzantă pătrunde în interiorul osului. Astfel, la finisarea celor 24 ore de perfuzie, am determinat o colorare mai intensă în 1/3 proximală a grefei comparativ cu 1/3 distală, iar dimensiunile grefei osoase au fost ajustate de la 8 cm lungime la 5 cm lungime (figura 23). După osteotomie, în regiunea diafizei s-a observat o colorare palidă, neuniformă în albastru a corticalei osoase din interior (figura 23 E). Această colorare fină a marginii interne a sugerat pătrunderea colorantului în interiorul grefei, iar lipsa culorii albastre în măduva osoasă a indicat necesitatea înlăturării acesteia.

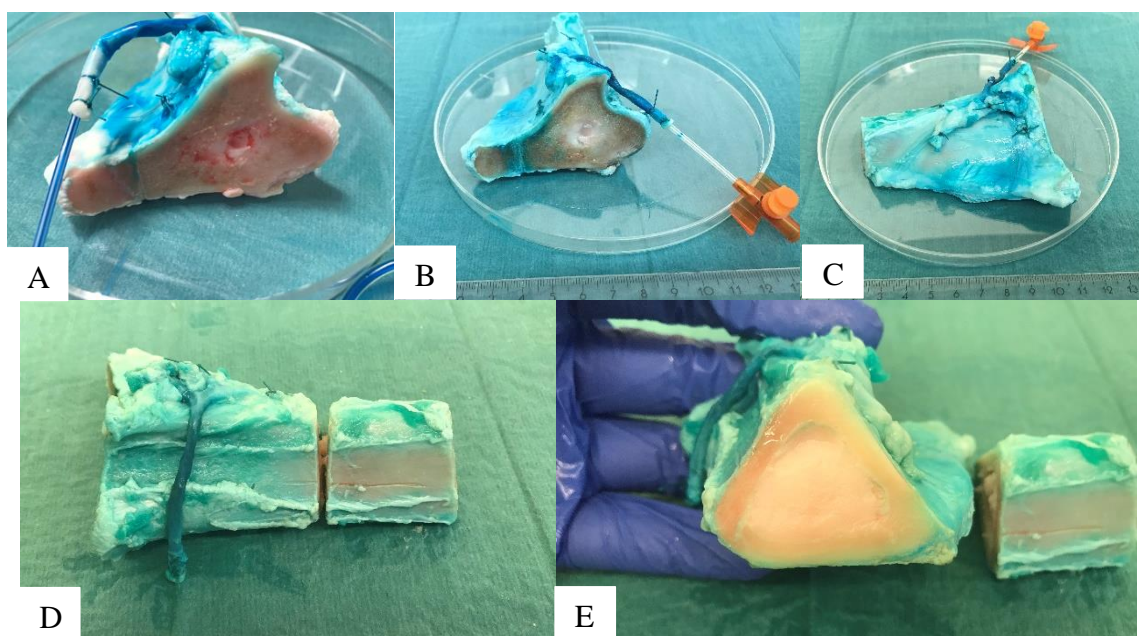


Figura 23. **Rezultatele testului de perfuzie arterială.** (A) prima oră de la perfuzia soluției pe bază de albastru de metilen, (B) colorația epifizei la 24 h de la perfuzie, (C) colorația periostului la 24 h de la perfuzare, (D) ajustarea dimensiunilor grefei prin osteotomia distală, (E) colorația diafizei grefei la 24 h de la perfuzare

3.2 Evaluarea calitativă a eficacității decelularizării pentru grefe cu divers grad de mineralizare

Protocolul de decelularizare a fost testat inițial pe 3 loturi de grefe vasculare, grefe cu diametru diferit.

N.B. În vederea eliminării confuziei ulterioare, întrucât majoritatea datelor din literatură utilizează termenul de „vase sanguine cu diametru mic” pentru arteriole, voi utiliza combinația de cuvinte „vas cu diametru mare” pentru artera carotidă, „vas cu diametru mediu” pentru artera femurală și „vas cu diametru mic” pentru artera tibială caudală. Consider această clasificare reală, deoarece în unele surse, clasificarea arterelor după diametru utilizează termenul de „vas de calibru mic” pentru vasele cu un diametru de la 0.3 mm până la 10 μm.

Din dorința simplificării protocolului ales, prima grefă vasculară a fost tratată până la etapa de DNază (ultima etapă de protocol, soluția enzimatică utilizată la degradarea ADN-ului). Această prelucrare a demonstrat o eficiență parțială, susținând mecanismul de acțiune al SDS-ului, care a solubilizat membrana celulară, facilitând distrugerea lipidică a acesteia, dar nu a avut o acțiune directă asupra degradării ADN-ului celular. Astfel, am determinat lipsa nucleilor celulari în grefa procesată la colorația H&E (figura 24C) dar prezența din abundență al ADN-ului la colorația DAPI (figura 24D).

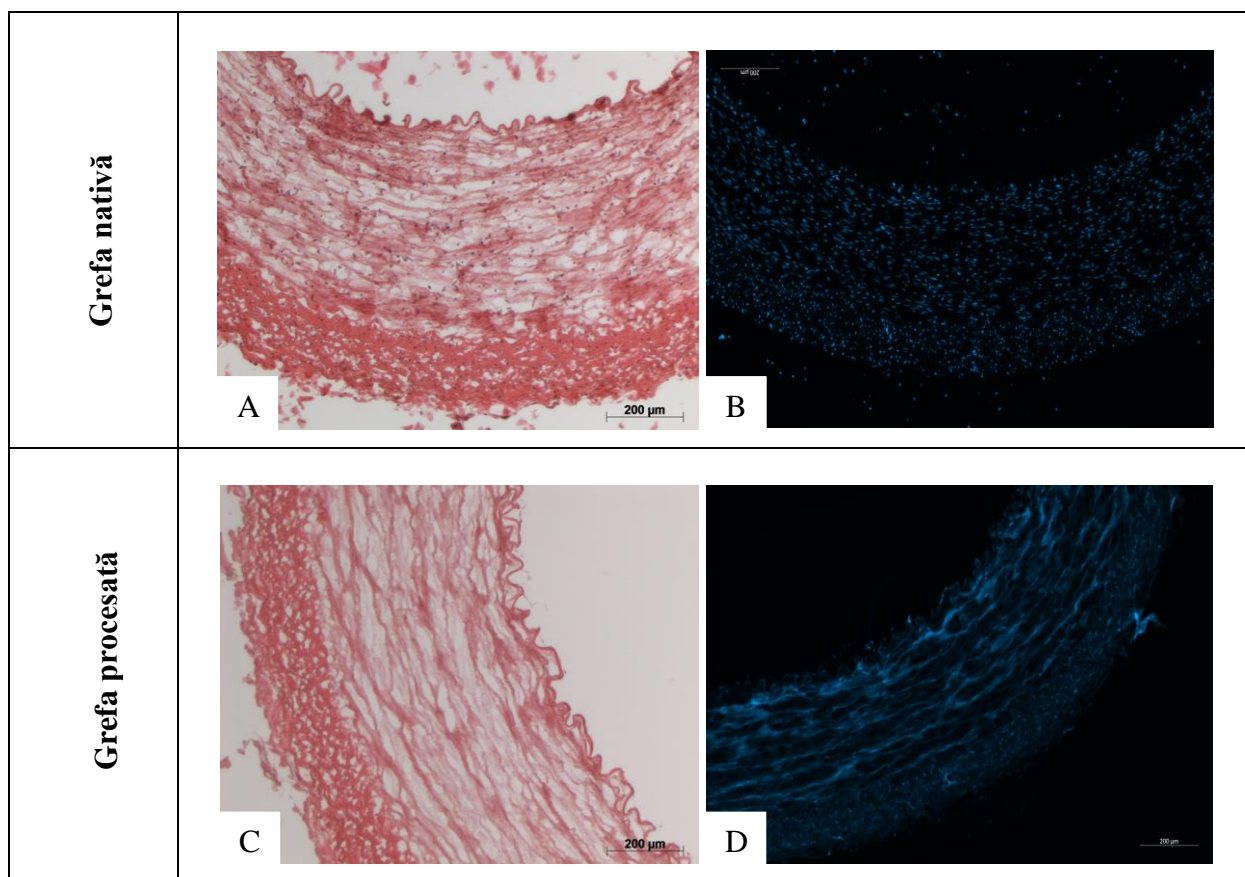


Figura 24. Grefa vasculară cu diametru mare (artera carotidă). Examinarea histologică calitativă. Colorația H&E (A, C) și colorația DAPI (B, D). Scala. A, B, C, D: 200 μm

Pentru a obține degradarea ADN-ului în grefele procesate, am continuat experimentul respectând toate etapele protocolului. Astfel, după prelucrarea cu DNază a grefelor vasculare, am

demonstrat eficacitatea decelularizării prin lipsa nucleilor celulari și a ADN-ului, evidențiată prin colorațiile H&E și DAPI pentru toate cele trei loturi de grefe:

1. grefele cu diametru mare (figura 25)

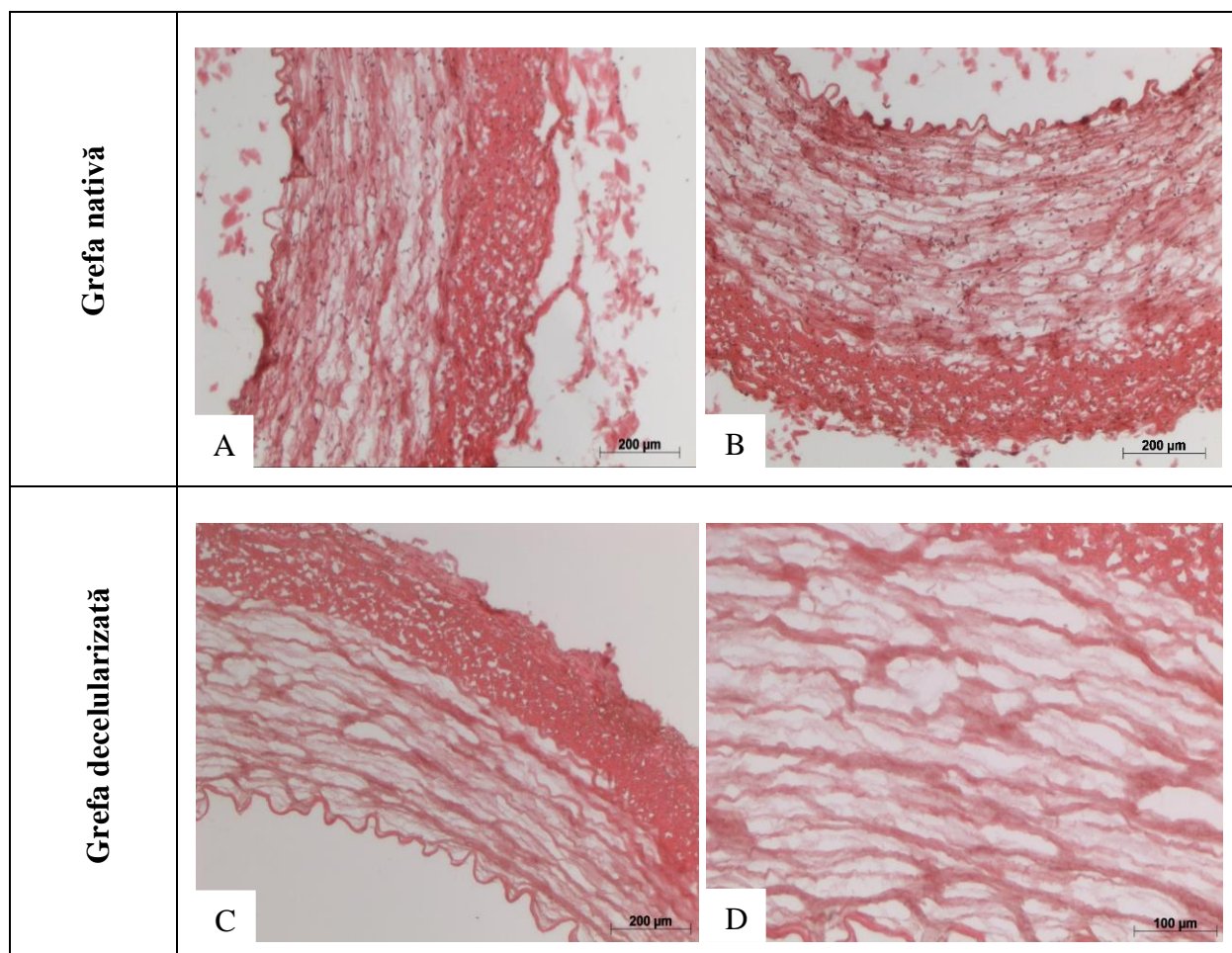


Figura 25. **Grefa vasculară decelularizată (artera carotidă). Colorația H&E.** Grefa nativă (A, B) și grefa decelularizată (C, D). Scala. A, B, C: 200 μm; D: 100 μm

Colorația cu H&E pentru grefa vasculară cu diametru mare, a reprezentat o MEC conservată, cu absența celulelor nucleate. Structura generală a peretelui arterial a fost păstrată indicând integritatea structurală pentru MEC a grefei.

Pastrarea structurii matricei după decelularizare efectivă a fost evidențiată de organizarea distinctă a fibrelor de colagen și elastină în secțiunile histologice. Această structură fibrilară conservată poate oferi suport și rezistență structurală esențiale pentru funcționarea adecvată precum și mediu corespunzător celulelor pentru o diferențiere specifică, endotelială.

2. Grefa cu diametru mediu (figura 26)

În cazul grefei de calibru mediu am obținut aceeași păstrare a structurii peretelui arterial, cu toate acestea nu s-a reușit păstrarea în totalitate a structurii MEC. Imaginile histologice au arătat o structură mai dezorganizată a fibrelor de colagen și elastină. Acest lucru poate indica o degradare a MEC în timpul procesării.

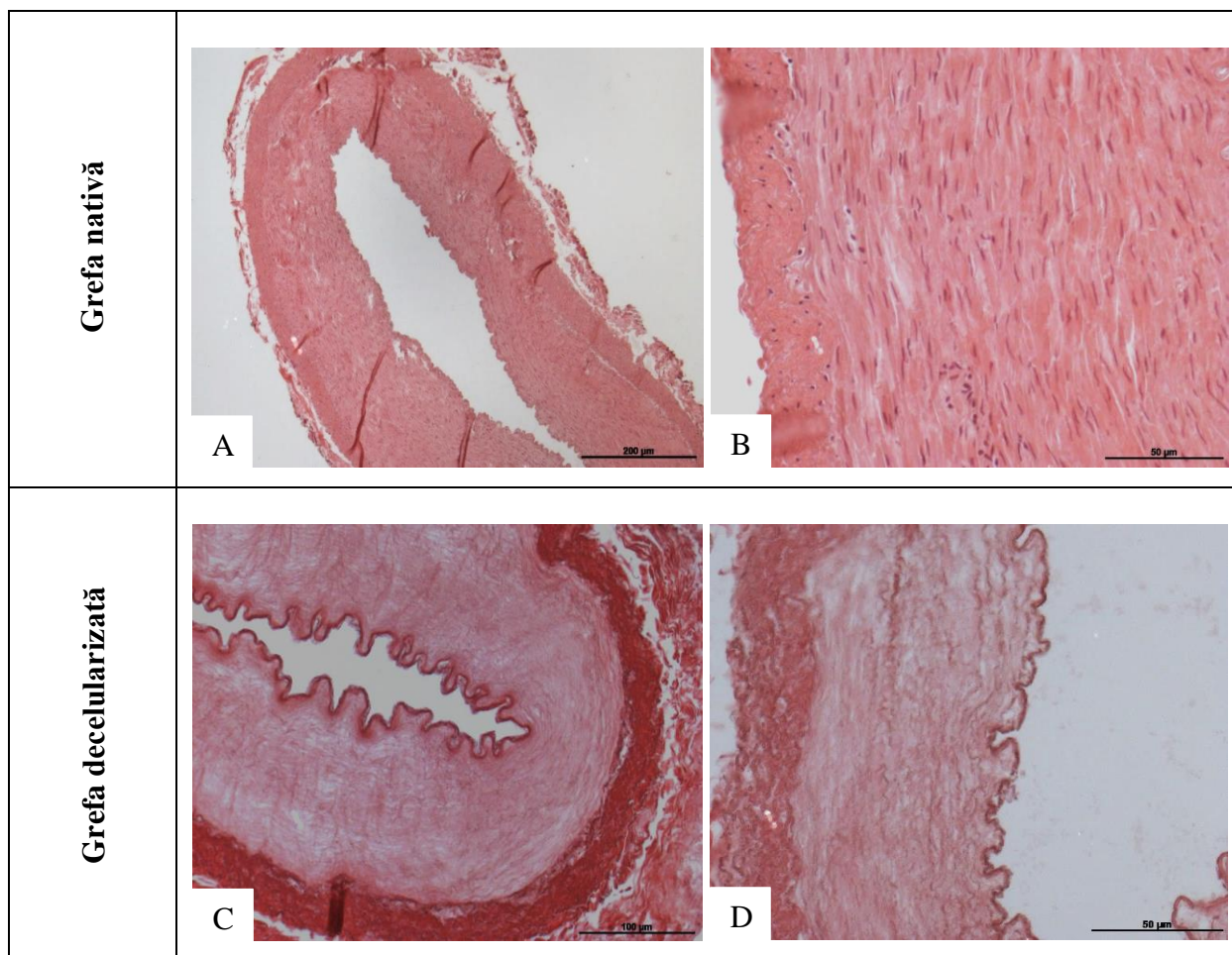


Figura 26. **Grefa vasculară decelularizată (artera femurală superficială). Colorația H&E.**
 Grefa nativă (A, B) și grefa decelularizată (C, D). Scala. A: 200 μm ; B: 50 μm ; C: 100 μm ;
 D: 50 μm

3. Grefa cu diametru mic (figura 27)

Imaginile histologice a grefelor de calibru mic arată un rezultat asemanator cu grefele de calibru mare: absența celulelor nucleate cu păstrarea în totalitate a structurii peretelui celular și structurii MEC.

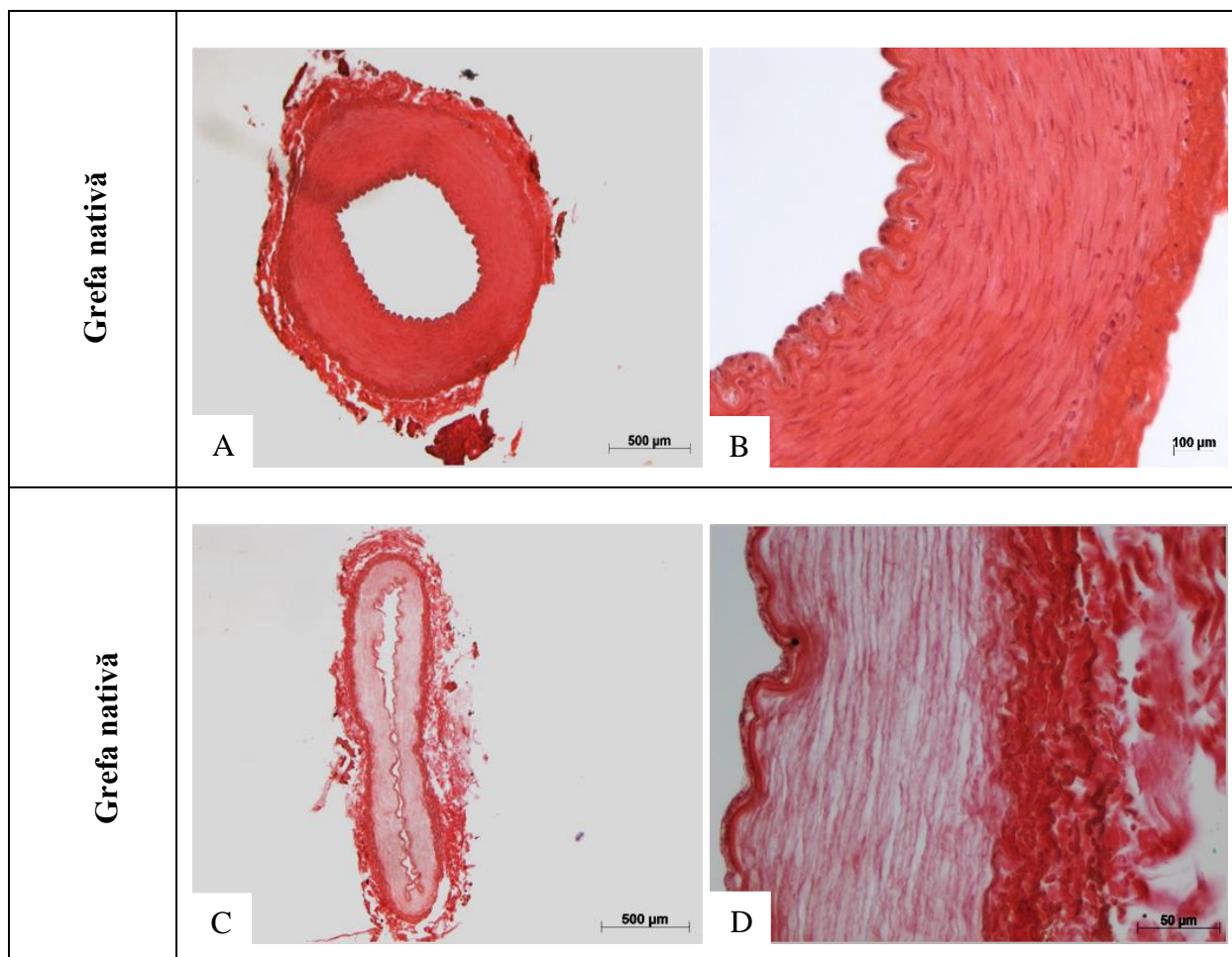


Figura 27. **Decelularizarea completă a grefei cu diametru mic. Colorația H&E.** (A, B) grefa nativă, (C, D) grefa decelularizată. Scala. A, C: 200 µm; B: 100 µm; D: 50 µm

Rezultatele obținute la colorația histologică H&E au fost încurajate și de cătră lipsa materialului de ADN la colorația DAPI, pentru toate grefele vasculare cu diametre diferite (anexa 1, anexa 2, anexa 3). Examinarea microscopică a probelor colorate DAPI, au fost efectuate în 3 câmpuri de lumini diferite (câmpul luminos, câmpul DAPI și într-un final, câmpurile au fost suprapuse). Astfel de reproducere sunt și în toate figurile cu examinarea dată, aceasta fiind util nu doar la examinarea prezenței/absenței de ADN, dar și structura propriu-zisă a matricei extracelulare vasculare.

Am continuat studiul experimental cu testarea eficacității protocolului pentru decelularizare grefelor osoase avasculare in complex cu periostul.

Întrucât țesutul osos reprezintă țesut dur, în vederea efectuării examinării histologice, a fost nevoie să efectuăm decalcifierea țesutului osos, atât pentru grefele native, cât și pentru cele decelularizate. Am continuat cu examinarea separată a probelor osoase corticale și spongioase.

La examinarea histologică a probelor osoase corticale și spongioase (H&E și DAPI), protocolul utilizat, s-a dovedit a fi eficient la etapa de eliminare a celulelor nucleate (osteocitelor) și ADN.

Examinarea probelor histologice pentru grefelor avasculare corticale (figura 28) denotă pentru grefele native prezența unei MEC dense, osteocite înglobate în lacune și sisteme osteone. Pe de altă parte, osul decelularizat prezintă o păstrare a MEC intactă dar fără celule nucleate în interiorul lacunelor osoase.

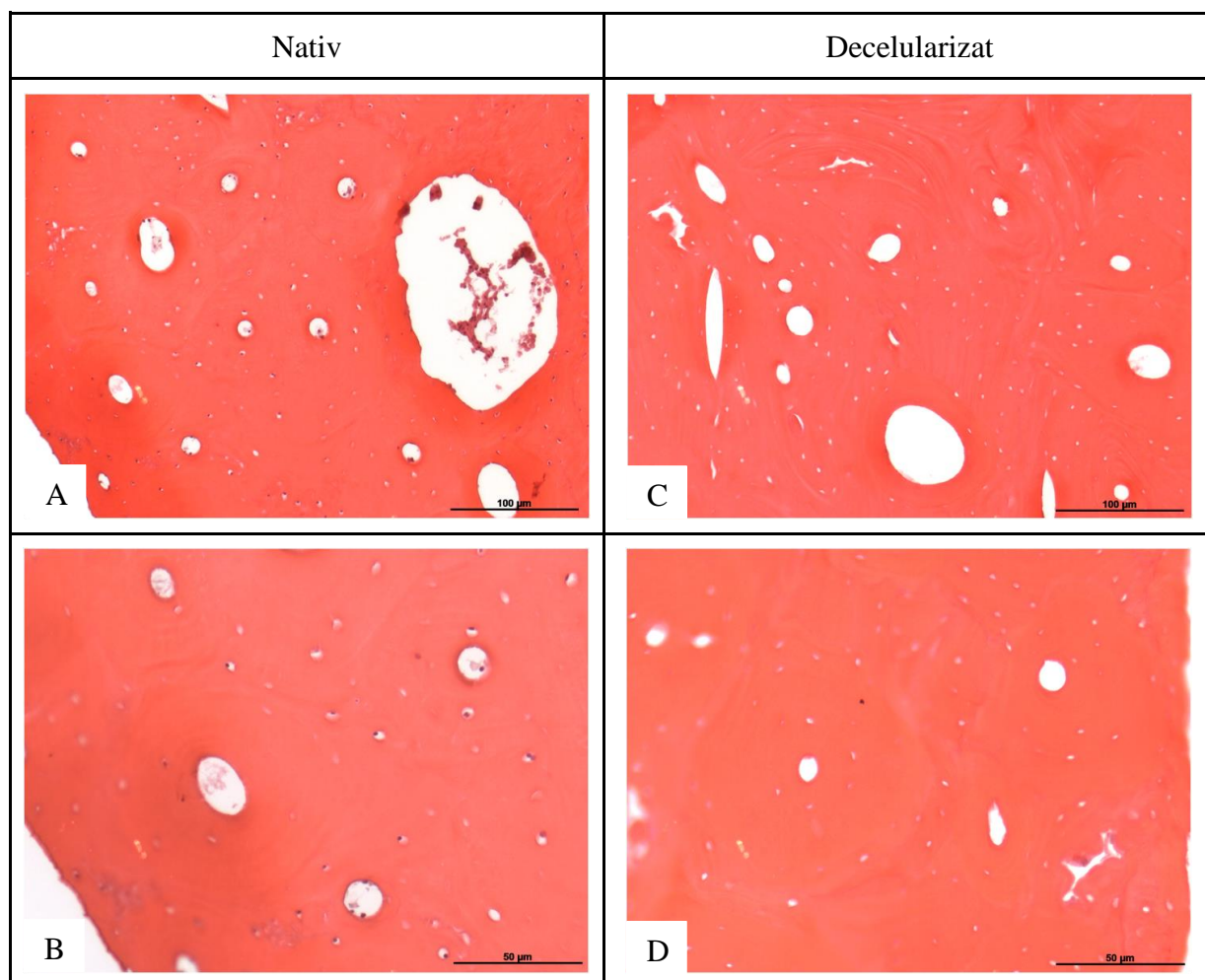


Figura 28. **Grefa osoasă avasculară corticală. Colorația H&E.** Grefa nativă (A, B) și grefa decelularizată (C, D). Scala. A, C: 100 μm; B, D: 50 μm;

Diferențele în densitatea și organizarea între osul spongios și osul cortical contribuie la stabilitatea diferită a acestora în timpul secționării pentru histologie. Osul spongios, cu o structură mai poroasă, este mai susceptibil la deteriorare în comparație cu osul cortical, care are o structură compactă și mai densă. În imaginile histologice a grefei osoase spongioasă (figura 29), observăm mici deteriorări a zonelor mai poroase, aceasta se poate explica prin specificul secționărilor subțiri de 5 μm. Cu toate acestea, această deteriorare a fost observată mai mult probelor native și nu a reprezentat o piedică în interpretarea imaginilor histologice.

Astfel, am determinat o MEC bine păstrată după decelularizare, lipsa nucleilor celulari și structuri de collagen bine organizate.

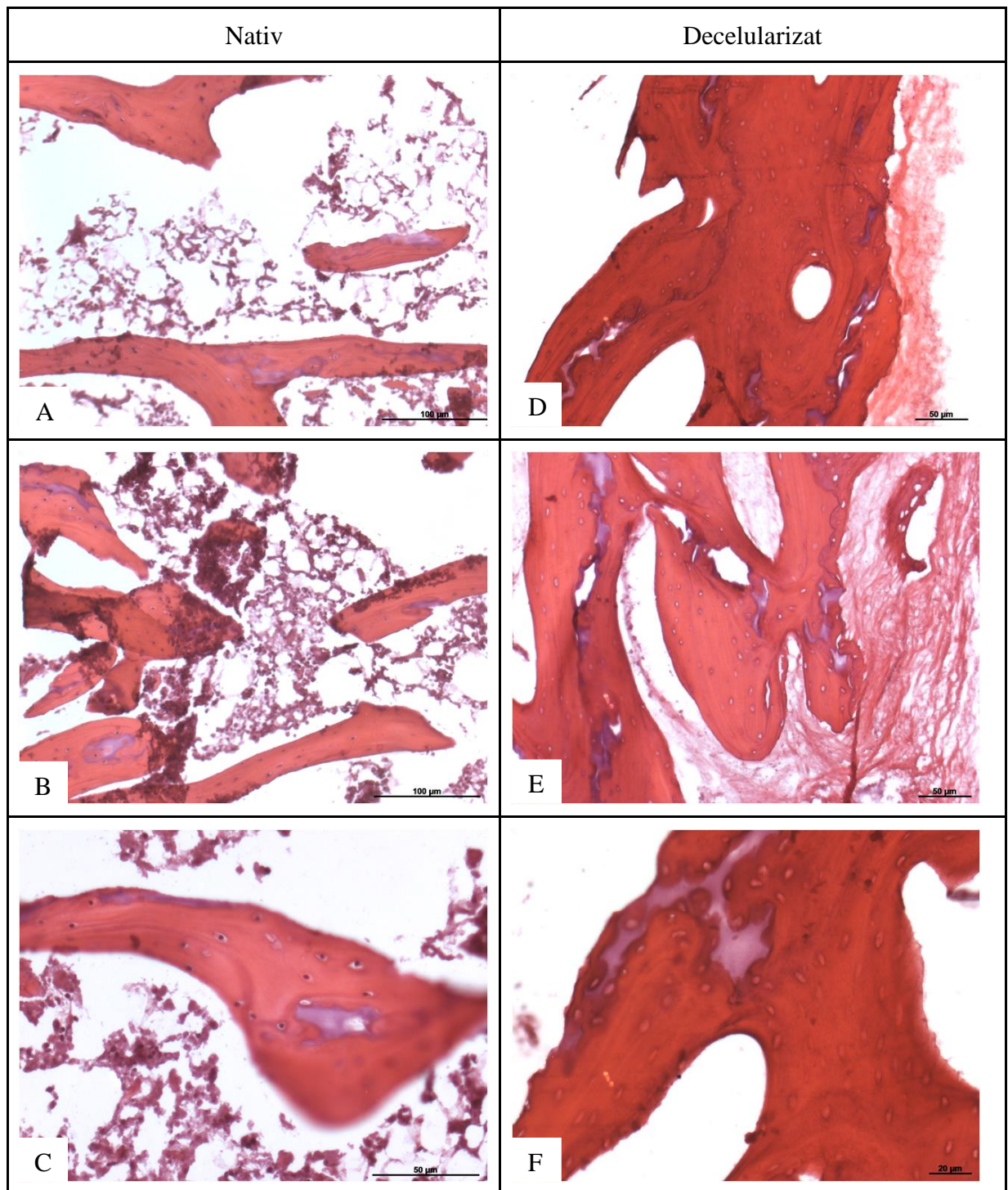


Figura 29. Grefă osoasă avasculară spongioasă. Colorația H&E. Grefă nativă (A, B, C) și grefă decelularizată (B, E F). Scala. A, B: 100 µm; C, D, E: 50 µm; F: 20 µm

Examinarea calitativă a decelularizării prin colorația DAPI pentru grefa osoase avasculară a demonstrat lipsa ADN-ului în probele de țesut decelularizate, cu o pătrare perfectă a structurii MEC osoase (figura 30). Deoarece secționarea de 5 µm a probelor spongioase cu porozitate mare s-a dovedit a fi una traumatică care nu a oferit imagini informative (calitative) la colorarea DAPI și examinarea microscopică, examinarea DAPI pentru grefele osoase avasculare a fost efectuată pe baza probelor de os corticospongios.

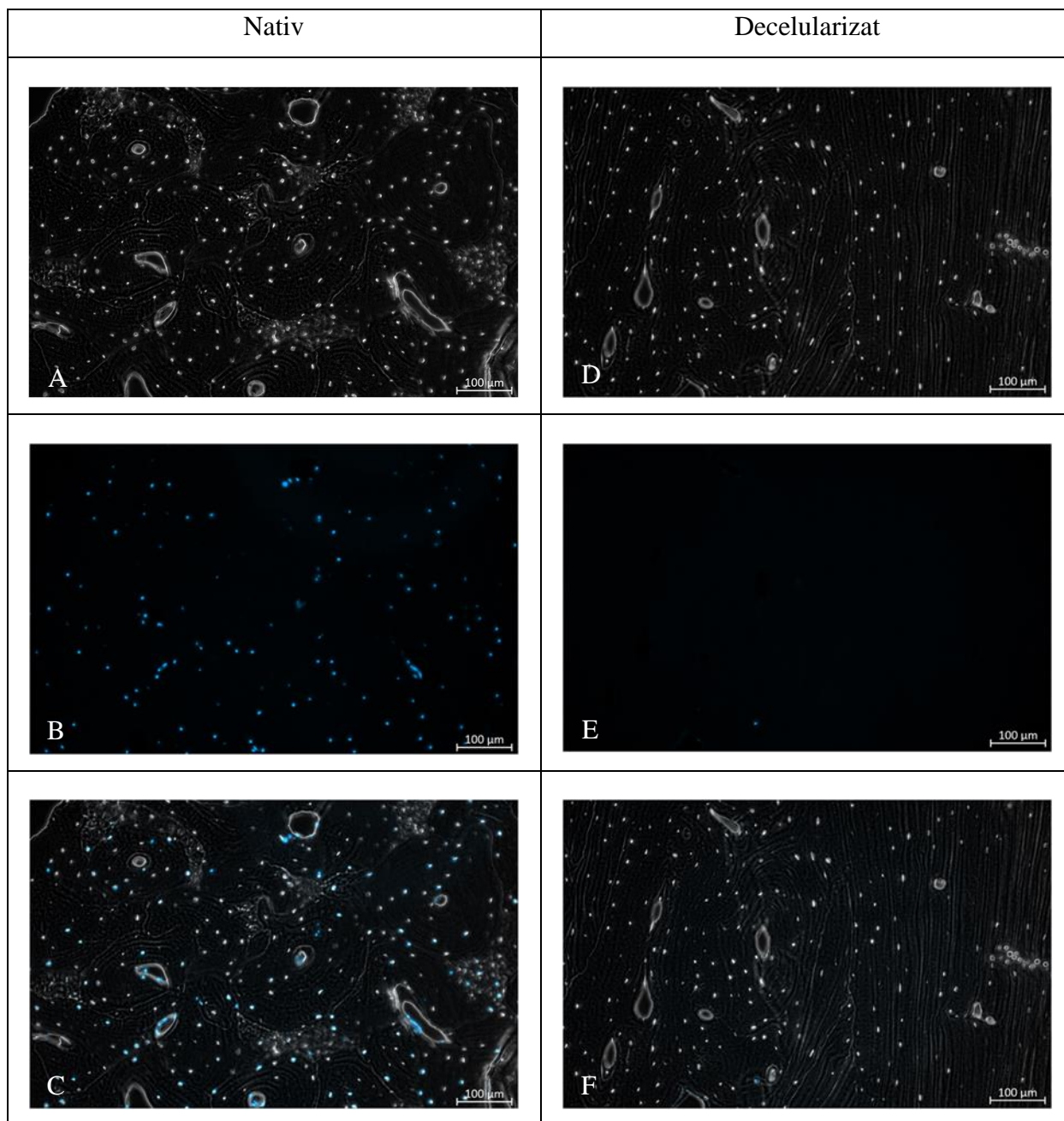


Figura 30. **Grefa osoasă avasculară corticospongioasă. Colorația DAPI.** Grefa nativă (A, B, C) și grefa decelularizată (D, E, F). Câmp luminos (A, D), câmp DAPI (B, E) și câmpurile suprapuse (C, F). Scala. A, B, C, D, E, F: 100 μm

Periostul la rândul său, a fost decelularizat în componența grefei osoase, după care a fost detașat și examinat histologic asemănător țesuturilor de grefe vasculare, fiind considerat un țesut moale. Probele pentru examinarea H&E, au fost tăiate dinspre stratul extern (stratul fibros bogat în fibroblaste) spre intern (stratul osteogen, bogat în celule progenitoare ce se dezvoltă în osteoblaste). Astfel, am obținut lipsa celulelor nucleate la colorația H&E și o păstrare bună a MEC (figura 31).

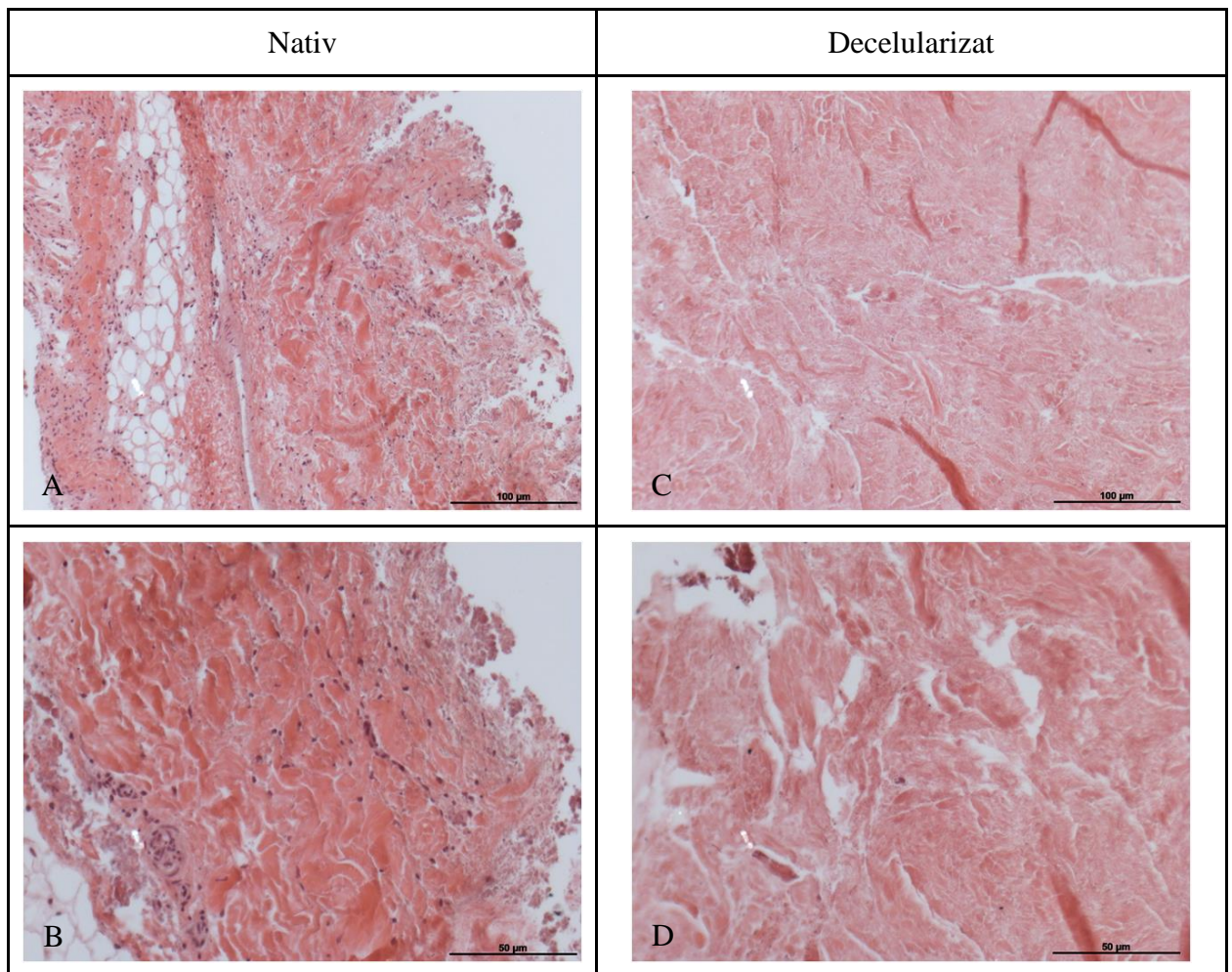


Figura 31. **Periost. Colorația H&E.** Periost nativ (A, B) și periost decelularizat (C, D).

Scala. A, C: 100 μm; B, D: 50 μm

Examinarea histologică DAPI a periostului, a fost efectuată în complex cu grefa osoasă și a determinat lipsa ADN-ului după procesare (figura 32).

Este important să menționez că colorația DAPI este o tehnică calitativă utilizată pentru evidențierea ADN-ului în celulele fixate. Cu toate acestea, există limitări în capacitatea sa de a determina întreaga cantitate de ADN prezentă într-o probă biologică, cum ar fi o grea osoasă. Penetrarea DAPI în straturile de țesut osos poate fi incompletă, în special în cazul țesuturilor mai dense, ceea ce poate afecta evaluarea totală a ADN-ului.

De asemenea, DAPI oferă informații despre prezența nucleilor celulari și densitatea acestora, dar nu furnizează date cantitative precise despre cantitatea de ADN. În aceste condiții, un test suplimentar, precum cuantificarea ADN-ului, este recomandat pentru a obține o estimare exactă a cantității de ADN prezent în probă.

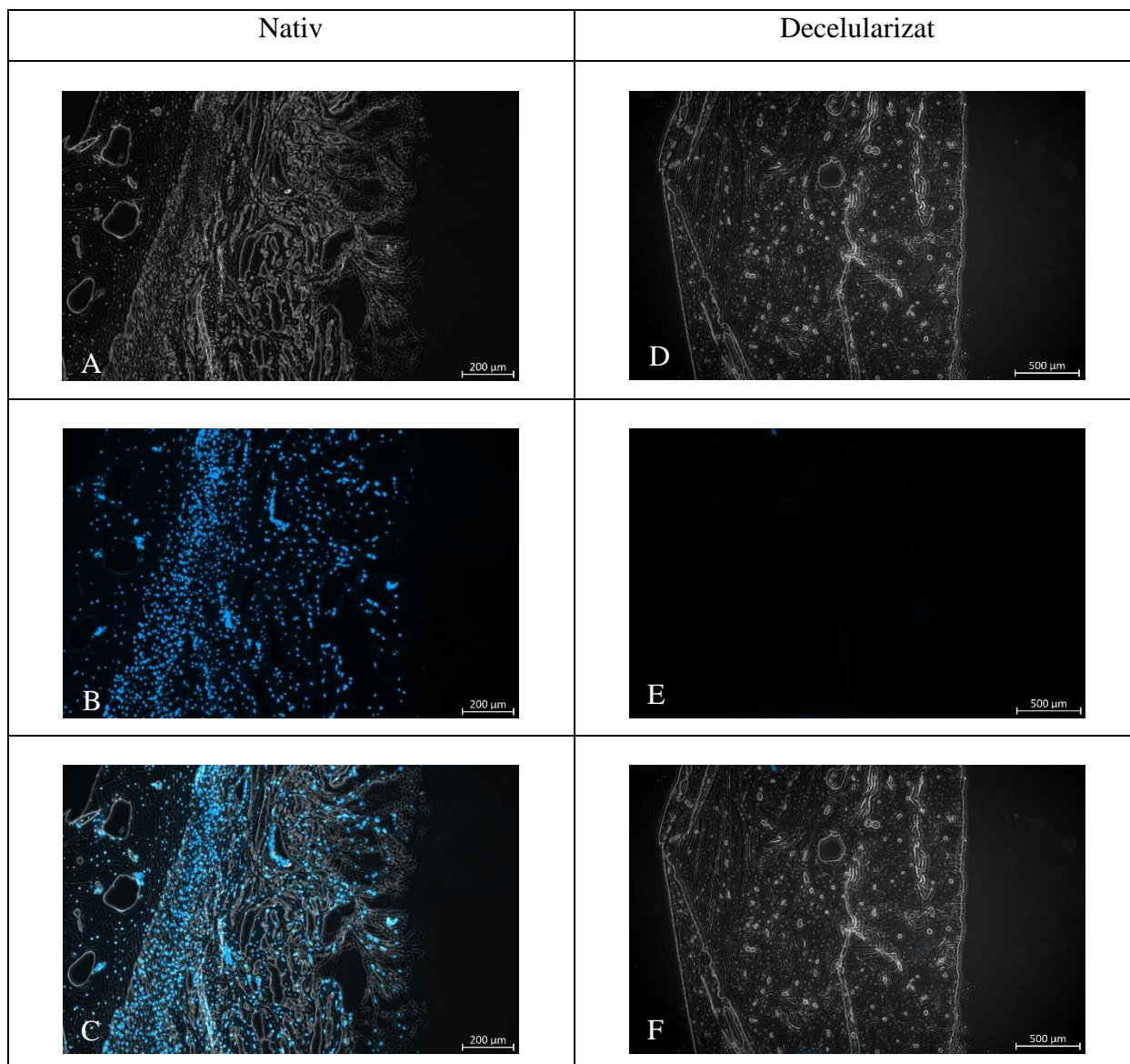


Figura 32. Periost. Colorația DAPI. Periost nativ (A, B, C) și periost decelularizat (D, E, F).

Scala. A, B, C: 200 μm ; D, E, F: 100 μm

În concluzie către această etapă de prezentare a rezultatelor, pot spune cu siguranță că protocolul de decelularizare elaborat pentru grefele osoase poate fi adaptat și utilizat cu succes pentru decelularizarea grefelor vasculare, fără a pune în pericol integritatea macroscopică și microscopică a alogrefei. Astfel, acest protocol poate fi aplicat în mod sigur și eficient pentru decelularizarea grefelor compozite, care includ țesut osos, periost și vase de sânge, asigurând un proces uniform și reproductibil.

Studiul a continuat cu decelularizarea grefelor osoase vascularizate. Aceste grefe au fost examinate doar la cuantificarea ADN-ului, această decizie a fost luată din mai multe considerente: (i) eficacitatea protocolului prin examinarea calitativă a fost demonstrată pe grefele avasculare, (ii) raționalizarea timpului: decalcifierea probelor osoase pentru examinarea histologică durează o lună, iar condițiile de păstrarea a grefelor pentru o perioadă atât de lungă, pentru efectuarea testului

de biocompatibilitate *in vitro* nu au fost elaborate, (iii) cuantificarea ADN-ului reprezintă o metodă suficient de informativă referitor eficacității protocolului de decelularizare.

3.3 Evaluarea cantitativă a eficacității decelularizării pentru grefele osoase vascularizate

Cuantificarea ADN-ului

Analiza statistică a rezultatelor obținute, a demonstrat (după decelularizare) o scădere ne semnificativ statistic al ADN-ului în toate grefele pentru componenta corticală ($p > 0.05$, ÎI 95%) și o scădere semnificativ statistic al ADN-ului pentru componenta spongioasă la toate grefele ($p < 0.05$, ÎI 95%).

Cuantificarea ADN-ului în grefa osoasă (nevascularizată) corticospongioasă a arătat că țesutul osos nativ, a conținut în medie 4.459 ± 0.458 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ADN (mediana Me = 4.54733, ÎI 95%, IIQ = 3.32100 - 5.59878). După decelularizare, cantitatea ADN-ului a constituit 3.614 ± 0.430 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Me = 3.676, ÎI 95 %, IIQ = 2.54492 - 4.68308), ceea ce constituie o scădere ne semnificativ statistic de 20% ($p = 0.080$). Valorile și rezultatele pentru grefa corticospongioasă la cuantificarea ADN-ului fiind prezentate în tabelul 9 și figura 33.

Tabelul 9. Cuantificarea AND-ului pentru grefa corticospongioasă avasculară

Tipul de țesut	Concentrația de ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$), media triplicatelor tehnice		
	Proba I	Proba II	Proba III
os corticospongioid nativ	3.964	4.547	4.868
os corticospongioid decelularizat	3.156	3.676	4.01

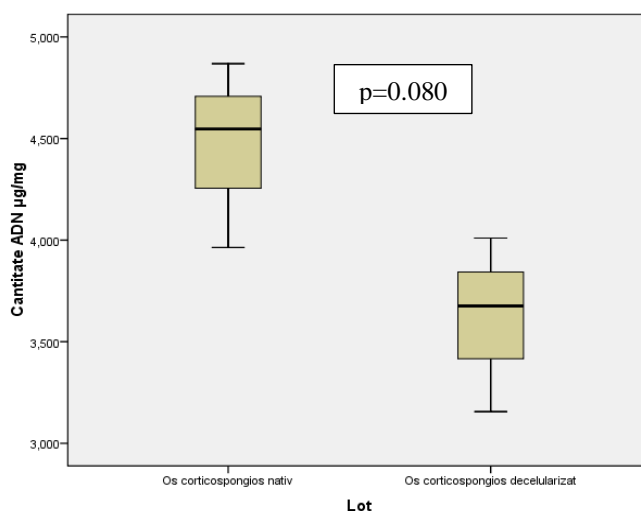


Figura 33. Cuantificarea ADN-ului pentru grefa osoasă avasculară corticospongioasă nativă vs decelularizată. Datele prezentate în diagrama Boxplot

Cuantificarea ADN-ului în MECOV procesată prin perfuzarea soluțiilor prin pedicolul vascular a arătat o cantitate de ADN în țesutul osos cortical nativ în medie 2.49922 ± 1.415 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Me = 2.64733, ÎI 95%, IIQ = -1.01746 - 6.01591). După decelularizare, cantitatea ADN-ului a constituit 3.25922 ± 1.153 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Me = 3.70600, ÎI 95%, IIQ = 0.39495 - 6.12349), ceea ce constituie o creștere ne semnificativ statistic de 23%, $p = 0.511$ (tabelul 10, figura 34).

Cantitate de ADN în țesutul osos spongios nativ a constituit în medie 8.35422 ± 1.527 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Me = 8.510, ÎI 95% IIQ = 4.55937 - 12.14908), după decelularizare, cantitatea ADN-ului a constituit 0.77339 ± 0.252 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Me = 0.86267, ÎI 95%, IIQ = 0.14525 - 1.40153), ceea ce constituie o scădere semnificativ statistic de 91%, $p = 0.012$ (tabelul 10, figura 34)

Tabelul 10. Cuantificarea AND-ului pentru MECOV decelularizată după perfuzarea prin artera poplitee

Tipul de țesut		Concentrația de ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$), media triplicatelor tehnice		
		Proba I	Proba II	Proba III
NATIV	cortical	1.015	2.647	3.835
	spongios	9.978	6.654	8.51
DECELULARIZAT	cortical	1.949	3.706	4.122
	spongios	0.862	0.488	0.969

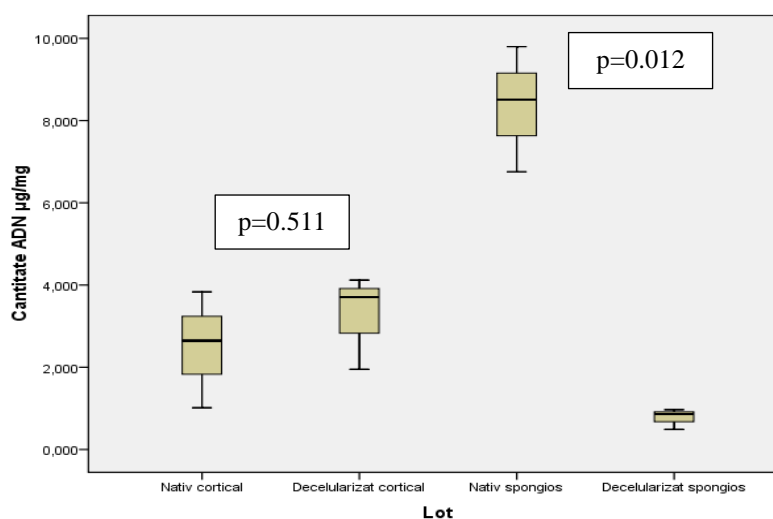


Figura 34. Cuantificarea ADN-ului pentru MECOV perfuzată pentru decelularizare prin artera poplitee. Datele prezentate în diagrama Boxplot

Cuantificarea ADN-ului în MECOV procesată prin perfuzarea soluțiilor prin diafiza osului, a arătat o cantitate de ADN în țesutul osos cortical nativ în medie 1.36633 ± 0.393 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Me = 1.5640, ÎI 95%, IIQ = 0.38766 - 2.3450), după decelularizare, cantitatea ADN-ului a constituit 0.96311 ± 0.222 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Me = 1.08633, 95% IIQ = 0.40982 - 1.51640), ceea ce constituie o scădere ne semnificativ statistică de 30%, $p = 0.198$ (tabelul 11, figura 35).

Cantitate ADN-ului în țesutul osos spongios nativ a constituit în medie 4.09656 ± 0.544 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Me = 3.93133, ÎI 95%, IIQ = 2.74282 - 5.45030), după decelularizare, cantitatea ADN-ului a constituit 1.03089 ± 0.070 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Me = 1.06967, ÎI 95%, IIQ = 0.85464 - 1.20714), ceea ce constituie o scădere semnificativ statistic de 75%, $p = 0.001$ (tabelul 11, figura 35)

Tabelul 11. **Cuantitatea ADN-ului în MECOV decelularizată după perfuzarea diafizară**

Tipul de țesut II		Concentrația de ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$), media triplicatelor tehnice		
		Proba I	Proba II	Proba III
NATIV	cortical	0.912	1.622	1.564
	spongios	4.705	3.931	3.653
DECELULARIZAT	cortical	0.706	1.086	1.097
	spongios	0.949	1.069	1.074

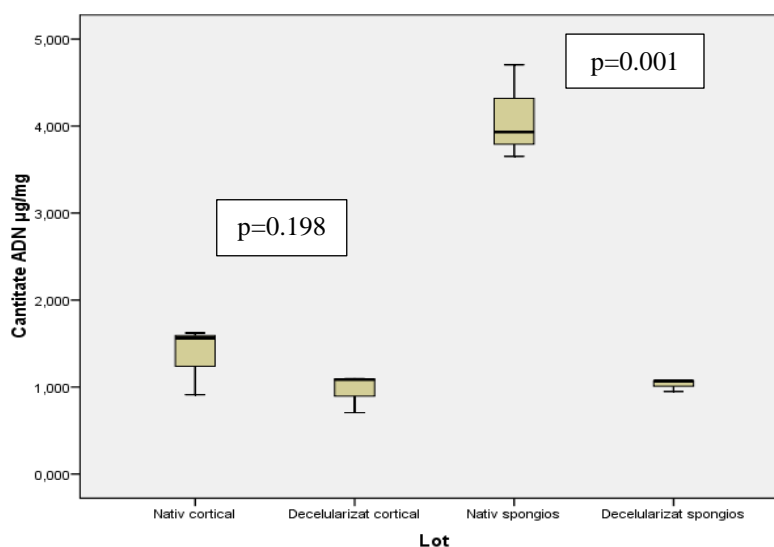


Figura 35. **Cuantitatea ADN-ului în MECOV decelularizată după perfuzarea diafizară.**

Datele prezentate în diagrama Boxplot

Cuantificarea ADN-ului în MECOV procesată prin perfuzia soluțiilor protocolului prin pediculul vascular, utilizând o concentrație mai mare (1%) de detergent, a arătat o cantitate de ADN în țesutul osos cortical nativ în medie 2.82144 ± 0.831 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Me = 2.6380, ÎI 95% IIQ = 0.75592 - 4.88697), după decelularizare, cantitatea de ADN a constituit 2.97889 ± 1.741 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Me = 3.89967, 95% IIQ = -1.34788 - 7.30566), ceea ce constituie o creștere nesemnificativ statistică de 5.5%, $p = 0.894$ (tabelul 12, figura 36).

Cantitate de ADN în țesutul osos spongios nativ a constituit în medie 19.97322 ± 0.528 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Me = 20.1320, ÎI 95%, IIQ = 18.65987 - 21.28657), după decelularizare, cantitatea ADN-ului a constituit 4.60111 ± 1.117 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Me = 4.64567, ÎI 95%, IIQ = 1.82592 - 7.37631), ceea ce constituie o scădere semnificativ statistic de 77%, $p = 0.001$ (tabelul 12, figura 36).

Tabelul 12. Cuantificarea AND-ului pentru MECOV decelularizată după perfuzarea prin artera poplitee cu o concentrație de 1% SDS

Tipul de țesut		Concentrația de ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$), media triplicatelor tehnice		
		Proba I	Proba II	Proba III
NATIV	cortical	2.097	2.638	3.729
	spongios	20.132	19.383	20.404
DECELULARIZAT	cortical	0.970	3.899	4.067
	spongios	3.462	4.645	5.695

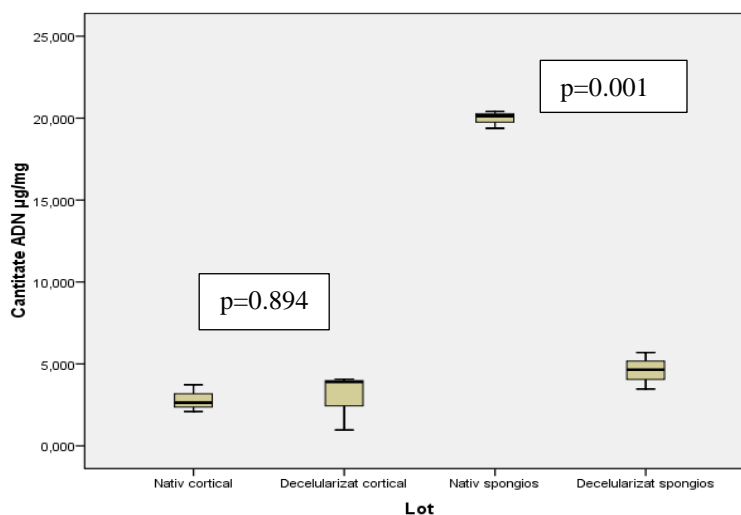


Figura 36. Cuantificarea AND-ului pentru MECOV decelularizată după perfuzarea prin artera poplitee cu o concentrație de 1% SDS. Datele prezentate în Boxplot

Cuantificarea ADN-ului în MECOV procesată prin perfuzia soluțiilor protocolului prin pediculul vascular și utilizată ulterior pentru testul de biocompatibilitate, a fost în țesutul osos cortical nativ în medie 4.47389 ± 0.494 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Me = 4.50833, ÎI 95%, IIQ = 3.24449 - 5.70329), după decelularizare, cantitatea de ADN a constituit 4.29933 ± 0.996 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Me = 4,52033, ÎI 95%, IIQ = 1.82417 - 6.77450), ceea ce constituie o scădere nesemnificativ statistică de 4.5%, $p=0.799$ (tabelul 13, figura 37).

Cantitate ADN-ului în țesutul osos spongios nativ a constituit în medie 9.36667 ± 0.859 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Me = 9.72233, ÎI 95%, IIQ = 7.23135 - 11.50199), după decelularizare, cantitatea ADN-ului a constituit 2.37078 ± 0.485 $\mu\text{g}/\text{mg}$ (Me = 2.13467, ÎI 95%, IIQ = 1.16587 - 3.57569), ceea ce constituie o scădere semnificativ statistic de 75%, $p=0.001$ (tabelul 13, figura 37).

Tabelul 13. Cuantificarea AND-ului pentru MECOV decelularizată după perfuze prin artera poplitee și utilizată ulterior pentru recelularizare

Tipul de țesut		Concentrația de ADN ($\mu\text{g}/\text{mg}$), media triplicatelor tehnice		
		Proba I	Proba II	Proba III
NATIV	cortical	4.950	3.962	4.508
	spongios	9.991	8.386	9.722
DECELULARIZAT	cortical	5.166	4.520	3.211
	spongios	2.134	2.928	2.049

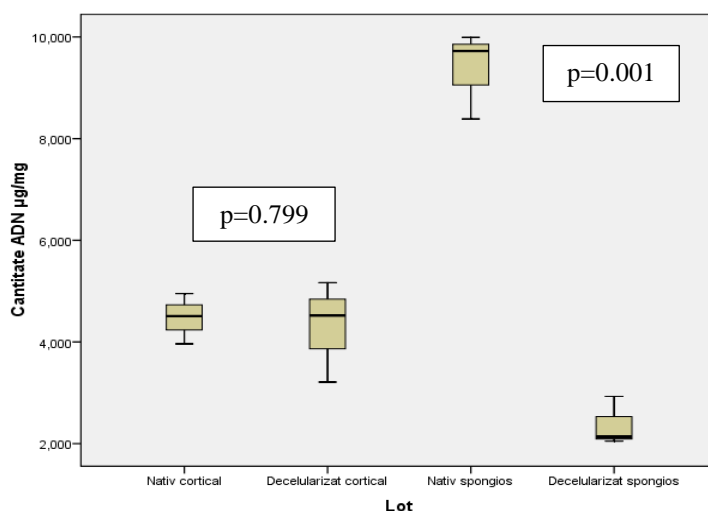


Figura 37. Cuantificarea AND-ului pentru MECOV decelularizată după perfuzare prin artera poplitee și utilizată ulterior pentru testul de biocompatibilitate. Datele prezentate în

Boxplot

Către finalul acestui compartiment, pot face următoarele concluzii preliminare:

Comparativ cu osul spongios nativ, osul cortical nativ conține o cantitate mult mai mică de ADN, chiar mai mult, în unele cazuri cantitatea ADN-ului în osul nativ cortical a fost mai mică decât în osul spongios decelularizat. În concluzie, pot spune că eliminarea ADN-ului din componenta corticală poate fi considerată mai puțin importantă decât eliminarea ADN-ului din componenta spongiosă.

Deoarece literatura nu furnizează date precise despre raportul dintre cantitatea ADN-ului prezent în grea transplantată și răspunsul imun provocat, presupunem că cantitatea de ADN rămasă în grea compozită vascularizată decelularizată poate fi insuficientă pentru a declanșa un răspuns imun și, implicit, o reacție acută sau cronică a implantului osos compozit vascularizat. Cu toate acestea, confirmarea definitivă a acestui lucru poate fi obținută doar în urma studiilor *in vivo*.

În ceea ce privește rezultatele care indică o creștere nesemnificativă a cantității de ADN în componenta corticală a grefei compozite la perfuzarea soluțiilor de decelularizare prin artera poplitee, presupun că aceste rezultate nu reprezintă o eroare. Pentru 3 grefe diferite, prelevate de la 3 animale diferite, decelularizate cu perfuzarea soluțiilor prin artera poplitee, am determinat creșterea nesemnificativă a ADN-ului în zona corticală la 2 grefe. Acest fenomen poate fi explicat prin spălarea celulelor/componentelor celulare de-a lungul structurii osoase, ceea ce a condus la migrarea ADN-ului din regiunea spongiosă în timpul prelucrării grefei.

Având în vedere considerațiile de mai sus, presupun că modalitatea de perfuzare a soluțiilor de decelularizare prin artera poplitee, oferă un rezultat mai bun la îndepărtarea ADN-ului din grea osoasă vascularizată după decelularizare.

3.4 Caracterizarea țesutului osos nativ vs decelularizat utilizând SEM

Examinarea prin scanare electronică a fost efectuată pentru analiza impactul soluțiilor utilizate pentru decelularizare asupra țesutului osos. În urma procesului de analiză, fragmentele osoase corticale, care au fost supuse acestor soluții de decelularizare, au demonstrat că structura lor microscopică este identică cu cea a fragmentelor native de os. Această constatare sugerează că procesul de decelularizare nu a modificat în mod semnificativ structura MEC osoase, confirmând eficacitatea și conservarea integrității structurale a osului în timpul tratamentului de decelularizare (anexa 2, figura 1).

În ceea ce privește probele osoase spongioase, s-a constatat că acestea sunt mai sensibile la procesarea de decelularizare. Această sensibilitate s-a manifestat prin observarea unei suprafețe mai rugoase la probele procesate în comparație cu probele native de os spongios. În plus, structura osoasă și-a pierdut uniformitatea conturului pe întreaga suprafață examinată, indicând o modificare a aspectului microstructural al țesutului osos spongios în urma procesului de decelularizare (anexa 2, figura 2).

3.5 Testului de biocompatibilitate *in vitro* pentru MEC vasculară și MEC osoasă avasculară și MECOv

Recelularizarea *in vitro* a MEC vasculare

Biocompatibilitatea MEC vasculare a fost testată prin însămânțarea pe MEC vasculară a celulelor HUVEC-GFP. Celulele primare, cum ar fi HUVEC, sunt mai susceptibile la efectele toxice ale reactivilor de transducție comparativ cu liniile celulare. De aceea, plasmidele care exprimă GFP sunt utilizate pentru transducerea celulelor HUVEC, asigurând astfel o viabilitate adecvată pe toată durata testelor ulterioare. Celulele HUVEC-GFP emit o fluorescență verde intensă atunci când sunt excitate de lumina albastră sau ultravioletă utilizată în microscopia fluorescentă. Astfel, când GFP este exprimată în aceste celule, ele apar în câmpul vizual al microscopului într-o nuanță vibrantă de verde fluorescent. Avantajul de bază al HUVEC-GFP este menținerea semnalului fluorescent după multiplicarea celulară. Datorită stabilității și persistenței fluorescenței GFP, nu a fost necesară utilizarea altor coloranți suplimentari în testul de biocompatibilitate a MEC vasculare. Acest aspect este important, deoarece permite monitorizarea continuă a viabilității celulare pe întreaga durată a testului.

Astfel, însămânțarea și monitorizarea celulară a demonstrat că grefa vasculară decelularizată prin protocolul utilizat, permite atașarea și susține viabilitatea și multiplicarea celulelor însămânțate. S-a observat o creștere progresivă a numărului de celule pe MEC vasculară timp de 8 zile, perioada pentru care s-a efectuat creșterea celulară (figura 40).

Creșterea celulelor HUVEC-GFP de la nivelul MEC vasculare au fost examinate în două puncte diferite și comparate cu lotul celular control, care a reprezentat culturi celulare de aceeași genă (HUVEC-GFP) cultivate doar în mediu celular în unul din godeurile paletelor celulare în care a fost incubată MEC propriu-zisă (figura 38).

Atfel, creșterea celulară a înregistrat o multiplicare pozitivă din a 2-a zi de cultivare, fără semne de suferință celulară (semnalul fluorescent fiind unul puternic) – figura 38A și figura 38B. Tendința de creștere și multiplicare satisfăcătoare a fost păstrată și în ziua a 3-a și ziua a 4-a de la însămânțare.

Către ziua a 8-a nu s-a observat nici o diferență semnificativă între intensitatea fluorescenței emise de către celulele de la nivelul MEC și celulele din lotul de control, ceea ce ne poate demonstra că MEC vasculară reprezintă o matrice biocompatibilă *in vitro*, cu un nivel minim de toxicitate pentru celulele însămânțate.

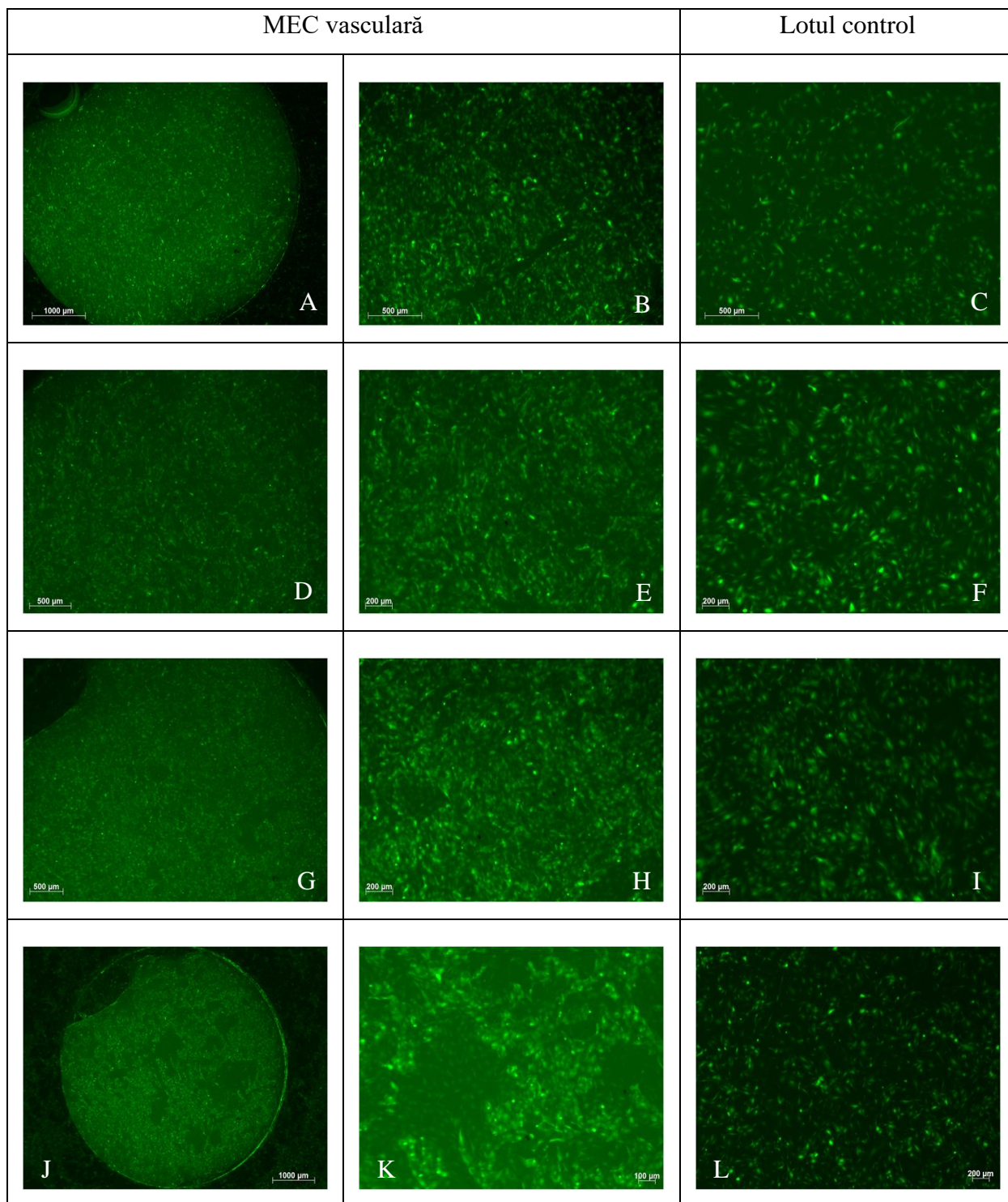


Figura 38. **Recelularizarea MEC vasculare. Precondiționarea – 72 h.** Celulele HUVEC-GFP pe lumenul MEC vasculare. (A, B, C) ziua a 2-a, (D, E, F) ziua a 4-a, (G, G, J) ziua a 6-a, (K, L, M) ziua a 8-a. Scala. A, D, G, J: 1000 μm ; B, C, E, F, H, I, L: 200 μm ; K: 100 μm

La fel către ziua a 8-a, la examinarea în ansamblu a MEC (figura 38J) au fost determinate zone în care intensitatea celulară părea a fi scăzută. Cu toate acestea, mărind amplificarea de examinare de la 1000 μm la 100 μm (figura 38K) s-a determinat că de fapt aceste zone erau populate de celule, doar că acestea aveau un semnal mai slab. Explicația pentru acest fenomen este că, la a 8-a zi de creștere, numărul celular era prea mare și spațiul de extindere insuficient, fapt pentru care

o parte din celule reprezentau semne de suferință, adică un semnal fluorescent scăzut. Fapt pentru care testul a fost întrerupr către această zi.

MEC vascular, pentru care am încercat să scurtez perioadăde condiționare, a demonstrat de fapt importanța acestui proces. Preconditionarea MEC reprezintă o etapă importantă în pregătirea grefei pentru însămânțarea celulelor. Pregătirea grefei într-un mediu de cultură adecvat, în condiții controlate, suplimentarea cu factori de creștere, înainte de însămânțarea celulelor a avut ca scop optimizarea mediului pentru supraviețuirea și funcționarea celulelor însămânțate. Scurtarea acestei pregătiri de la 72 h la 24 h s-a dovedit a fi insuficientă și, a dus la moarte celulară a 2-a zi după însămânțare – lipsa semnalului fluorescent verde vs lotul celular control (figura 39).

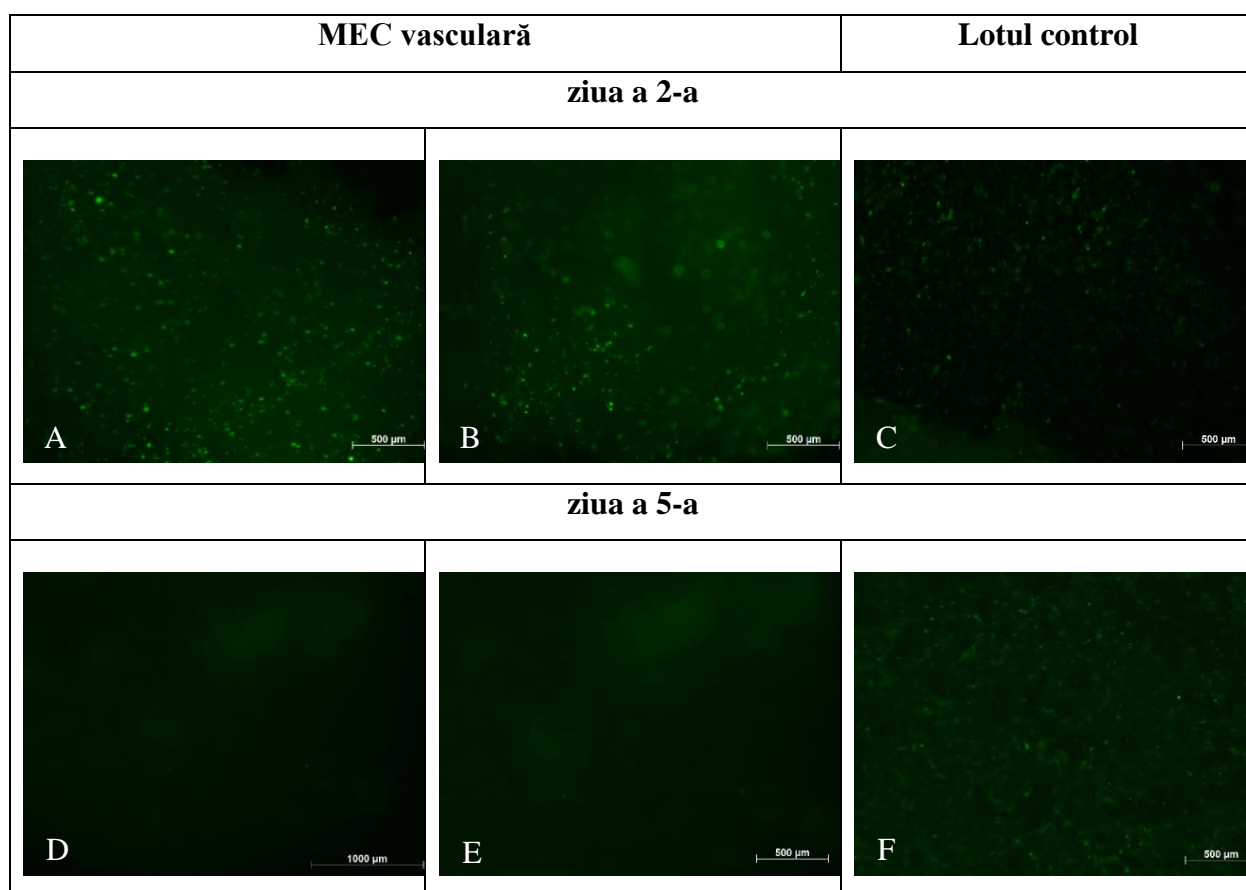


Figura 39. **Eșecul recelularizării MEC vasculare. Precondiționarea – 24 h.** Celulelor HUVEC-GFP pe lumenul MEC vasculare. (A, B, C) ziua 1, (D, E, F) ziua a 2-a. Scala. A, B, C, E, F: 500 μm; D: 1000 μm

Obținerea recelularizării *in vitro* a MEC osoase avasculare

Biocompatibilitatea matricei extracelulare osoase avasculare, a fost testată prin însămânțarea celulelor mezenchimale STEM marcate PKH26 pe grefa osoasă, în 3 puncte diferite (P1, P2, P3). Colorația PKH26 roșu, ne ajută să obținem o culoare roșie a nucleilor celulari la examinarea microscopică fluorescentă. Creșterea celulară de la nivelul MEC osoase, a fost examinată în comparație cu lotul celular control, care a reprezentat culturi celulare (de aceeași genă) puse

doar în mediu celular în unul din godeurile paletii celulare în care a fost incubată MECO propriu-zisă. Am demonstrat că grefa osoasă decelularizată prin protocolul ales, permite atașarea și multiplicarea celulelor însămânțate.

Astfel, s-a observat o creștere progresivă a numărului de celule pe carcasa extracelulară osoasă, începând cu ziua a 2-a a testului de biocompatibilitate (figura 40).

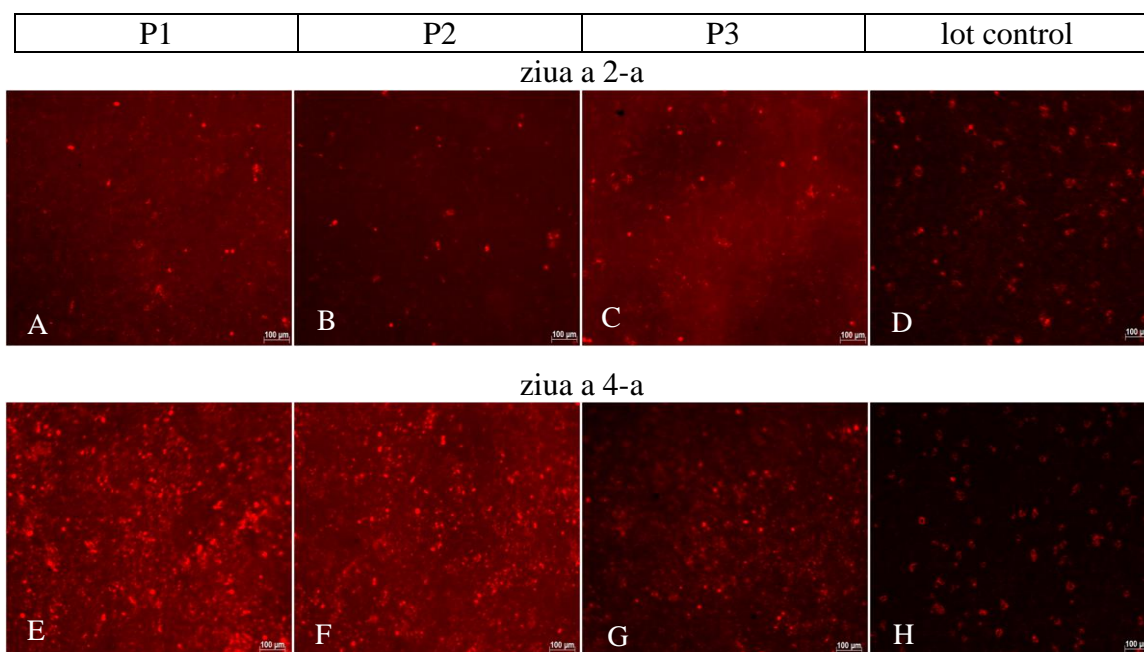


Figura 40. **Recelularizarea MEC osoase avasculare. Vizualizarea MB MSC-PKH26. Ziua 2 și ziua 4.** (A-D) ziua a 2-a, (A, B, C) MEC osoasă, (D) lotul control. (E-H) ziua a 2-a. (E, F, G) MEC osoasă, (H) lotul control. Scala: 100 μm

Creșterea celulară a înregistrat rezultat pozitiv și în următoarele zile (figura 41). Astfel, la fel ca în cazul MEC vasculare, testul de biocompatibilitate a durat 8 zile. Către ziua a 8-a, nu s-au observat mari diferențe între numărul celular și semnalul celular înregistrate de la nivelul MEC osoase și lotul celular control, ceea ce ne poate demonstra că MEC osoasă reprezintă o matrice biocompatibilă, cu un nivel minim de toxicitate pentru celulele însămânțate.

Așa cum am menționat în capitolul anterior, colorația PKH26 își pierde din intensitatea fluorescenței la fiecare multiplicare celulară. Din acest motiv, în ultima zi de cultivare celulară, s-a mai efectuat colorația celulelor cu Calceină (test pentru aprecierea viabilității celulare), această ne oferă imagini cu nucleii celulari colorați în verde (figura 41I-L).

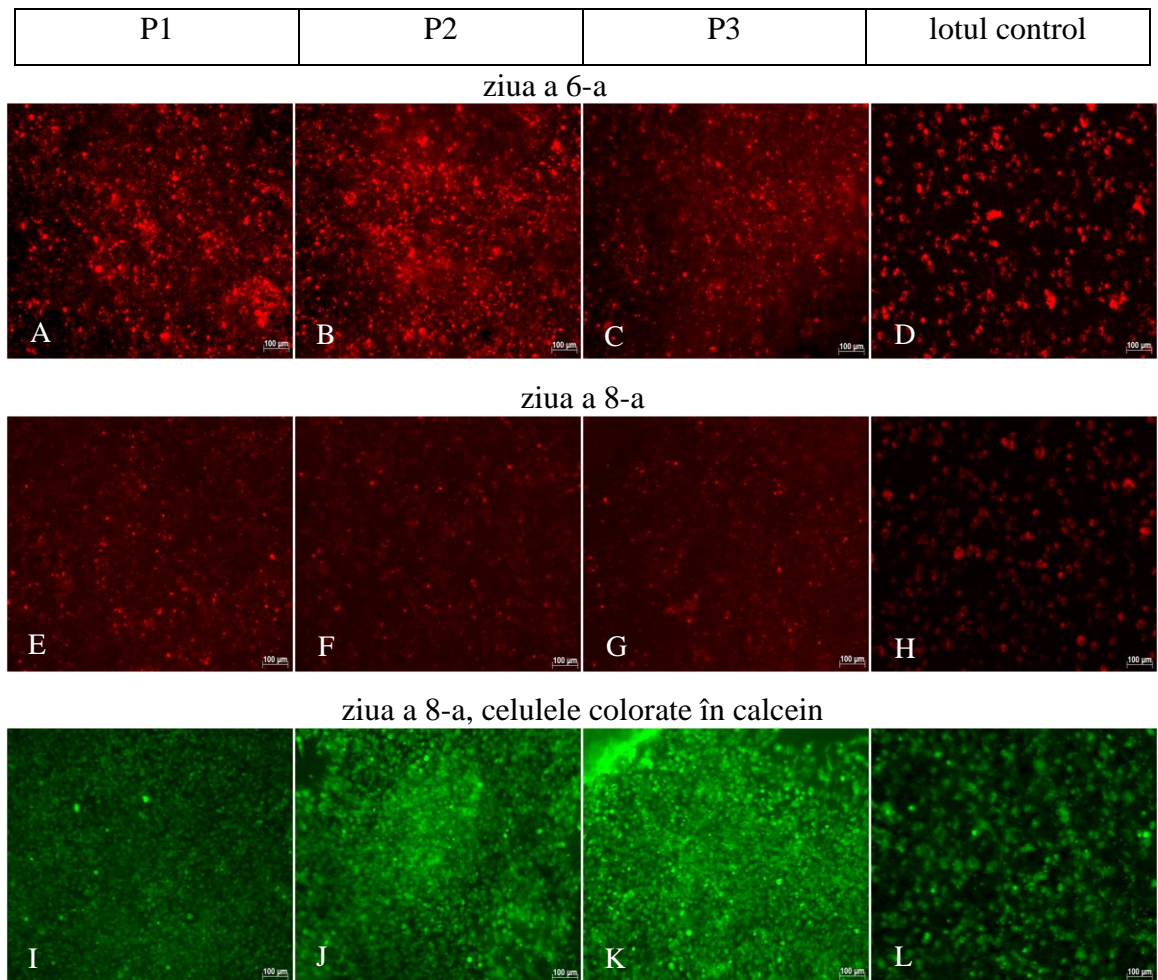


Figura 41. **Recelularizarea MEC osoase avasculare. Vizualizarea MB MSC-PKH26. Ziua 6 și ziua 8.** (A-D) ziua a 6-a, (A, B, C) MEC osoasă, (D) lotul control. (E-H) ziua a 8-a. (E, F, G) MEC osoasă, (H) lotul control. (I-L) ziua a 8-a, colorația Calcein, (I, J, K) MEC osoasă, (L) lotul control. Scala: 100 μm

Recelularizarea *in vitro* a MECOv

Biocompatibilitatea MECOv, a fost testată prin însămânțarea celulelor mezenchimale stem din măduva osoasă marcate PKH26. Celulele au fost însămânțate pe suprafața creată prin osteotomie în două puncte diferite reprezentate în imaginea grefei din figura 46 prin punctele „A” și „B”.

Suplimentar, ceulele au fost însămânțate la nivelul periostului și în interiorul pediculului vascular. Celulele însemnate pe carcasa osoasă au fost cultivate 4 zile. În ziua a 2-a au fost determinate un număr satisfăcător de celule (figura 42).

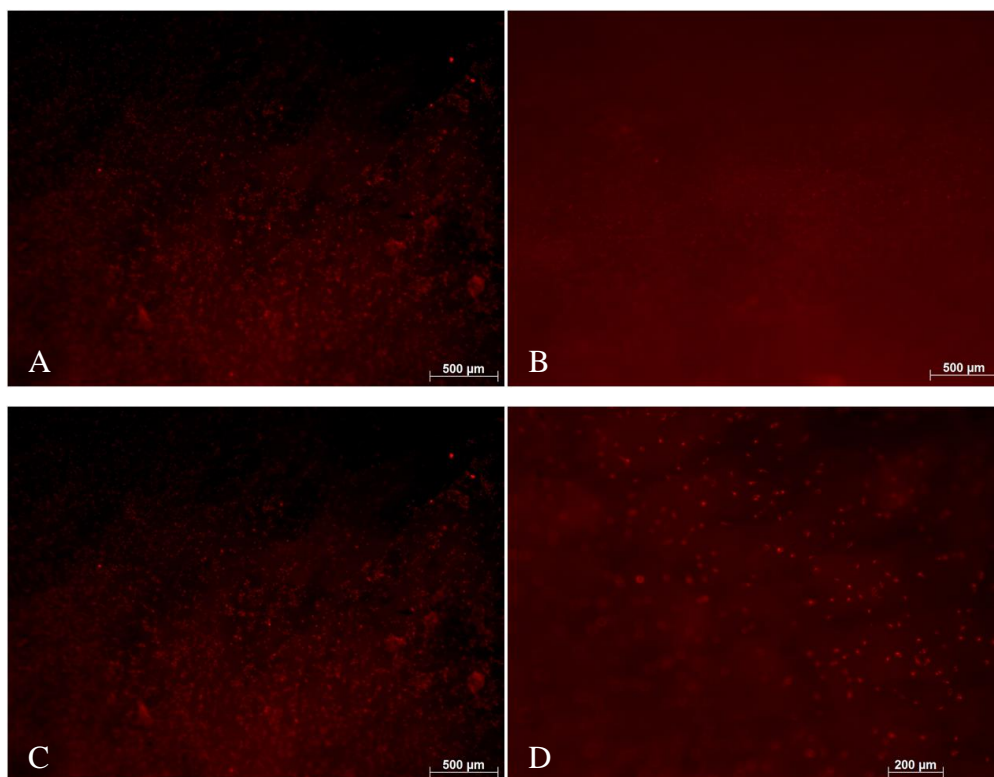
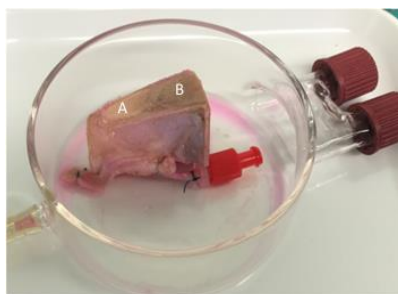


Figura 42. **Recelularizarea MECOv. Celulele MB MSC-PKH26 la ziua a 2-a.** (A, C) celulele din punctul „A” al MECOv, (B, D) celulele din punctul „B” a MECOv. Scala. A, B, C: 500 μm ; D: 200 μm

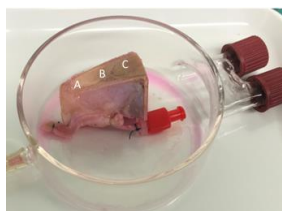
După cum am menționat anterior, celulelor colorate cu PKH26 emit un semnal roșu la examinarea cu microscopul stereo. Astfel, putem observa în toate imaginile din figura 44 celulele viabile, vizualizate sub formă de puncte de un roșu fluorescent.

Către ziua a 4-a, s-a determinat o scădere ușoară a numărului celular de pe suprafața externă a MECOv, din aceste considerente am examinat prezența/absența celulelor pe un punct suplimentar de pe suprafața externă (figura 43).

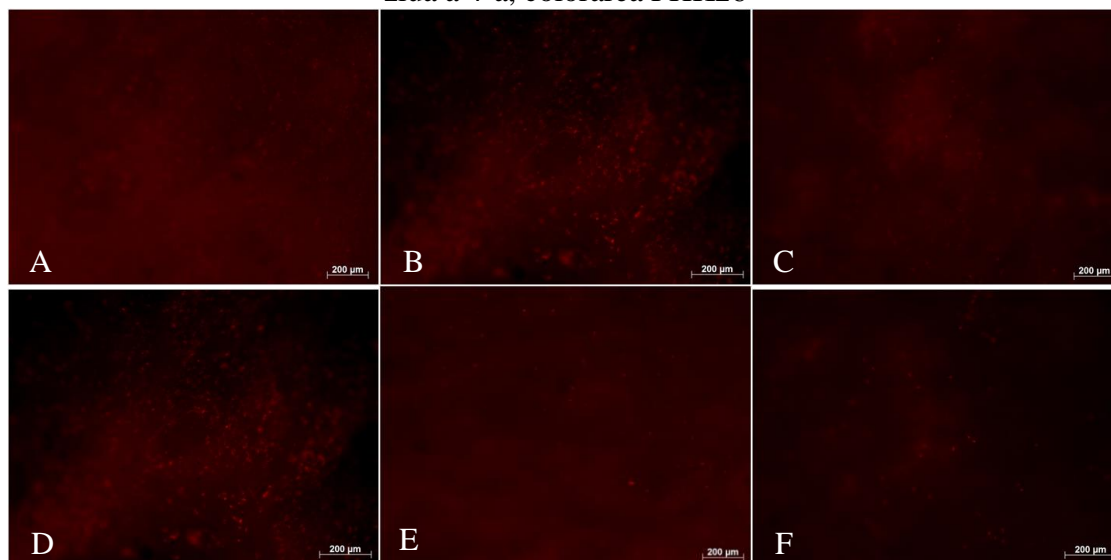
Adițional, din aceleași considerente enumerate anterior (scăderea impulsului fluorescent pentru PKH26 și testarea viabilității celulare), am efectuat colorația suplimentară a celulelor cu Calcein.

Un moment important determinat în timpul testului, a fost prezența celulelor viabile în interiorul grefei, chiar dacă celulele nu au fost însămânțate în interior. La fel, în ultima zi a testării,

am determinat celule viabile la nivelul periostului și pe suprafața externă a pedicului vascular (figura 44).



ziua a 4-a, colorarea PHK26



ziua a 4-a, colorarea Calcein

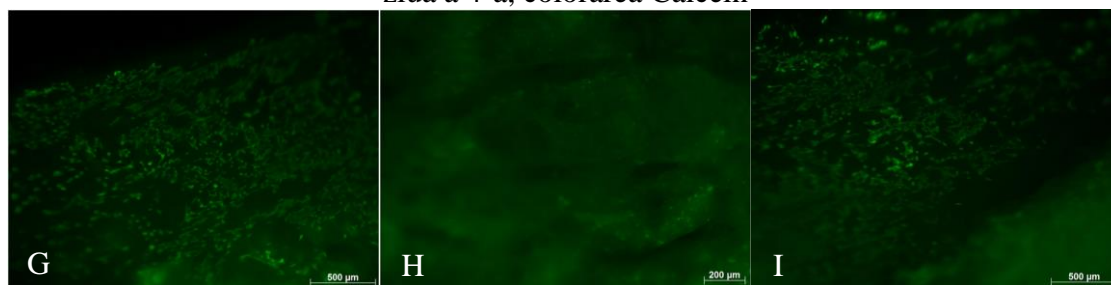
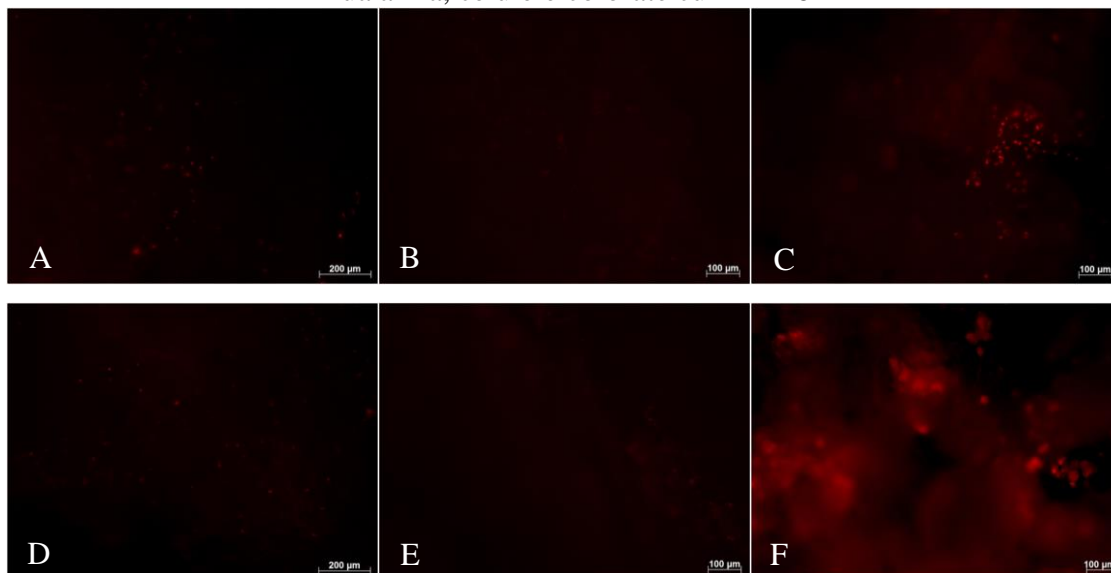


Figura 43. Recelularizarea MECOV. Celulele MB MSC-PKH26 la ziua a 4-a. (A, D, G) celulele din punctul „A” al MECOV, (B, E, H) celulele din punctul „B” a MECOV, (C, F, I) celulele din punctul „C” a MECOV. Scala. G, I: 500 μm; A, B, C, D, E, F, H: 200 μm



ziua a 4-a, celulele colorate cu PKH26



ziua a 4-a, celulele colorate cu Calcein

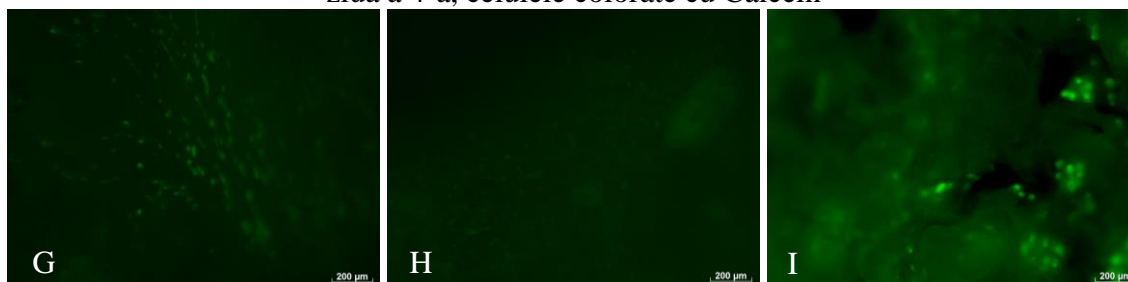


Figura 44. **Recelularizarea MECOV. Colorația PKH26 și Calcein. Celulele la ziua a 4-a.** (A, D, G) celulele la nivelul periostului, (B, E, H) celulele la nivelul pediculului vascular, (C, F, I) celulele din interiorul grefei. Scala. A, D, G, H, I: 200 μm ; B, C, E, F: 100 μm

Colorarea suplimentară cu Calcein a permis vizualizarea celulelor tinere (figura 46G, figura 44H și figura 44I), care nu conțin PKH26 și respectiv nu pot fi vizualizate. Semnalul emis de celulele viabile, colorate suplimentar cu calcein pot fi vizualizate sub formă de puncte fluorescente verzi. Astfel, observăm mai multe celule în interiorul grefei (figura 44I) vs exteriorul grefei (figura 44G și figura 44H).

Către ziua a 5-a, am examinat creșterea celulară doar la nivelul pedicolului vascular. Pentru a avea o imagine mai clară asupra rezultatului, întucât celulele însămânțate au fost înjectate în interiorul vasului, acesta a fost secționat și deschis. Astfel, am determinat celule viabile la nivelul tunicii externe și un număr mic de celule viabile (aglomerate celulare) la nivelul lumenului

vascular (figura 45). Suplimentar, am efectuat colorare celulelor cu Calcein pentru intima vasului (figura 45H și figura 45I), cu toate acestea nu am determinat un număr mare de celule viabile.

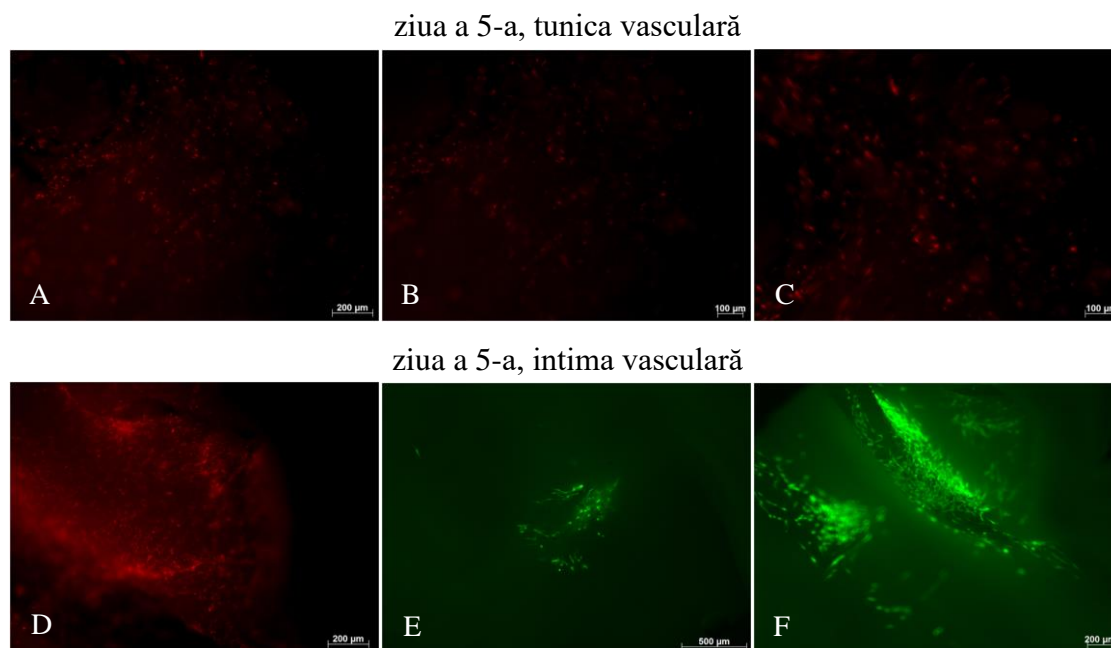


Figura 45. Recelularizarea MECOv. Celulele de la nivelul pediculului vascular, ziua a 5-a de. Colorația PKH26 și Calcein. (A, B, C) tunica vasculară, (D, E, F) intima vasculară. (A, B, C, D) colorația PKH26, (E, F) colorația calcein. Scala. A, D, F: 200 µm; B, C: 100 µm; E: 100 µm

În concluzie preliminară după analiza rezultatelor acestui test, pot spune că obținerea recelularizării MEC indică faptul că protocolul utilizat, este eficient nu doar la îndepărtarea eficientă a componentelor celulare din țesut, dar și la conservarea MEC vasculare și osoase nevascularizate. Acest protocol permite obținerea de MEC cu grad scăzut de toxicitate, care facilitează creșterea și multiplicarea celulelor de origine alogenă.

Există însă unele aspecte care generează curiozități, în special în ceea ce privește capacitatea de migrație a celulelor însămânțate în interiorul alogrefei compozite. Pot presupune astfel că celulele sunt capabile să ajungă în interiorul MECOv nu doar prin intermediul fluxului sanguin dirijat de pediculul vascular, ci și prin difuzia directă, datorită porozității ridicate a componente spongioase din greafă. Acest lucru este sugerat de observația că celulele însămânțate au pătruns ușor de pe suprafața grefei în interiorul acesteia, indicând o posibilă cale de difuziune prin porii grefei.

4. DISCUȚII

Studiul dat a fost realizat pe baza elaborării și testării unui protocol universal de decelularizare. Un protocol universal din considerentul că poate fi aplicat pentru decelularizarea țesuturilor cu diferit grad de mineralizare (țesut dur și țesut moale). Produsul final după obținerea unui astfel de protocol a fost o matrice extracelulară osoasă compozită, biocompatibilă, vascularizată de către pediculul său vascular.

Elementul de bază al studiului a fost nu doar eliminarea componentelor imunogene din compartimentul osos, vascular și periostal al grefei, dar și obținerea unei MEC vasculare și osoase calitative, adică cel puțin biocompatibilă din punct de vedere morfologic și funcțional. Vorbind în ansamblu despre proprietățile trombogene ale vaselor sanguine decelularizate și despre incapacitatea de revascularizare calitativă a segmentelor mari osoase decelularizate, studiul pare a fi unul extrem de dificil. Totuși, sumând rezultatele obținute și consolidând aceste rezultate cu altele din cadrul ultimelor studii la nivel mondial, cred că aduc un aport important în elaborarea protocoalelor de obținere a alogrefelor osoase compozite vascularizate obținute prin inginerie tisulară, care ar putea fi utilizate în tratamentul defectelor masive de os. Momentul crucial pentru aplicarea clinică și prevenirea eșecului în utilizarea osului prelucrat prin inginerie tisulară depinde în întregime de capacitatea de neovascularizare a grefei sau construcției [213]. Din intenția de a scădea răspunsul imun și inflamator împotriva alogrefelor transplantate, sunt utilizate diverse metode de decelularizare. Cu toate acestea, anume acest tip de prelucrare alterează cel mai mult potențialul de neovascularizare *in vivo* a grefei [214]. Din ideile expuse mai sus, studiul efectuat a fost proiectat după următorii pași:

1. Alegerea materiei prime pentru obținerea MEC;
2. Determinarea metodei de prelucrare/obținere a MEC;
3. Verificarea eficacității metodei de prelucrare;
4. Testarea biocompatibilității prin recelularizarea *in vitro* a MEC obținute.

Alegerea materiei prime pentru obținerea MEC

Studiul dat a fost efectuat pe bază de MEC naturală. Disponibilitatea și potențialul angiogenic a MEC naturale au fost două din argumentele de bază către alegerea făcută.

Potențialul angiogenic a unei MEC este în mare parte proporțional cu capacitatea sa de a ancora celulele și a le oferi mediu corespunzător către diferențiere țintită.

Terapia celulară, ca terapie adjuvantă transplantării *in vivo* a MEC, a fost propusă drept soluție pentru a îmbunătăți supraviețuirea celulelor și integrarea matricei, oferind de altfel rezultate încurajatoare. Se consideră că prin proiectarea matricelor semisintetice sau sintetice cu proprietăți fizice și biochimice corecte, celulele încapsulate sunt direcționate pentru un fenotip mai angiogenic.

Cu toate acestea, atașarea celulelor endoteliale la construcțiile sintetice este slabă, și necesită o serie de manevre suplimentare pentru ca acestea să ajungă la diferențiere [89, 215]. Astfel, evitarea etapelor suplimentare a fost un alt argument pentru alegerea unei schele naturale. Chiar mai mult, posibilitatea obținerii la grefa selectată a unui pedicul vascular cu o lungime de peste 3 cm și un diametru de aproximativ 3 mm, o face ușor manevrabilă pe tot parcursul procesului de prelucrare, iar porozitatea mare a componentei spongioase simplifică difuzia, atașarea celulelor și face posibilă revascularizarea mai rapidă [216, 217]. Grefele tisulare de mari dimensiuni au eșuat în trecut în mare parte din cauza penetrării lente a vascularizației gazdei, ducând în cele din urmă la necroză în regiunea centrală a grefelor osoase obținute prin IT [218]. Așa cum studiul efectuat reprezintă un studiu experimental *in vitro*, lungimea și diametru satisfăcător al pediculului vascular este un mare avantaj, oferind un acces sigur al sângelui în interiorul grefei la transplantarea *in vivo*.

Din cele expuse mai sus, primul moment important al tezei este considerat elaborarea unui protocol anatomic de obținere a grefei osoase de os tibial (1/3 proximală) cu păstrarea pediculului său vascular începând de la artera poplitee. Această grefă a fost utilizată în premieră ca materie primă pentru IT în obținerea MEC osoase vascularizate. Protocolul propus permite păstrarea maximă/utilă a lungimii pediculului și poate servi ca prototip pentru efectuarea altor studii.

Un studiu *in vivo* descrie o disecție anatomică asemănătoare în contextul alotransplantului osos vascularizat în combinație cu tratamentul imunosupresor. Dimitra Kotsougiani și echipa, descriu protocolul operator cu preparare grefei osoase (os tibial, 1/3 proximală), la care s-a păstrarea pediculului vascular (artera nutritivă) cu o lungime de 2.7 ± 0.6 mm și un diametru de 1.2 ± 0.1 mm, aceasta a fost transplantată ulterior sub formă de alogrefă fără nici o prelucrare prealabilă [219].

Lungimea grefei nu a fost nici ea selectată întâmplător. Pe lângă faptul că am avut nevoie de o grefă care să fie aplicabilă, pentru repararea defectelor masive de os, păstrarea proprietăților mecanice nu era mai puțin important. Așa cum la inițierea studiului, metoda de prelucrare nu era selectată, etapa anatomică a studiului a avut ca scop obținerea unei grefe rezistente la diferite metode. Din considerentele că osul spongios este mai puțin rezistent, am simțit nevoia includerii în componenta grefei și a unei porțiuni corticale, asigurând grefei o carcasă mai rezistentă. Astfel, am determinat că grefa cortico-spongioasă este o grefă rezistentă, iar diafiza osului (componenta corticală), fiind inclusă în grefă poate oferi o altă opțiune decât pediculul vascular pentru perfuzarea soluțiilor de decelularizare. Acest moment poate fi extrem de important pentru viitoarele studii *in vivo*, la care metoda de decelularizare a grefei prin diafiza osului poate fi selectată pentru a păstra maxim posibil integritatea pediculului vascular.

În cele din urmă, studiul ce stă la baza tezei, s-a realizat utilizând țesuturi de origine porcină care pot fi prelucrate în contextul numeroaselor metode, cea mai populară fiind îndepărtarea

conținutului celular și nuclear, iar schelele obținute fiind biocompatibile pentru însămânțare cu anumite populații de celule [220].

Determinarea metodei de prelucrare/obținere a MEC

MEC este o structură funcțională complicată, esențială în dezvoltarea, homeostazia și repararea țesuturilor, iar metoda de decelularizare aleasă trebuie să fie una care să păstreze maxim posibil toate aceste caracteristici [221, 222]. Fiecare tip de țesut solicită o anumită metodă de prelucrare. În cele din urmă, au fost dezvoltate diferite metode de decelularizare, fiecare dintre acestea fiind adecvată pentru îndepărtarea celulelor dintr-un anumit tip de țesut, în condiții specifice [223]. Pornind de la ideea că o grefă compozită necesită un protocol/metodă de prelucrare eficientă și comună pentru țesutul osos și vascular, analiza datelor din literatură a fost axată pe selectarea protocolelor ce pot îndepărta eficient componenta celulară din os și păstra în același timp integritatea pediculului vascular. În urma analizei, am determinat că metodele de decelularizare pentru alogrefele compozite vascularizate (în special extremități), variază ușor între studii [224]. Majoritatea rapoartelor folosesc aceeași concentrație de detergent și aceiași pași de prelucrare: spălare, detergent, spălare, enzime, spălare, sterilizare. Dodecil sulfat de sodiu (SDS) s-a dovedit a fi cel mai utilizat detergent pentru decelularizare.

Din necesitatea adaptării unui protocol pentru ambele tipuri de țesut, am analizat repetat fiecare structură din componența grefei:

1. os spongios – os poros, care poate fi ușor decelularizat pe contul difuziei ușoare a soluțiilor. Cu toate acestea, are o concentrație mai mare de celule vs osul cortical iar la prelucrări îndelungate își poate pierde structura tridimensională, ceea ce soldează cu o MEC deteriorată. De asemenea, acest tip de grefe mai pot fi sensibile la prelucrări termice, prelucrări chimice și enzimatică îndelungate (2, 3 săptămâni) [225].
2. os cortical – os compact, cu un număr mai redus de celule, dar care se supune mai greu procesului de decelularizare. Chiar și așa, răspunsul imun ce poate fi declanșat de către celulele prezente în osul cortical este în discuții, (asta a demonstrat până și studiul efectuat: cantitatea ADN-ului în osul cortical nativ nu depășea cu mult sau chiar era aproape de cantitatea ADN-ului în osul spongios decelularizat). Grefele corticale mici se consideră a fi rezistente, se decelularizează ușor iar în prezența unei surse sigure de vascularizare oferă regenerare. Lipsa vascularizației, duce la integrare întârziată și necroză, în special pentru segmentele mari osoase. Cu toate acestea, la utilizarea terapiilor adjuvante, precum factori de creștere sau terapia celulară, sunt considerate grefe cu potențial neoangiogenic accentuat atât *in vivo* cât și *in vitro* [226, 227].
3. artere de calibru diferit – diferența principală între acestea se face pe contul funcției și structurii peretelui vascular, de la 3 straturi bine dezvoltate pentru artere, până la un singur strat de celule

endoteliale pentru capilare [228, 229]. Decelularizarea grefelor vasculare de calibru mic este una foarte traumatică și de cele mai multe ori duce la obținerea MEC vasculare trombogene. IT pentru vasele cu diametru < 6 mm este îngreunată de permeabilitatea redusă și tonusul scăzut. Succesul limitat al materialului sintetic a dus la dezvoltarea largă a MEC naturale. Grefele vasculare decelularizate oferă cele mai bune rezultate în transplantare, iar importanța păstrării arhitecturii originale 3D a grefei vasculare este extrem de importantă pentru diferențierea celulară/recelularizarea grefei [228, 230].

4. periost – periostul este esențial pentru formarea și regenerarea oaselor, are o capacitate de regenerare remarcabilă și este recunoscut pe scară largă ca fiind esențial pentru procesul de remodelare osoasă ca o sursă de celulelor progenitoare și factorilor de creștere. IT a periostului oferă noi oportunități pentru dezvoltarea terapiei țesutului osos [231, 232]. Grefele periostale s-au dovedit promițătoare în regenerarea defectelor osoase masive prin stimularea osteogenezei. Disponibilitatea lor limitează aplicarea clinică pe scară largă iar în literatură sunt raportate un număr mic de construcții pe bază de periost prelucrat prin IT. Realizarea unei structuri pe bază de periost se așteaptă să răspundă nevoilor clinice de reparare a osului în mod mai eficient [233, 234].

Făcând în cele din urmă o aranjare ierarhică finală a componentelor grefei în funcție de cantitatea de material celular/genetic ce trebuie îndepărtat, importanța componentei în procesul de revascularizare după decelularizare, precum și gradul de distrugere/degradare a țesutului în timpul prelucrării, am stabilit că componenta cea mai importantă a grefei este cea spongioasă, urmată de componenta vasculară și periost, iar apoi de componenta corticală.

Analizând multitudinea de metode descrise în literatură la capitolul decelularizării țesuturilor, soluțiile ce sunt utilizate și acțiunea acestora asupra componentelor celulare și extracelulare, am determinat că o metodă destul de populară pentru prelucrarea grefelor osoase este demineralizarea, cu toate acestea, pe lângă îndepărtarea componentelor celulare, osul își pierde și proprietățile mecanice. Din dorința de a păstra funcția de bază a osului, această metodă de prelucrare a fost exclusă din start. La prelucrarea osului cu acizii, anumite componente ale MEC se pot solubiliza ceea ce duce din nou la demineralizarea carcsei osoase. De asemenea, prelucrarea termică sau/și cu acizi poate crește toxicitatea matricei [235, 236, 237]. Într-un final am optat pentru un protocol în care avem o soluție izotonică, un agent de chelare, un detergent și o soluție enzimatică. În mod specific, această combinație facilitează o decelularizare eficientă, menținând concomitent integritatea colagenului și a calciului fosfat în grefele osoase spongioase [212, 238].

Utilizarea soluției de EDTA ca primul pas în protocol a fost realizat pe contul efectului său de chelare. Chelarea calciului este importantă pentru slăbirea legăturilor dintre celulele din țesut,

facilitând astfel îndepărtarea lor ulterioară mai ușor. Fiind totuși un acid, durata de expunere a fost una scurtă pentru a preveni distrugerea colagenului. Detergentul de bază, SDS, a fost ales în concentrație de 0,5% din intenția de a minimaliza efectul secundar asupra MEC vasculare.

SDS este descris în literatură în concentrații diferite, variind pentru țesutul osos între 0,5% - 3% [236, 238, 239]. Incercarea de a mări concentrația de detergent, dublu (de la 0,5% la 1%), cu scopul de a obține un rezultat mai bun, nu a schimbat semnificativ cantitatea de ADN rezidual (figura 36), din aceste considerente am păstrat concentrația minimă a detergentului încercând să minimalizez efectele secundare asupra componentei vasculare și spongioase a MECov.

Triton X-100 a fost aplicat după SDS în acest studiu deoarece este un detergent neionic care poate perturba interacțiunile lipid-lipid și lipid-proteină, îndepărtând grăsimea din grefă. Absența grăsimii reziduală va preveni absorbția proteinelor și va încuraja aderența celulelor [225, 240].

Spre deosebire de soluțiile de bază utilizate în decelularizare, PBS-ul este o soluție tampon utilizată în mare parte pentru spălare și îndepărtarea reziduurilor celulare, menținerea homeostaziei osmotice (prin menținerea pH-ului și concentrația de săruri la niveluri constante) și neutralizarea substanțelor chimice folosite în procesul de decelularizare. Această spălare reprezintă un pas important în pregătirea pentru utilizarea ulterioară, deoarece majoritatea soluțiilor utilizate pot influența într-un mod negativ biocompatibilitatea MEC prin creșterea toxicității acestora [241].

Utilizarea soluției enzimatică (DNaza) a jucat un rol important în eliminarea fragmentelor mici de ADN celular restante în MEC vasculară (figura 24). Aceste fragmente pot fi o sursă potențială la declanșarea reacției imune. DNaza este selectivă țintită pentru ADN și nu afectează structura 3D a MEC, aceasta a demonstrat-o chiar și examinările histologice din acest studiu, în care structura MEC poate fi ușor vizualizată (figura 25, figura 26, figura 27, anexa 1). Prin urmare, utilizarea DNazei permite menținerea integrității și funcționalității MEC iar absența ADN-ului celular (anexa 1) reduce riscul de reacții imune și permite o integrare mai eficientă a celulelor însămânțate (optimizarea biocompatibilității) [34, 167, 242]. Fiind analizate și metodele propriu-zise de realizare a protocolului, perfuzarea soluțiilor vs centrifugarea acestora, am constatat că de fapt fluxul pulsatil al soluțiilor este mai benefic decât fluxul continuu pentru perfuzia tisulară [34, 81, 135]. Astfel, am optat pentru perfuzarea pulsatilă a soluțiilor protocolului de decelularizare, pentru grefa osoasă compozită vascularizată.

Testarea protocolului s-a inițiat pe țesut moale, grefe sanguine cu diferite diametre, acest moment fiind crucial pentru atingerea obiectivului principal al studiului. În literatura de specialitate, se menționează despre sensibilitatea crescută a vaselor de mic calibru (cu diametrul mai mic de 6 mm conform unor surse, sau mai mic de 4 mm conform altora) față de protocoalele de decelularizare. Acestea sunt mai predispuse la traumatizare în timpul procesării și, în consecință, pot deveni bioincompatibile, trombogene și insuficient de rezistente la stresul mecanic.

Prin urmare, în cazul în care protocolul se dovedea a fi prea agresiv, rezultând într-un pedicul vascular incompatibil pentru anastomoză microchirurgicală, continuarea studiului pe baza acestui protocol ar fi devenit imposibilă [82, 243].

Aprecierea eficacității metodei de decelularizar

Unul din criteriile cele mai simple de apreciere a eficacității decelularizării sunt schimbările caracteristicilor macroscopice (culoarea, consistența, rezistența, etc.). De cele mai multe ori, țesutul procesat capătă o culoare palidă. Cu toate acestea, doar aspectul macroscopic este insuficient pentru a determina eficiența și amploarea decelularizării. Deși nu există un consens universal pentru criteriile de decelularizare, au început tot mai mult să apară criteriile de bază pentru o MEC standard. Eșecul decelularizării unui țesut duce la rezultate negative la implantarea *in vivo*, cum ar fi un răspuns proinflamator exagerat și fibroză ulterioară [40]. S-au propus anumite criterii de bază, relativ stricte, pentru a stabili o decelularizare suficientă, dintre acestea fac parte: (i) lipsa materialului nuclear vizibil în analiza histologică cu H&E sau DAPI, (ii) o cantitate <50 ng de ADN dublu catenar per mg de țesut procesat, (iii) prezența fragmentelor de ADN în țesutul procesat <200 bp în lungime [34].

Așa cum studiul nostru a fost inițiat cu decelularizarea grefelor vasculare, colorația H&E a fost efectuată pentru probele vasculare native și cele decelularizate. Cu toate acestea s-a observat o sensibilitate limitată a colorația H&E față de materialul nuclear, chiar dacă acesta era lipsă în grefele procesate fără prelucrarea cu DNază (figura 24C) la colorația DAPI s-a determinat material nuclear din abundență (figura 24D), din aceste considerente am decis continuarea protocolului cu utilizarea soluției enzimatică eliminând în așa mod toate componentele celulare.

Pentru examinarea histologică, țesutul osos a suportat o prelucrare suplimentară, decalcifierea. Această etapă a fost una necesară pentru a face posibilă secționarea țesutului osos (după înlăturarea componentelor minerale) și fixare pe lame pentru ulterioara colorare histologică. Cel mai des utilizat agent pentru decalcifiere este EDTA, acest agent a stat și la baza soluției utilizate în acest studiu, țin să menționez că decalcifierea nu influențează procesul de decelularizare, astfel rezultatele examinării histologice efectuate pentru probele osoase pot fi interpretate ca fiind veridice, iar procesul de decalcifiere efectuat după decelularizare, până la examinarea histologică, nu afectează rezultatele propriu-zise [244, 245]. În cele din urmă, am demonstrat că soluțiile protocolului pot decelulariza calitativ țesutul moale (grefe vasculare și perios) precum și țesut dur (țesutul osos) prin analiza histologică a probelor native vs cele procesate. Acestea au arătat lipsa materialului celular la colorația H&E și DAPI.

Rezultatele cuantificării ADN-ului pentru probelor osoase corticale și spongioase native vs procesate s-au dovedit a fi mai mare mare decât cele recomandate (<50 ng de ADN dublu catenar per mg de țesut procesat). Astfel de rezultate s-au determinat și în alte studii, aceasta fiind explicat

prin faptul că metodele utilizate pentru cuantificare au fost diferite. De cele mai multe ori, ADN-ul este izolat din țesut și apoi cuantificat cu un test numit Pico Green, în acest studiu ADN-ul a fost măsurat direct în țesutul digerat cu Hoechst 33258, ceea ce ar putea duce la un fon mai mare din cauza interferenței cu materialul digerat [84]. Cu toate acestea, interpretarea cantitativă (statistică) a rezultatelor obținute la cuantificare ADN-ului a arătat o scădere nesemnificativă statistic la nivelul osului cortical și o scădere semnificativ statistic la nivelul osului spongios (figura 33, figura 34, figura 35, figura 36, figura 37). Găsim mai mult decât logic interpretare datelor, întrucât osul cortical se caracterizează ca fiind un os dens, cu un număr de celule mult mai scăzut *vs* osul spongios. În unele probe de os cortical nativ s-a determinat o cantitatea de ADN aproape egală cu cantitatea de ADN în osul spongios decelularizat (figura 35, figura 36), dar așa cum am menționat anterior, osul cortical conține o MEC densă, bogată în colagen și săruri minerale, ceea ce reprezintă un bun suport mecanic pentru MECOV [246].

Examinarea SEM a fost utilizată în acest studiu ca cel mai versatil instrument de examinare a morfologiei microstructurii osoase. Am determinat modificări minore la nivelul componentei spongioase a grefei *vs* lipsa schimbărilor la nivelul componentei corticale (anexa 2). Astfel, deduc din consecutivitatea evenimentelor că osul spongios supus modificărilor se poate reabsoarbi mai ușor în timpul transplantării, asigurând astfel o altă proprietate importantă a MEC ideale, biodegradarea [247].

Testarea biocompatibilității prin recelularizarea *in vitro* a MEC obținute

Așa cum elementul de bază a unei grefe obținute prin IT este ulterioara aplicare cu succes *in vivo*, testul de biocompatibilitate efectuat *in vitro* este util pentru aprecierea potențialului de aderență și multiplicare celulară. Din momentul în care inițierea angiogenezei și vasculogenezei sunt provocările de bază pentru astfel de țesuturi (obținute prin IT), utilizarea celulelor endoteliale este încurajată. Ca sursă de celule endoteliale în acest studiu am utilizat celulele HUVEC, iar mediului endotelial celular specific a fost utilizat pe toată durata testului de biocompatibilitate (inclusiv pentru 72h de pregătire prealabilă/preconționare a MEC) și are ca scop susținerea proliferării celulare [248]. Utilizarea serului fetal bovin (FBS) în componența mediului celular ajută aderența și proliferarea celulară, iar preconționarea grefelor cu mediu celular + FBS este utilizată în unele lucrări ca metodă la înlăturarea ADN-ului rezidual [84, 249].

Termenul de „preconționare” este utilizat pentru procesul de pregătire a MEC în intenția de a îmbunătăți biocompatibilitate MEC. Această etapă este o practică comună pentru a stimula condițiile reale pe care MEC le-ar putea întâlni *in vivo* și pentru a asigura un rezultat maxim posibil. Durata și intensitatea preconționării variază în funcție de tipul MEC și metoda utilizată pentru decelularizare. De cele mai multe ori, pentru preconționarea MEC naturale și a celulelor, sunt utilizate medii celulare speciale, factori de creștere, temperaturi specifice sau anumiți factori

traumatici precum hipoxia indusă [250, 251]. Precondiționarea în studiul dat a fost realizată prin incubarea MEC vasculare și osoase în mediu specific + FBS la temperatura de 37°C. Încercarea de a scurta perioada de incubare de la 72 h la 24 h, a arătat un rezultat negativ cu moarte celulară la a 5-a zi după însămânțare (figura 39), aceste rezultate au demonstrat importanța precondiționării grefelor.

Alegerea celulelor pentru însămânțare a fost una logică. Celulele stem din măduva osoasă sunt preferabile pentru testarea biocompatibilității grefelor osoase din mai multe motive: (i) Potențialul lor regenerativ – BM MSC au capacitatea de a se diferenția în multiple linii celulare, inclusiv celule osoase și celule endoteliale. Astfel, capacitatea acestor celule de a se diferenția în celule specifice necesare pentru regenerarea osoasă și vasculară este crucială pentru evaluarea biocompatibilității grefelor osoase vascularizate; (ii) Interacțiunea cu structurile 3D osoasă – BM MSC sunt adaptate structurilor osoase și au capacitatea de a interacționa cu acesta în mod natural. Utilizarea acestor celule în testele de biocompatibilitate oferă informații valoroase despre modul în care MEC osoasă se integrează cu celulele stem în procesul de regenerare; (iii) Disponibilitatea: BM MSC pot fi obținute și cultivate relativ ușor [252].

Celulele HUVEC reprezintă candidatul perfect pentru MEC vasculare în primul rând din considerentele că sunt celule endoteliale, adică celule care căptușesc intima vaselor. Aceste celule sunt esențiale pentru formarea și menținerea vaselor de sânge [246].

Rezultatele pozitive la creșterea celulelor pe grefele osoase avasculare *vs* creșterea mai puțin abundentă la nivelul grefei compozite vascularizate ne poate sugera că metoda de însămânțare celulară variază în dependență de tipul MEC (avasculară sau pe pedicul vascular). Metoda de însămânțare este discutată și cercetată intens în ultimii ani, fiind considerată la fel de importantă precum tipul de celule și calitatea MEC. Alegerea metodei corecte poate dicta la rândul său proliferarea, migrarea și fenotipul celulelor pe măsura dezvoltării unui nou țesut. Sunt puse în discuție câteva momente de bază ce țin de acest proces. Spre exemplu obținerea unei distribuții uniforme a celulelor viabile este extrem de importantă și se poate dovedi o provocare, în special pentru structurile vasculare tubulare sau structurile 3D. Sunt investigate diferite tehnici de însămânțare, și cea mai utilizată este picurarea suspensiei de celule pe suprafața schelei, o metodă simplă, sigură și utilă pentru grefele cu suprafețe plate [253]. Eficacitatea metodei o putem observa și în studiul dat la rezultatele testului de biocompatibilitate pentru MEC osoase și vasculare (figura 39, figura 41, figura 42).

Pentru MECOV în acest studiu, am utilizat combinarea metodelor de însămânțare, adică picurarea suspensiei cu celule pe suprafața uniformă a grefei (obținute prin osteotomie) + injectarea celulelor în pediculul vascular, fără utilizarea sistemului de perfuzie. Warren et al. sugerează că perfuzia soluțiilor celulare, în special rata de perfuzie îmbunătățește radical numărul

de celule, distribuțiile celulare și cantitățile proteinelor și mineralelor în grefele osase obținute rin IT vs creșterea densității de însămânțare (celule/ml) care nu influențează în mod semnificativ toate aceste caracteristici [254]. Cu toate acestea, consider că unul din factorii care au limitat dezvoltarea celulară pe MECOv pentru un termen mai lung decât 4 zile a fost numărul mic de celule însămânțate (1 mil celule/ml), total - 3 ml soluție. Consider această cantitate insuficientă, deoarece unele surse oferă o cantitate de 1 mil/cm² pentru a obține o creștere celulară bună [256].

În final, pot considera destul de biocompatibilitate *in vitro* unul pozitiv. Aceasta ne vorbește despre păstrarea structurii MECOv după decelularizare, lipsa toxicității, și potențialul acestei MECOv de a susține aderența, creșterea și diferențierea celulară.

Astfel, rezultatele obținute în urma acestui studiu ne-au încurajat să continuăm cu transplantarea *in vivo* a MECOv decelularizate prin protocolul testat, drept o următoare etapă în cercetarea metodelor noi de tratament a defectelor mavise de os [9, 59, 66, 139, 257].

CONCLUZII GENERALE

1. Treimea proximală a osului tibial reprezintă o sursă promițătoare pentru dezvoltarea alogrefelor osoase compozite vascularizate. Aceste grefe pot servi ca platformă pentru studierea proceselor de obținere a matricei extracelulare osoase vascularizate și decelularizate.
2. Metoda optimă de decelularizare a grefei osoase cu păstrarea sursei de vascularizare, poate fi un protocol pe bază de detergent SDS cu o concentrație de 0.5% și o soluție enzimatică (DNază). Acest protocol permite obținerea matricelor extracelulare osoase vascularizate, păstrând integritatea pediculului vascular.
3. Utilizarea metodelor calitative (H&E, DAPI, SEM) și a celor cantitative (cuantificarea ADN-ului) este obligatorie pentru testarea eficacității metodei de decelularizare a grefelor osoase compozite vascularizate. Doar interpretarea în ansamblu a rezultatelor obținute poate prezice biocompatibilitatea *in vivo* a alogrefei.
4. Utilizarea celulelor HUVEC și a celulelor stem din măduva osoasă reprezintă o sursă valoroasă de celule pentru testarea *in vitro* a potențialului de recelularizare a matricei extracelulare vasculare și osoase. Obținerea recelularizării *in vitro* a MECOV poate sugera un potențial imunogen scăzut și un grad ridicat de biocompatibilitate a alogrefei.

RECOMANDĂRI PRACTICE

Recomandările ce pot fi utile pentru viitoarele studii preclinice, sunt:

1. Utilizarea treimeii proximale a tibiei ca material sigur pentru testarea *in vitro* a metodelor de obținere a matricelor extracelulare osoase vascularizate decelularizare;
2. Utilizarea soluției enzimaticice în protocolului de decelularizare pentru eliminarea eficientă al ADN-ului din componența grefei;
3. Utilizarea metodelor de condiționare a matricei extracelulare decelularizate pentru accentuarea proprietățile de bază a acesteia și susținerea viabilității, aderenței și multiplicării celulare;
4. Testarea *in vivo* a biocompatibilității și a gradului de imunogenitate a alogrefei osoase vascularizate obținute prin decelularizate;
5. Aprecierea gradului de integrare *in vivo* prin evaluarea procesului de remodelare a alogrefei osoase vascularizate decelularizate și testarea rezistenței mecanice a acesteia după transplantare utilizând testele funcționale și imagistice.

Bibliografie:

1. Liu J, Zhou P, Long Y, Huang C, Chen D. Repair of bone defects in rat radii with a composite of allogeneic adipose-derived stem cells and heterogeneous deproteinized bone. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2018 Mar 27;9(1):79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-018-0817-1>
2. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015 Jul 13;2015:421746. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/421746>
3. Iordăchescu R, **Stoian A**, Gornea T, Ivanov V, Verega G. Corticoperiosteal-skin flap in the treatment of septic pseudarthrosis of the calf. Clinical case. 2020; Available from: <https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/15224>
4. Verega G. *Lambourile insulare ale membrului pelvin*. Tipografia Centrală, Chișinău; 2008.
5. Andrzejowski P, Masquelet A, Giannoudis PV. Induced Membrane Technique (Masquelet) for Bone Defects in the Distal Tibia, Foot, and Ankle: Systematic Review, Case Presentations, Tips, and Techniques. *Foot Ankle Clin* [Internet]. 2020 Dec;25(4):537–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcl.2020.08.013>
6. Baldwin P, Li DJ, Auston DA, Mir HS, Yoon RS, Koval KJ. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J Orthop Trauma* [Internet]. 2019 Apr;33(4):203–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/BOT.0000000000001420>
7. Iordăchescu R, Verega G, Cotorobai E, Zagadailov D. Complications in treatment of tibial bone defects using Ilizarov procedure [Internet]. [cited 2024 Feb 23]. Available from: <https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/14076>
8. Stahl A, Yang YP. Regenerative Approaches for the Treatment of Large Bone Defects. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2021 Dec;27(6):539–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEB.2020.0281>
9. Pavlovschi E, **Stoian A**, Verega G, Nacu V. The Critical Size Bone Defects - In-Vivo Experimental Method of the Treatment with the Decellularized Vascularized Bone Allografts. In: 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering [Internet]. Springer Nature Switzerland; 2024. p. 332–47. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-031-42775-6_37
10. Smith CA, Board TN, Rooney P, Eagle MJ, Richardson SM, Hoyland JA. Correction: Human decellularized bone scaffolds from aged donors show improved osteoinductive capacity compared to young donor bone. *PLoS One* [Internet]. 2017 Nov 2;12(11):e0187783. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0187783>
11. **Stoian A**, Pavlovschi E, Iordăchescu R, Mihaluța V, Macagonova O, Malcova T, et al. Future perspective of vascularized bone allotransplantation. 2020; Available from: <https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/12877>
12. Rasch A, Naujokat H, Wang F, Seekamp A, Fuchs S, Klüter T. Evaluation of bone allograft processing methods: Impact on decellularization efficacy, biocompatibility and mesenchymal stem cell functionality [Internet]. Vol. 14, *PLOS ONE*. 2019. p. e0218404. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0218404>
13. Titsinides S, Agrogiannis G, Karatzas T. Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review. *Jpn Dent Sci Rev* [Internet]. 2019 Nov;55(1):26–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdsr.2018.09.003>
14. Guo L, Liang Z, Yang L, Du W, Yu T, Tang H, et al. The role of natural polymers in bone

- tissue engineering. *J Control Release* [Internet]. 2021 Oct 10;338:571–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.08.055>
15. VandeVord PJ, Nasser S, Wooley PH. Immunological responses to bone soluble proteins in recipients of bone allografts. *J Orthop Res* [Internet]. 2005 Sep;23(5):1059–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.orthres.2004.12.004>
 16. Shegarfi H, Reikeras O. Review article: bone transplantation and immune response. *J Orthop Surg* [Internet]. 2009 Aug;17(2):206–11. Available from: <https://journals.sagepub.com/doi/pdf/10.1177/230949900901700218>
 17. Grosu-Bularda A, Vermeșan O, Lăzărescu L, Lascăr I. Imunosupresia în transplantul alogrefelor vascularizate compozite. *Romanian Journal of Medical Practice* [Internet]. 2016;11(2). Available from: <https://pdfs.semanticscholar.org/a9d5/6f70e58df9c16df8e82323dfb2b638e82bf6.pdf>
 18. Garreta E, Oria R, Tarantino C, Pla-Roca M, Prado P, Fernández-Avilés F, et al. Tissue engineering by decellularization and 3D bioprinting. *Mater Today* [Internet]. 2017 May 1;20(4):166–78. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369702116304278>
 19. Huang WC, Lin JY, Wallace CG, Chuang WY, Wei FC, Liao SK. Vascularized bone grafts within composite tissue allotransplants can autogenerate tolerance through mixed chimerism with partial myeloablative conditioning: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 2010 Apr;125(4):1095–103. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181d0ab80>
 20. Kremer T, Giusti G, Friedrich PF, Willems W, Bishop AT, Giessler GA. Knee joint transplantation combined with surgical angiogenesis in rabbits--a new experimental model. *Microsurgery* [Internet]. 2012 Feb;32(2):118–27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.20946>
 21. Yaremchuk MJ, Sedacca T, Schiller AL, May JW Jr. Vascular knee allograft transplantation in a rabbit model. *Plast Reconstr Surg* [Internet]. 1983 Apr;71(4):461–72. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6338545>
 22. Nacu V. Optimizarea regenerării osoase posttraumatice deregulate. Tipografia Sirius, Chișinău; 2010.
 23. Goldberg VM, Powell A, Shaffer JW, Zika J, Stevenson S, Davy D, et al. The Role of Histocompatibility in Bone Allografting. In: *Bone Transplantation* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 1989. p. 126–34. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-83571-1_18
 24. Langer F, Czitrom A, Pritzker KP, Gross AE. The immunogenicity of fresh and frozen allogeneic bone. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 1975 Mar;57(2):216–20. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1089670>
 25. Weiland AJ. Fate of Vascularized Bone Grafts [Internet]. *Bone Transplantation*. 1989. p. 29–50. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-83571-1_4
 26. Mshvidobadze MV. [Allotransplantation of formalinized bones and articular ends in long tubular bone defects]. *Ortop Travmatol Protez* [Internet]. 1979;(3):46–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/382021>
 27. Parmaksiz M, Elçin AE, Elçin YM. Biomimetic 3D-Bone Tissue Model. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2021;2273:239–50. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-0716-1246-0_17
 28. Zhang Y, Wu D, Zhao X, Pakvasa M, Tucker AB, Luo H, et al. Stem Cell-Friendly Scaffold

- Biomaterials: Applications for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2020 Dec 14;8:598607. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2020.598607>
29. Kumar N, Kumar V, Purohit S, Gangwar AK, Shrivastava S, Maiti SK, et al. Decellularization of Skin Tissue. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2021;1345:165–91. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-82735-9_15
 30. Lin X, Patil S, Gao YG, Qian A. The Bone Extracellular Matrix in Bone Formation and Regeneration. *Front Pharmacol* [Internet]. 2020 May 26;11:757. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fphar.2020.00757>
 31. Perić Kačarević Ž, Rider P, Alkildani S, Retnasingh S, Pejakić M, Schnettler R, et al. An introduction to bone tissue engineering. *Int J Artif Organs* [Internet]. 2020 Feb;43(2):69–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/0391398819876286>
 32. Mercado-Pagán ÁE, Stahl AM, Shanjani Y, Yang Y. Vascularization in bone tissue engineering constructs. *Ann Biomed Eng* [Internet]. 2015 Mar;43(3):718–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10439-015-1253-3>
 33. Vacanti JP, Vacanti CA. The history and scope of tissue engineering. In: *Principles of tissue engineering* [Internet]. Elsevier; 2014. p. 3–8. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012398358900001X>
 34. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials* [Internet]. 2011 Apr;32(12):3233–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>
 35. Zhang X, Chen X, Hong H, Hu R, Liu J, Liu C. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioact Mater* [Internet]. 2022 Apr;10:15–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.09.014>
 36. Granato AEC, da Cruz EF, Rodrigues-Junior DM, Mosini AC, Ulrich H, Rodrigues BVM, et al. A novel decellularization method to produce brain scaffolds. *Tissue Cell* [Internet]. 2020 Jul 22;67:101412. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tice.2020.101412>
 37. Fazelian-Dehkordi KH, Mesbah Ardekani SF, Talaei-Khozani T. Quality Comparison of Decellularized Omentum Prepared by Different Protocols for Tissue Engineering Applications. *Cell J* [Internet]. 2022 May;24(5):267–76. Available from: <http://dx.doi.org/10.22074/cellj.2022.7968>
 38. Inci I, Dizaji AN, Ozel C, Morali U, Guzel FD, Avci H. Decellularized Inner Body Membranes for Tissue Engineering: A Review. *J Biomater Sci Polym Ed* [Internet]. 2020 Apr 6;1–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2020.1751523>
 39. Macagonova O, Cociug A, Braniște T. Structural and physical characteristics of the dermal decellularized structures evaluation. *Moldovan Medical Journal* [Internet]. 2022; Available from: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/173108
 40. Macagonova O, Cociug A. Biological skin tissue engineering for wound dressings. In: *MedEspera* [Internet]. 2022. p. 391–391. Available from: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/163270
 41. Li Y, Zhou Y, Qiao W, Shi J, Qiu X, Dong N. Application of decellularized vascular matrix in small-diameter vascular grafts. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2022;10:1081233. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2022.1081233>
 42. Petrie K, Cox CT, Becker BC, MacKay BJ. Clinical applications of acellular dermal matrices: A review. *Scars Burn Heal* [Internet]. 2022 Jan 19;8:20595131211038313. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/20595131211038313>

43. Cebotari S, Lichtenberg A, Tudorache I, Hilfiker A, Mertsching H, Leyh R, et al. Clinical application of tissue engineered human heart valves using autologous progenitor cells. *Circulation* [Internet]. 2006 Jul 4;114(1 Suppl):I132–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.001065>
44. Masson-Meyers DS, Tayebi L. Vascularization strategies in tissue engineering approaches for soft tissue repair. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2021 Sep;15(9):747–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/term.3225>
45. Timbalari T. Estimating the clinical needs for tissues and cells in the Republic of Moldova. *The Moldovan Medical Journal* [Internet]. 2020 [cited 2023 Nov 18];63(1):19–25. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/estimating-the-clinical-needs-for-tissues-and-cells-in-the-republic-of-moldova>
46. Codreanu I, Lozan O, Timbalari T. EVALUATION OF THE TRANSPLANT SYSTEM IN THE REPUBLIC OF MOLDOVA. *Management in Health* [Internet]. 2015 [cited 2023 Nov 18]; Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/d670ba4165638ed03d48b76a41003392fb724cc9>
47. Ray RD. Vascularization of bone grafts and implants. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 1972 Sep [cited 2023 Feb 15];87(9):43–8. Available from: https://journals.lww.com/corr/citation/1972/09000/vascularization_of_bone_grafts_and_implants.8.aspx
48. Ion M. Aspecte de regenerare, consolidare și restructurare a alogrefelor osoase, implantate în defecte restante posttumorale ale aparatului locomotor. *Arta Medica* [Internet]. 2009 Aug 3 [cited 2023 Feb 15];37(4):3–6. Available from: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/9580
49. Enneking WF, Campanacci DA. Retrieved human allografts : a clinicopathological study. *J Bone Joint Surg Am* [Internet]. 2001 Jul;83(7):971–86. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11451965>
50. Ashammakhi N, GhavamiNejad A, Tutar R, Fricker A, Roy I, Chatzistavrou X, et al. Highlights on Advancing Frontiers in Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2022 Jun;28(3):633–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEB.2021.0012>
51. Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. *J Pediatr Surg* [Internet]. 2016 Jan;51(1):8–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022>
52. **Stoian A**, Pavlovschi E, Caproș N, Verega G, Nacu V. Effectiveness of Tissue Engineering in Obtaining the Extracellular Composite Vascularized Bone Matrix. In: 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering [Internet]. Springer Nature Switzerland; 2024. p. 357–65. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-031-42775-6_39
53. Pereira HF, Cengiz IF, Silva FS, Reis RL, Oliveira JM. Scaffolds and coatings for bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. 2020 Mar 2;31(3):27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-020-06364-y>
54. Peneda Pacheco D, Suárez Vargas N, Visentin S, Petrini P. From tissue engineering to engineering tissues: the role and application of in vitro models. *Biomater Sci* [Internet]. 2021 Jan 5;9(1):70–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/d0bm01097a>
55. Nacu V, Coșciug S, Cobzac V, Tîmbăları T. Medicina regenerativă în restabilirea țesuturilor scheletice. 2017; Available from: <http://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/9688>
56. Macagonova O, Cociug A, Taralunga CT. The effectiveness of the tissue engineering in the obtaining of the biological materials from the extracellular matrix. *Moldovan Medical* [Internet]. 2023; Available from: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/193484

57. Sarvazyan N. Tissue Engineering: Principles, Protocols, and Practical Exercises [Internet]. Springer Nature; 2020. 154 p. Available from: <https://play.google.com/store/books/details?id=wNDaDwAAQBAJ>
58. Syed O, Walters NJ, Day RM, Kim HW, Knowles JC. Evaluation of decellularization protocols for production of tubular small intestine submucosa scaffolds for use in oesophageal tissue engineering. *Acta Biomater* [Internet]. 2014 Dec;10(12):5043–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2014.08.024>
59. Pavlovschi E, **Stoian A**, Verega G, Nacu V. In vivo experimental study of the arterial supply of the rabbit posterior limb. *Moldovan Medical Journal* [Internet]. 2021; Available from: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/146622
60. Walma DAC, Yamada KM. The extracellular matrix in development. *Development* [Internet]. 2020 May 28;147(10). Available from: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.175596>
61. Namjoo AR, Abrbekoh FN, Saghati S, Amini H, Saadatlou MAE, Rahbarghazi R. Tissue engineering modalities in skeletal muscles: focus on angiogenesis and immunomodulation properties. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2023 Apr 15;14(1):90. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-023-03310-x>
62. Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science* [Internet]. 2002 Feb 8;295(5557):1009–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1069210>
63. Messner F, Guo Y, Etra JW, Brandacher G. Emerging technologies in organ preservation, tissue engineering and regenerative medicine: a blessing or curse for transplantation? *Transpl Int* [Internet]. 2019 Jul;32(7):673–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/tri.13432>
64. Zhu J, Wang Y, Zhong L, Pan F, Wang J. Advances in tissue engineering of vasculature through three-dimensional bioprinting. *Dev Dyn* [Internet]. 2021 Dec;250(12):1717–38. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/dvdy.385>
65. Zhang J, Xu W, Li C, Meng F, Guan Y, Liu X, et al. Tissue Engineering Microtissue: Construction, Optimization, and Application. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2022 Apr;28(2):393–404. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEB.2020.0370>
66. Pavlovschi E, **Stoian A**. The vascularized bone allotransplantation-in a rabbit model, preliminary report. *MedEspera* [Internet]. 2020; Available from: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/117306
67. Khademhosseini A, Langer R, Borenstein J, Vacanti JP. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2006 Feb 21;103(8):2480–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0507681102>
68. Birla R. Introduction to Tissue Engineering: Applications and Challenges [Internet]. John Wiley & Sons; 2014. 360 p. Available from: https://play.google.com/store/books/details?id=r1_CAwwAAQBAJ
69. Novosel EC, Kleinhans C, Kluger PJ. Vascularization is the key challenge in tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2011 Apr 30;63(4-5):300–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.004>
70. **Stoian A**, Fortuna E, Mihaluta V, Iordăchescu R. The use of latissimus dorsi flap in reconstruction of a massive soft tissue defect after oncological ablation of the back. 2020; Available from: <https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/15211>
71. Mihaluta V, **Stoian A**, Iordaschescu R, Pavlovschi E, Cociug A, Bors E, et al. Plasty of Achilles region with propeller tendon-fasciocutaneous peroneal artery perforator flap after radical excision of a neglected squamous cell carcinoma. *Arch Clin Cases* [Internet]. 2018

- Sep 31 [cited 2023 Sep 24];05(03):104–8. Available from: <https://www.clinicalcases.eu/index.php/acc/article/view/469>
72. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng* [Internet]. 2011;2:403–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257>
 73. Shoji T, Breuer C, Shinoka T. Tissue-Engineered Vascular Grafts for Children [Internet]. *Tissue-Engineered Vascular Grafts*. 2020. p. 1–16. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-71530-8_19-1
 74. Pashneh-Tala S, MacNeil S, Claeysens F. The Tissue-Engineered Vascular Graft—Past, Present, and Future [Internet]. Vol. 22, *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2016. p. 68–100. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.teb.2015.0100>
 75. Weinberg CB, Bell E. A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells. *Science* [Internet]. 1986 Jan 24;231(4736):397–400. Available from: <http://dx.doi.org/10.1126/science.2934816>
 76. Matsuzaki Y, John K, Shoji T, Shinoka T. The Evolution of Tissue Engineered Vascular Graft Technologies: From Preclinical Trials to Advancing Patient Care. *Appl Sci* [Internet]. 2019 Apr;9(7). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/app9071274>
 77. Bergmeister H, Podesser BK. Preclinical In-Vivo Assessment of Tissue Engineered Vascular Grafts and Selection of Appropriate Animal Models [Internet]. *Tissue-Engineered Vascular Grafts*. 2020. p. 1–31. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-319-71530-8_5-1
 78. Malcova T, Globa L, Vascan A, Țugui E, **Stoian A**, Nacu V. Mechanical and Morphological Characterization of Decellularized Umbilical Vessels as Tissue Engineering Scaffolds. In: *4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering* [Internet]. Springer International Publishing; 2020. p. 589–93. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-31866-6_105
 79. Malcova T, Nacu V, Rojnoveanu G, Andrée B, Hilfiker A. Evaluation of Ultrasound Application for the Decellularization of Small Caliber Vessels. In: *5th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering* [Internet]. Springer International Publishing; 2022. p. 350–7. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-92328-0_46
 80. Lehr EJ, Rayat GR, Chiu B, Churchill T, McGann LE, Coe JY, et al. Decellularization reduces immunogenicity of sheep pulmonary artery vascular patches. *J Thorac Cardiovasc Surg* [Internet]. 2011 Apr;141(4):1056–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtcvs.2010.02.060>
 81. 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. *PLoS One* [Internet]. 2019 Aug 5;14(8):e0220743. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0220743>
 82. Grandi C, Baiguera S, Martorina F, Lora S, Amistà P, Dalzoppo D, et al. Decellularized bovine reinforced vessels for small-diameter tissue-engineered vascular grafts. *Int J Mol Med* [Internet]. 2011 Sep;28(3):315–25. Available from: <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2011.720>
 83. 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* [Internet]. 2018 Dec 17;13(12):e0209269. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0209269>
 84. Eyre K, Samper E, Haverich A, Hilfiker A, Andrée B. Re-endothelialization of non-detergent decellularized porcine vessels. *Artif Organs* [Internet]. 2020 Oct 1; Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/aor.13836>

85. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Blood Vessels and Endothelial Cells [Internet]. Garland Science; 2002 [cited 2023 Nov 21]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26848/>
86. Walpoth BH, Möller M. [Tissue engineering of vascular prostheses]. *Chirurg* [Internet]. 2011 Apr;82(4):303–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s00104-010-2029-9>
87. Yang Y, Lei D, Zou H, Huang S, Yang Q, Li S, et al. Hybrid electrospun rapamycin-loaded small-diameter decellularized vascular grafts effectively inhibit intimal hyperplasia. *Acta Biomater* [Internet]. 2019 Oct 1;97:321–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2019.06.037>
88. Pan Z, Sun W, Chen Y, Tang H, Lin W, Chen J, et al. Extracellular Vesicles in Tissue Engineering: Biology and Engineered Strategy. *Adv Healthc Mater* [Internet]. 2022 Nov;11(21):e2201384. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/adhm.202201384>
89. Bahraminasab M, Janmohammadi M, Arab S, Talebi A, Nooshabadi VT, Koohsarian P, et al. Bone Scaffolds: An Incorporation of Biomaterials, Cells, and Biofactors. *ACS Biomater Sci Eng* [Internet]. 2021 Dec 13;7(12):5397–431. Available from: <http://dx.doi.org/10.1021/acsbiomaterials.1c00920>
90. Reddy LVK, Murugan D, Mullick M, Begum Moghal ET, Sen D. Recent Approaches for Angiogenesis in Search of Successful Tissue Engineering and Regeneration. *Curr Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2020;15(2):111–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.2174/1574888X14666191104151928>
91. Kämmerer PW, Palarie V, Schiegnitz E, Nacu V, Draenert FG, Al-Nawas B. Influence of a collagen membrane and recombinant platelet-derived growth factor on vertical bone augmentation in implant-fixed deproteinized bovine bone--animal pilot study. *Clin Oral Implants Res* [Internet]. 2013 Nov;24(11):1222–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1600-0501.2012.02534.x>
92. Xing F, Xiang Z, Rommens PM, Ritz U. 3D Bioprinting for Vascularized Tissue-Engineered Bone Fabrication [Internet]. Vol. 13, *Materials*. 2020. p. 2278. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ma13102278>
93. Petite H, Viateau V, Bensaïd W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2000 Sep;18(9):959–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/79449>
94. Ehrler DM, Vaccaro AR. The use of allograft bone in lumbar spine surgery. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 2000 Feb;(371):38–45. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/00003086-200002000-00005>
95. Han W, Shen J, Wu H, Yu S, Fu J, Xie Z. Induced membrane technique: Advances in the management of bone defects. *Int J Surg* [Internet]. 2017 Jun 1;42:110–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1743919117303771>
96. Siemionow M. Vascularized composite allotransplantation: a new concept in musculoskeletal regeneration. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. 2015 Dec;26(12):266. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-015-5601-5>
97. Ng ZY, Read C, Kurtz JM, Cetrulo CL. Memory T Cells in Vascularized Composite Allotransplantation. *Vascularized Composite Allotransplantation* [Internet]. 2015 Oct 2;2(4):75–9. Available from: <https://doi.org/10.1080/23723505.2016.1229649>
98. Czitrom AA, Langer F, McKee N, Gross AE. Bone and cartilage allotransplantation. A review of 14 years of research and clinical studies. *Clin Orthop Relat Res* [Internet]. 1986 Jul;(208):141–5. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3522021>

99. Chiara G, Letizia F, Lorenzo F, Edoardo S, Diego S, Stefano S, et al. Nanostructured Biomaterials for Tissue Engineered Bone Tissue Reconstruction. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2012 Jan 11 [cited 2020 Dec 3];13(1):737–57. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/13/1/737>
100. Porzionato A, Stocco E, Barbon S, Grandi F, Macchi V, De Caro R. Tissue-Engineered Grafts from Human Decellularized Extracellular Matrices: A Systematic Review and Future Perspectives. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2018 Dec 18;19(12). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms19124117>
101. Cobzac V, Vereștiuc L, Jian M, Nacu V. Assessment of ionic and anionic surfactants effect on demineralized osteochondral tissue. *IOP Conf Ser: Mater Sci Eng* [Internet]. 2019 Jul 1 [cited 2024 Feb 23];572(1):012084. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/572/1/012084/meta>
102. Bueno EM, Diaz-Siso JR, Sisk GC, Chandawarkar A, Kiwanuka H, Lamparello B, et al. Vascularized composite allotransplantation and tissue engineering. *J Craniofac Surg* [Internet]. 2013 Jan;24(1):256–63. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/SCS.0b013e318275f173>
103. Yang P, Xing J, Liu J, Luo F, Wu X, Yu B, et al. Individual Tissue-Engineered Bone in Repairing Bone Defects: A 10-Year Follow-Up Study. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2020 Aug;26(15-16):896–904. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEA.2019.0287>
104. Xing J, Lu Y, Cui Y, Zhu X, Luo F, Xie Z, et al. A Standardized and Quality-Controllable Protocol of Constructing Individual Tissue-Engineered Grafts Applicable to Treating Large Bone Defects. *Tissue Eng Part C Methods* [Internet]. 2019 Mar;25(3):137–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEC.2018.0323>
105. Kim Y, Ko H, Kwon IK, Shin K. Extracellular Matrix Revisited: Roles in Tissue Engineering. *Int Neurourol J* [Internet]. 2016 May;20(Suppl 1):S23–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.5213/inj.1632600.318>
106. Taylor DA, Sampaio LC, Ferdous Z, Gobin AS, Taite LJ. Decellularized matrices in regenerative medicine. *Acta Biomater* [Internet]. 2018 Jul 1;74:74–89. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2018.04.044>
107. Hoshiba T, Lu H, Kawazoe N, Chen G. Decellularized matrices for tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2010 Dec;10(12):1717–28. Available from: <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.2010.534079>
108. Kay JF. Tissue-Engineered Bone Products [Internet]. *Principles of Tissue Engineering*. 2007. p. 1225–36. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/b978-012370615-7/50085-8>
109. Sharma D, Ross D, Wang G, Jia W, Kirkpatrick SJ, Zhao F. Upgrading prevascularization in tissue engineering: A review of strategies for promoting highly organized microvascular network formation. *Acta Biomater* [Internet]. 2019 Sep 1;95:112–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2019.03.016>
110. Banfi A, Holnthoner W, Martino MM, Ylä-Herttuala S. Editorial: Vascularization for Regenerative Medicine. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [Internet]. 2018;6:175. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fbioe.2018.00175>
111. Grosso A, Burger MG, Lunger A, Schaefer DJ, Banfi A, Di Maggio N. It Takes Two to Tango: Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis for Bone Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2017 Nov 3;5:68. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2017.00068>
112. Botchwey EA, Dupree MA, Pollack SR, Levine EM, Laurencin CT. Tissue engineered bone: Measurement of nutrient transport in three-dimensional matrices. *Journal of*

- Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials [Internet]. 2003;67(1):357–67. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/jbm.a.10111>
113. Murphy AR, Allenby MC. In vitro microvascular engineering approaches and strategies for interstitial tissue integration. *Acta Biomater* [Internet]. 2023 Nov;171:114–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2023.09.019>
 114. Liu X, Jakus AE, Kural M, Qian H, Engler A, Ghaedi M, et al. Vascularization of Natural and Synthetic Bone Scaffolds. *Cell Transplant* [Internet]. 2018 Aug;27(8):1269–80. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/0963689718782452>
 115. Lovett M, Lee K, Edwards A, Kaplan DL. Vascularization Strategies for Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2009 Sep 1;15(3):353–70. Available from: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0085>
 116. Shikimaka O, Bivol M, Sava BA, Dumitru M, Tardei C, Sbarcea BG, et al. Hydroxyapatite-bioglass nanocomposites: Structural, mechanical, and biological aspects. *Beilstein J Nanotechnol* [Internet]. 2022 Dec 12;13:1490–504. Available from: <https://www.beilstein-journals.org/bjnano/articles/13/123/?T=y>
 117. Waletzko J, Dau M, Seyfarth A, Springer A, Frank M, Bader R, et al. Devitalizing Effect of High Hydrostatic Pressure on Human Cells-Influence on Cell Death in Osteoblasts and Chondrocytes. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2020 May 28;21(11). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms21113836>
 118. Arenas-Herrera JE, Ko IK, Atala A, Yoo JJ. Decellularization for whole organ bioengineering. *Biomed Mater* [Internet]. 2013; Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1748-6041/8/1/014106/meta>
 119. Atala A. Methods and compositions for organ decellularization [Internet]. US Patent. 6376244, 2002 [cited 2020 Mar 22]. Available from: <https://patentimages.storage.googleapis.com/0b/ab/49/aea2b448149315/US6376244B1.pdf>
 120. Nassimzadeh M, Nassimzadeh AK, Power D. Hand transplant surgery. *Ann R Coll Surg Engl* [Internet]. 2014 Nov;96(8):571–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1308/003588414X13946184902767>
 121. Brandacher G, Sachs DH, Andrew Lee WP. Inaugural Issue of VCA-Vascularized Composite Allotransplantation [Internet]. Vol. 1, Vascularized Composite Allotransplantation. 2014. p. 1–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.4161/23723505.2014.973775>
 122. Kolegraff K, Kaufman C, Brandacher G. Defining Rejection in Vascularized Composite Allotransplantation: More than Just Arguing Semantics [Internet]. Vol. 2, Vascularized Composite Allotransplantation. 2015. p. 65–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/23723505.2016.1229650>
 123. Diaz-Siso JR, Bueno EM, Sisk GC, Marty FM, Pomahac B, Tullius SG. Vascularized composite tissue allotransplantation--state of the art. *Clin Transplant* [Internet]. 2013;27(3):330–7. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ctr.12117>
 124. Zor F. Facial Vascularized Composite Tissue Allotransplantation [Internet]. Vol. 55, *Gulhane Medical Journal*. 2013. p. 156. Available from: <http://dx.doi.org/10.5455/gulhane.39844>
 125. Baino F. Scaffolds in Tissue Engineering Materials, Technologies and Clinical Applications [Internet]. *BoD – Books on Demand*; 2017. 332 p. Available from:

<https://play.google.com/store/books/details?id=K-mPDwAAQBAJ>

126. Song JJ, Ott HC. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. *Trends Mol Med* [Internet]. 2011 Aug;17(8):424–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2011.03.005>
127. Startseva OI, Sinelnikov ME, Babayeva YV, Trushenkova VV. [Decellularization of organs and tissues]. *Khirurgiia* [Internet]. 2019;(8):59–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.17116/hirurgia201908159>
128. Gilbert TW. Strategies for tissue and organ decellularization. *J Cell Biochem* [Internet]. 2012 Jul;113(7):2217–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.24130>
129. Keane TJ, Badylak SF. The host response to allogeneic and xenogeneic biological scaffold materials. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2015 May;9(5):504–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/term.1874>
130. Badylak SF. The extracellular matrix as a scaffold for tissue reconstruction. *Semin Cell Dev Biol* [Internet]. 2002 Oct;13(5):377–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/s1084952102000940>
131. Faulk DM, Carruthers CA, Warner HJ, Kramer CR, Reing JE, Zhang L, et al. The effect of detergents on the basement membrane complex of a biologic scaffold material. *Acta Biomater* [Internet]. 2014 Jan;10(1):183–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2013.09.006>
132. Reing JE, Zhang L, Myers-Irvin J, Cordero KE, Freytes DO, Heber-Katz E, et al. Degradation products of extracellular matrix affect cell migration and proliferation. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2009 Mar;15(3):605–14. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0425>
133. Kwon T, Moon KH. Decellularization. In: Kim BW, editor. *Clinical Regenerative Medicine in Urology* [Internet]. Singapore: Springer Singapore; 2018. p. 125–41. Available from: https://doi.org/10.1007/978-981-10-2723-9_6
134. Bourguin PE, Pippenger BE, Todorov A Jr, Tchang L, Martin I. Tissue decellularization by activation of programmed cell death. *Biomaterials* [Internet]. 2013 Aug;34(26):6099–108. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.058>
135. Park SM, Yang S, Rye SM, Choi SW. Effect of pulsatile flow perfusion on decellularization [Internet]. Vol. 17, *BioMedical Engineering OnLine*. 2018. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s12938-018-0445-0>
136. Karamanos NK, Theocharis AD, Piperigkou Z, Manou D, Passi A, Skandalis SS, et al. A guide to the composition and functions of the extracellular matrix. *FEBS J* [Internet]. 2021 Dec;288(24):6850–912. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/febs.15776>
137. Liu C, Pei M, Li Q, Zhang Y. Decellularized extracellular matrix mediates tissue construction and regeneration. *Front Med* [Internet]. 2022 Feb;16(1):56–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11684-021-0900-3>
138. Hillebrandt KH, Everwien H, Haep N, Keshi E, Pratschke J, Sauer IM. Strategies based on organ decellularization and recellularization. *Transpl Int* [Internet]. 2019 Jun;32(6):571–85. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/tri.13462>
139. **Stoian A**, Pavlovschi E, Verega G, Birgit A, Hilfiker A, Nacu V. Experimental study in obtaining of a vascularised composite bone extracellular matrix [Internet]. *CEP Medicina*; 2023 [cited 2023 Sep 24]. Available from: <https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/24272>
140. Lichtenberg A, Akhyari P, Kamiya H, Mambou P, Tschierschke R, Ziegler H, et al.

- Decellularization reduces inflammatory reaction, calcification and extracellular matrix degeneration in pulmonary allografts [Internet]. Vol. 56, *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*. 2009. Available from: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0029-1191621>
141. El-Andari R, Bozso SJ, Jh Kang J, Fialka NM, Al-Adra D, Meyer SR, et al. Quantifying the immune response to a tissue-engineered porcine extracellular matrix. *Regen Med* [Internet]. 2023 Mar;18(3):229–37. Available from: <http://dx.doi.org/10.2217/rme-2022-0172>
 142. Padma AM, Alsheikh AB, Song MJ, Akouri R, Akyürek LM, Oltean M, et al. Immune response after allogeneic transplantation of decellularized uterine scaffolds in the rat. *Biomed Mater* [Internet]. 2021 May 19;16(4). Available from: <http://dx.doi.org/10.1088/1748-605X/abfdfe>
 143. Gvaramia D, Kern J, Jakob Y, Tritschler H, Brenner RE, Breiter R, et al. Modulation of the inflammatory response to decellularized collagen matrix for cartilage regeneration. *J Biomed Mater Res A* [Internet]. 2022 May;110(5):1021–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.37349>
 144. Das P, Singh YP, Mandal BB, Nandi SK. Tissue-derived decellularized extracellular matrices toward cartilage repair and regeneration. *Methods Cell Biol* [Internet]. 2020;157:185–221. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.11.005>
 145. Pereira AR, Rudert M, Herrmann M. Decellularized human bone as a 3D model to study skeletal progenitor cells in a natural environment. *Methods Cell Biol* [Internet]. 2020;157:123–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.11.018>
 146. Rougier G, Maistriaux L, Fievé L, Xhema D, Evrard R, Manon J, et al. Decellularized vascularized bone grafts: A preliminary in vitro porcine model for bioengineered transplantable bone shafts. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2022;10:1003861. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fbioe.2022.1003861/pdf>
 147. Tran NMP, Nguyen DT, Luong TD, Bui NH, Van Toi V, Nguyen TH. Decellularization of Bovine Cancellous Bone for Bone Tissue Engineering Application [Internet]. *IFMBE Proceedings*. 2020. p. 139–42. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-981-13-5859-3_22
 148. Ceccato J, Piazza M, Pizzi M, Manni S, Piazza F, Caputo I, et al. A bone-based 3D scaffold as an in-vitro model of microenvironment-DLBCL lymphoma cell interaction. *Front Oncol* [Internet]. 2022 Oct 18;12:947823. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fonc.2022.947823>
 149. Viji Babu PK, Rianna C, Mirastschijski U, Radmacher M. Nano-mechanical mapping of interdependent cell and ECM mechanics by AFM force spectroscopy. *Sci Rep* [Internet]. 2019 Aug 23;9(1):12317. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-48566-7>
 150. Yong I, Oh SW, Kim P. Re-engineered cell-derived extracellular matrix as a new approach to clarify the role of native ECM. *Methods Cell Biol* [Internet]. 2020 Jan 22;156:205–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.mcb.2019.12.007>
 151. Badylak SF, Taylor D, Uygun K. Whole-organ tissue engineering: decellularization and recellularization of three-dimensional matrix scaffolds. *Annu Rev Biomed Eng* [Internet]. 2011 Aug 15;13:27–53. Available from: <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-bioeng-071910-124743>
 152. 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* [Internet]. 2017 Mar 1;50:207–19. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2016.12.033>

153. Blaudez F, Ivanovski S, Hamlet S, Vaquette C. An overview of decellularisation techniques of native tissues and tissue engineered products for bone, ligament and tendon regeneration. *Methods* [Internet]. 2019 Aug 5; Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2019.08.002>
154. Böer U, Hurtado-Aguilar LG, Klingenberg M, Jockenhoewel S, Haverich A, Wilhelmi M. Effect of Intensified Decellularization of Equine Carotid Arteries on Scaffold Biomechanics and Cytotoxicity [Internet]. Vol. 49, *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*. 2015. p. 748. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejvs.2015.03.050>
155. Laschke MW, Menger MD. Prevascularization in tissue engineering: Current concepts and future directions. *Biotechnol Adv* [Internet]. 2016 Mar-Apr;34(2):112–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.12.004>
156. Carmeliet P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* [Internet]. 2000 Apr;6(4):389–95. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/74651>
157. Jian M, Cobzac V, Nacu V. The Isolation of Fibroblasts by Volumetric Regulation Cycles. In: 5th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering [Internet]. Springer International Publishing; 2022. p. 325–33. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-92328-0_43
158. Vitalie C, Andrei M, Mariana J, Viorel N. An efficient procedure of isolation, cultivation and identification of bone marrow mesenchymal stem cells. *The Moldovan Medical Journal* [Internet]. 2019 [cited 2024 Feb 23];62(1):35–40. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/an-efficient-procedure-of-isolation-cultivation-and-identification-of-bone-marrow-mesenchymal-stem-cells>
159. Jian M, Cobzac V, Mostovei A, Nacu V. The Procedure of Bone Cells Obtaining, Culture and Identification. In: 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering [Internet]. Springer International Publishing; 2020. p. 595–9. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-31866-6_106
160. Biniazan F, Stoian A, Haykal S. Adipose-Derived Stem Cells: Angiogenetic Potential and Utility in Tissue Engineering. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2024 Feb 16 [cited 2024 Feb 23];25(4):2356. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/25/4/2356>
161. Ingber D. Extracellular Matrix, Cellular Mechanics and Tissue Engineering [Internet]. *Tissue Engineering*. 1993. p. 69–82. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4615-8186-4_7
162. Stoltz JF, Zhang L, Ye JS, De Isla N. Organ reconstruction: Dream or reality for the future. *Biomed Mater Eng* [Internet]. 2017;28(s1):S121–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.3233/BME-171633>
163. Guruswamy Damodaran R, Vermette P. Tissue and organ decellularization in regenerative medicine. *Biotechnol Prog* [Internet]. 2018 Nov;34(6):1494–505. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.2699>
164. Mariana J, Vitalie C, Ivan M, Victor P, Viorel N. Techniques of liver decellularization. *The Moldovan Medical Journal* [Internet]. 2018 [cited 2024 Feb 23];61(4):21–4. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/techniques-of-liver-decellularization>
165. Somuncu ÖS. Decellularization Concept in Regenerative Medicine. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2020;1212:71–85. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/5584_2019_338
166. Cobzac V, Jian M, Nacu V. Cellularization of small sized grafts from biological material using the gravitational modality principle. *J Phys Conf Ser* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2024 Feb 23];1960(1):012004. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1960/1/012004/meta>

167. Gilpin A, Yang Y. Decellularization Strategies for Regenerative Medicine: From Processing Techniques to Applications. *Biomed Res Int* [Internet]. 2017 Apr 30;2017:9831534. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/9831534>
168. Sawada K, Terada D, Yamaoka T, Kitamura S, Fujisato T. Cell removal with supercritical carbon dioxide for acellular artificial tissue. *J Chem Technol Biotechnol* [Internet]. 2008 Jun;83(6):943–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1899>
169. Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods* [Internet]. 2015 Aug;84:25–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymeth.2015.03.005>
170. Zager Y, Kain D, Landa N, Leor J, Maor E. Optimization of Irreversible Electroporation Protocols for In-vivo Myocardial Decellularization [Internet]. Vol. 11, *PLOS ONE*. 2016. p. e0165475. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0165475>
171. Zemmyo D, Yamamoto M, Miyata S. Fundamental Study of Decellularization Method Using Cyclic Application of High Hydrostatic Pressure. *Micromachines (Basel)* [Internet]. 2020 Nov 15;11(11). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/mi11111008>
172. Hung SH, Su CH, Lee FP, Tseng H. Larynx decellularization: combining freeze-drying and sonication as an effective method. *J Voice* [Internet]. 2013 May;27(3):289–94. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jvoice.2013.01.018>
173. Funamoto S, Nam K, Kimura T, Murakoshi A, Hashimoto Y, Niwaya K, et al. The use of high-hydrostatic pressure treatment to decellularize blood vessels. *Biomaterials* [Internet]. 2010 May;31(13):3590–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.073>
174. Sasaki S, Funamoto S, Hashimoto Y, Kimura T, Honda T, Hattori S, et al. In vivo evaluation of a novel scaffold for artificial corneas prepared by using ultrahigh hydrostatic pressure to decellularize porcine corneas. *Mol Vis* [Internet]. 2009 Oct 13;15:2022–8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19844587>
175. Phillips M, Maor E, Rubinsky B. Nonthermal Irreversible Electroporation for Tissue Decellularization [Internet]. Vol. 132, *Journal of Biomechanical Engineering*. 2010. Available from: <http://dx.doi.org/10.1115/1.4001882>
176. Gil-Ramírez A, Rosmark O, Spéjel P, Swärd K, Westergren-Thorsson G, Larsson-Callerfelt AK, et al. Pressurized carbon dioxide as a potential tool for decellularization of pulmonary arteries for transplant purposes. *Sci Rep* [Internet]. 2020 Mar 4;10(1):4031. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-020-60827-4>
177. Lin HJ, Wang TJ, Li TW, Chang YY, Sheu MT, Huang YY, et al. Development of Decellularized Cornea by Organic Acid Treatment for Corneal Regeneration. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2019 Apr;25(7-8):652–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEA.2018.0162>
178. Zahmati AHA, Alipoor R, Shahmirzadi AR, Khori V, Abolhasani MM. Chemical Decellularization Methods and Its Effects on Extracellular Matrix [Internet]. Vol. 2, *Internal Medicine and Medical Investigation Journal*. 2017. p. 76. Available from: <http://dx.doi.org/10.24200/imminv.v2i3.63>
179. Woods T, Gratzer PF. Effectiveness of three extraction techniques in the development of a decellularized bone-anterior cruciate ligament-bone graft. *Biomaterials* [Internet]. 2005 Dec;26(35):7339–49. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.05.066>
180. Forouzesh F, Rabbani M, Bonakdar S. A Comparison between Ultrasonic Bath and Direct Sonicator on Osteochondral Tissue Decellularization. *J Med Signals Sens* [Internet]. 2019 Oct;9(4):227–33. Available from: http://dx.doi.org/10.4103/jmss.JMSS_64_18

181. Naik A, Griffin M, Szarko M, Butler PE. Optimizing the decellularization process of an upper limb skeletal muscle; implications for muscle tissue engineering [Internet]. Vol. 44, *Artificial Organs*. 2020. p. 178–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/aor.13575>
182. Reisbig NA. Decellularization to Produce Biological Synovial Extracellular Matrix Scaffolds [Internet]. Ohio State University; 2016. Available from: https://play.google.com/store/books/details?id=k_dZAQAACAAJ
183. Yamanaka H, Morimoto N, Yamaoka T. Decellularization of submillimeter-diameter vascular scaffolds using peracetic acid. *J Artif Organs* [Internet]. 2020 Jan 1; Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10047-019-01152-0>
184. Gerli MFM, Guyette JP, Evangelista-Leite D, Ghoshhajra BB, Ott HC. Perfusion decellularization of a human limb: A novel platform for composite tissue engineering and reconstructive surgery [Internet]. Vol. 13, *PLOS ONE*. 2018. p. e0191497. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0191497>
185. Everaerts FJL, Torrianni MW, Everaerts FM, Trescony PV, den Hartog W. Process for producing decellularized biological tissues [Internet]. US Patent. 8445278, 2013 [cited 2020 Apr 9]. Available from: <https://patentimages.storage.googleapis.com/96/3f/be/3f732c895f0444/US8445278.pdf>
186. Britikov DV, Chashchin IS, Khugaev GA, Bakuleva NP. The decellularization of allografts with supercritical carbon dioxide and detergents. Experimental data [Internet]. Vol. 20, *The Bulletin of Bakoulev Center “Cardiovascular Diseases.”* 2019. p. 402–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.24022/1810-0694-2019-20-5-402-409>
187. Cheptanaru E, Repin O, Maniuc L, Barnaciuc S, Ciubotaru A. Reconstrucția tractului de eiecție al ventriculului drept cu homogrefe valvulare pulmonare decelularizate în malformații cardiace congenitale. 2019; Available from: http://repository.usmf.md/bitstream/20.500.12710/9381/1/Cheptanatu_Repin_Maniuc_p27.pdf
188. He M, Callanan A. Comparison of methods for whole-organ decellularization in tissue engineering of bioartificial organs. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2013 Jun;19(3):194–208. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEB.2012.0340>
189. Kim JK, Koh YD, Kim JO, Seo DH. Development of a decellularization method to produce nerve allografts using less invasive detergents and hyper/hypotonic solutions [Internet]. Vol. 69, *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. 2016. p. 1690–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2016.08.016>
190. Wang Z, Sun F, Lu Y, Pan S, Yang W, Zhang G, et al. Rapid preparation of decellularized trachea as a 3D scaffold for organ engineering. *Int J Artif Organs* [Internet]. 2020 May 25;391398820924041. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/0391398820924041>
191. Lin CH, Kao YC, Ma H, Tsay RY. An investigation on the correlation between the mechanical property change and the alterations in composition and microstructure of a porcine vascular tissue underwent trypsin-based decellularization treatment. *J Mech Behav Biomed Mater* [Internet]. 2018 Oct;86:199–207. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jmbbm.2018.06.029>
192. Giraldo-Gomez DM, Leon-Mancilla B, Del Prado-Audelo ML, Sotres-Vega A, Villalba-Caloca J, Garciadiego-Cazares D, et al. Trypsin as enhancement in cyclical tracheal decellularization: Morphological and biophysical characterization. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* [Internet]. 2016 Feb;59:930–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.10.094>
193. Bae JY, Park SY, Shin YH, Choi SW, Kim JK. Preparation of human decellularized

- peripheral nerve allograft using amphoteric detergent and nuclease. *Neural Regeneration Res* [Internet]. 2021 Sep;16(9):1890–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.4103/1673-5374.306091>
194. Tan YH, Helms HR, Nakayama KH. Decellularization Strategies for Regenerating Cardiac and Skeletal Muscle Tissues. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2022 Feb 28;10:831300. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2022.831300>
 195. Macagonova O, Nacu V, Cociug A, Jian M, Cobzac V. Dispozitive și metode inovative în procesarea țesuturilor biologice. *Intellectus* [Internet]. 2017; Available from: https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/52875
 196. Nie Z, Wang X, Ren L, Kang Y. Development of a decellularized porcine bone matrix for potential applications in bone tissue regeneration. *Regen Med* [Internet]. 2020 Apr;15(4):1519–34. Available from: <http://dx.doi.org/10.2217/rme-2019-0125>
 197. Costa A, Naranjo JD, Londono R, Badylak SF. Biologic Scaffolds. *Cold Spring Harb Perspect Med* [Internet]. 2017 Sep 1;7(9). Available from: <http://dx.doi.org/10.1101/cshperspect.a025676>
 198. Badylak SF. The extracellular matrix as a biologic scaffold material. *Biomaterials* [Internet]. 2007 Sep;28(25):3587–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.04.043>
 199. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Reprint of: Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function. *Acta Biomater* [Internet]. 2015 Sep;23 Suppl:S17–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.07.016>
 200. Aamodt JM, Grainger DW. Extracellular matrix-based biomaterial scaffolds and the host response. *Biomaterials* [Internet]. 2016 Apr;86:68–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.02.003>
 201. de la Puente P, Ludeña D. Cell culture in autologous fibrin scaffolds for applications in tissue engineering. *Exp Cell Res* [Internet]. 2014 Mar 10;322(1):1–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2013.12.017>
 202. Aghazadeh MR, Delfanian S, Aghakhani P, Homaeigohar S, Alipour A, Shahsavarani H. Recent Advances in Development of Natural Cellulosic Non-Woven Scaffolds for Tissue Engineering. *Polymers* [Internet]. 2022 Apr 9;14(8). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/polym14081531>
 203. Dvornic D, Botezatu V, Borș A. Aspecte ale ingineriei tisulare vasculare în practica medicală. *Analele Științifice ale USMF „N Testemițanu”* [Internet]. 2013;14(4):24–31. Available from: https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/28631
 204. Revencu T, Trifan V, Nacu L, Gutium T, Globa L, Motoc AGM, et al. Collection, isolation and characterization of the stem cells of umbilical cord blood. *Rom J Morphol Embryol* [Internet]. 2013;54(2):291–7. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23771072>
 205. Balan E, Nacu V, Verega G, **Stoian A**. Conservation features of bone allografts with the perspective of their reinclusion in the host organism. *Cercetarea în biomedicină și* [Internet]. 2021; Available from: https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/144782
 206. Graham SM, Leonidou A, Aslam-Pervez N, Hamza A, Panteliadis P, Heliotis M, et al. Biological therapy of bone defects: the immunology of bone allo-transplantation. *Expert Opin Biol Ther* [Internet]. 2010 Jun;10(6):885–901. Available from: <http://dx.doi.org/10.1517/14712598.2010.481669>
 207. Kasravi M, Ahmadi A, Babajani A, Mazloomnejad R, Hatamnejad MR, Shariatzadeh S, et

- al. Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine. *Biomater Res* [Internet]. 2023 Feb 9;27(1):10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40824-023-00348-z>
208. Macagonova O, Cociug A, Țaralunga T, Ciobanu V, Nacu V. Antigenic and Biodegradable Characteristics of the Extracellular Matrices from the Pig Dermis. In: 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering [Internet]. Springer Nature Switzerland; 2024. p. 348–56. Available from: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-031-42775-6_38
 209. Pakianathan DR. Extracellular matrix proteins and leukocyte function. *J Leukoc Biol* [Internet]. 1995 May;57(5):699–702. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/jlb.57.5.699a>
 210. Houben RH, Kotsougiani D, Friedrich PF. Outcomes of vascularized bone allotransplantation with surgically induced autogenous angiogenesis in a large animal model: bone healing, remodeling, and material *Journal of* [Internet]. 2020; Available from: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0039-1695052>
 211. Suami H, Schaverien MV. Swine hind limb model for supermicrosurgical lymphaticovenular anastomosis training. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* [Internet]. 2016 May;69(5):723–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2016.01.002>
 212. PROCESS FOR BONE TISSUE DECELLULARIZATION - European Patent Office - EP 3095469 A1 PROCESS FOR BONE TISSUE DECELLULARIZATION - European Patent Office - EP 3095469 A1 [Internet]. [cited 2022 Jun 12]. Available from: <http://dx.doi.org/EP-3095469-A1-20161123>
 213. Johnson EO, Troupis T, Soucacos PN. Tissue-engineered vascularized bone grafts: basic science and clinical relevance to trauma and reconstructive microsurgery. *Microsurgery* [Internet]. 2011 Mar;31(3):176–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.20821>
 214. Assmann A, Delfs C, Munakata H, Schiffer F, Horstkötter K, Huynh K, et al. Acceleration of autologous in vivo recellularization of decellularized aortic conduits by fibronectin surface coating. *Biomaterials* [Internet]. 2013 Aug;34(25):6015–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.037>
 215. Browne S, Healy KE. Matrix-assisted cell transplantation for tissue vascularization. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2019 Jun;146:155–69. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2018.12.016>
 216. Bellani CF, Yue K, Flaig F, Hébraud A, Ray P, Annabi N, et al. Sutureless elastomeric tubular grafts with patterned porosity for rapid vascularization of 3D constructs. *Biofabrication* [Internet]. 2021 Apr 7;13(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.1088/1758-5090/abdf1d>
 217. Benson RW, Payne DD, DeWeese JA. Evaluation of prosthetic grafts of different porosity for arterial reconstruction. *Am J Surg* [Internet]. 1975 Jun;129(6):665–9. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/0002-9610\(75\)90342-6](http://dx.doi.org/10.1016/0002-9610(75)90342-6)
 218. Nguyen LH, Annabi N, Nikkhah M, Bae H, Binan L, Park S, et al. Vascularized bone tissue engineering: approaches for potential improvement. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2012 Oct;18(5):363–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEB.2012.0012>
 219. Kotsougiani D, Willems JI, Shin AY, Friedrich PF, Hundepool CA, Bishop AT. A new porcine vascularized tibial bone allotransplantation model. Anatomy and surgical technique. *Microsurgery* [Internet]. 2018 Feb;38(2):195–202. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/micr.30255>
 220. Bakhshandeh B, Zarrintaj P, Oftadeh MO, Keramati F, Fouladiha H, Sohrabi-Jahromi S, et al. Tissue engineering; strategies, tissues, and biomaterials. *Biotechnol Genet Eng Rev*

- [Internet]. 2017 Oct;33(2):144–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/02648725.2018.1430464>
221. Ventura R. Bone Regeneration of Decellularized In-Vivo Deposited Extracellular Matrix (ECM) on Hydroxyapatite Sponge Scaffold [Internet]. Vol. 3, MOJ Cell Science & Report. 2016. Available from: <http://dx.doi.org/10.15406/mojcsr.2016.03.00057>
 222. Pati F, Jang J, Ha DH, Won Kim S, Rhie JW, Shim JH, et al. Printing three-dimensional tissue analogues with decellularized extracellular matrix bioink. *Nat Commun* [Internet]. 2014 Jun 2;5:3935. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms4935>
 223. Neishabouri A, Soltani Khaboushan A, Daghigh F, Kajbafzadeh AM, Majidi Zolbin M. Decellularization in Tissue Engineering and Regenerative Medicine: Evaluation, Modification, and Application Methods. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2022 Apr 25;10:805299. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2022.805299>
 224. Lupon E, Lellouch AG, Acun A, Andrews AR, Oganessian R, Goutard M, et al. Engineering Vascularized Composite Allografts Using Natural Scaffolds: A Systematic Review. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2022 Jun;28(3):677–93. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEB.2021.0102>
 225. Al Qabbani A, Rani KGA, Syarif J, AlKawas S, Sheikh Abdul Hamid S, Samsudin AR, et al. Evaluation of decellularization process for developing osteogenic bovine cancellous bone scaffolds in-vitro. *PLoS One* [Internet]. 2023 Apr 5;18(4):e0283922. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0283922>
 226. Kim CW, Ha HJ, Yang JY, Hwang E. New Bone Formation in the Whole Decellularized Cortical Bone Scaffold Using the Model of Revitalizing a Haversian System. *J Craniofac Surg* [Internet]. 2022 May 1;33(3):962–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/SCS.00000000000008072>
 227. Jeong H, Asai J, Ushida T, Furukawa KS. Assessment of the Inner Surface Microstructure of Decellularized Cortical Bone by a Scanning Electron Microscope. *Bioengineering (Basel)* [Internet]. 2019 Sep 19;6(3). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/bioengineering6030086>
 228. Ahlmann AH, Fang S, Mortensen SB, Andersen LW, Pedersen PG, Callesen JJ, et al. Decellularised Human Umbilical Artery as a Vascular Graft Elicits Minimal Pro-Inflammatory Host Response Ex Vivo and In Vivo. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2021 Jul 26;22(15). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ijms22157981>
 229. Cao X, Maharjan S, Ashfaq R, Shin J, Zhang YS. Bioprinting of Small-Diameter Blood Vessels. *Proc Est Acad Sci Eng* [Internet]. 2021 Jun 1;7(6):832–44. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095809920302587>
 230. Campagnolo P, Tsai TN, Hong X, Kirton JP, So PW, Margariti A, et al. c-Kit+ progenitors generate vascular cells for tissue-engineered grafts through modulation of the Wnt/Klf4 pathway. *Biomaterials* [Internet]. 2015 Aug;60:53–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2015.04.055>
 231. Chen K, Lin X, Zhang Q, Ni J, Li J, Xiao J, et al. Decellularized periosteum as a potential biologic scaffold for bone tissue engineering. *Acta Biomater* [Internet]. 2015 Jun;19:46–55. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.02.020>
 232. Li N, Song J, Zhu G, Li X, Liu L, Shi X, et al. Periosteum tissue engineering—a review. *Biomater Sci* [Internet]. 2016 Oct 18;4(11):1554–61. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/c6bm00481d>
 233. Zhang W, Wang N, Yang M, Sun T, Zhang J, Zhao Y, et al. Periosteum and development of the tissue-engineered periosteum for guided bone regeneration. *J Orthop Translat*

- [Internet]. 2022 Mar;33:41–54. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jot.2022.01.002>
234. Lou Y, Wang H, Ye G, Li Y, Liu C, Yu M, et al. Periosteal Tissue Engineering: Current Developments and Perspectives. *Adv Healthc Mater* [Internet]. 2021 Jun;10(12):e2100215. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/adhm.202100215>
235. Dantas LR, Ribeiro VST, Kraft L, Pinho RA, Suss PH, Vasconcelos FTF, et al. Collagen matrices are preserved following decellularization of a bovine bone scaffold. *Cell Tissue Bank* [Internet]. 2022 Sep;23(3):531–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10561-021-09987-9>
236. Tamilmahan P, Pathak R, Rashmi, Amarpal, Aithal HP, Mohsina A, et al. Decellularized xenogenic bone graft for repair of segmental bone defect in rabbits. *Iran J Vet Res* [Internet]. 2022;23(4):310–21. Available from: <http://dx.doi.org/10.22099/IJVR.2022.40785.5906>
237. Mao B, Zhang Z, Lai S, Zhang K, Li J, Fu W. Demineralized Cortical Bone Matrix Augmented With Peripheral Blood-Derived Mesenchymal Stem Cells for Rabbit Medial Meniscal Reconstruction. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2022 Apr 27;10:855103. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2022.855103>
238. Ling Y, Xu W, Yang L, Liang C, Xu B. Improved the biocompatibility of cancellous bone with compound physicochemical decellularization process. *Regen Biomater* [Internet]. 2020 Oct;7(5):443–51. Available from: <http://dx.doi.org/10.1093/rb/rbaa024>
239. Wang Z, Han L, Sun T, Ma J, Sun S, Ma L, et al. Extracellular matrix derived from allogenic decellularized bone marrow mesenchymal stem cell sheets for the reconstruction of osteochondral defects in rabbits. *Acta Biomater* [Internet]. 2020 Dec;118:54–68. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2020.10.022>
240. Zhang N, Zhou M, Zhang Y, Wang X, Ma S, Dong L, et al. Porcine bone grafts defatted by lipase: efficacy of defatting and assessment of cytocompatibility. *Cell Tissue Bank* [Internet]. 2014 Sep;15(3):357–67. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10561-013-9391-z>
241. Allu I, Sahi AK, Koppadi M, Gundu S, Sionkowska A. Decellularization Techniques for Tissue Engineering: Towards Replicating Native Extracellular Matrix Architecture in Liver Regeneration. *J Funct Biomater* [Internet]. 2023 Oct 16;14(10). Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/jfb14100518>
242. Nagata S, Hanayama R, Kawane K. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* [Internet]. 2010 Mar 5;140(5):619–30. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.02.014>
243. Nagaoka Y, Yamada H, Kimura T, Kishida A, Fujisato T, Takakuda K. Reconstruction of small diameter arteries using decellularized vascular scaffolds. *J Med Dent Sci* [Internet]. 2014 Mar 19;61(1):33–40. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24658963>
244. Savi FM, Brierly GI, Baldwin J, Theodoropoulos C, Woodruff MA. Comparison of Different Decalcification Methods Using Rat Mandibles as a Model. *J Histochem Cytochem* [Internet]. 2017 Dec;65(12):705–22. Available from: <http://dx.doi.org/10.1369/0022155417733708>
245. Liu H, Zhu R, Liu C, Ma R, Wang L, Chen B, et al. Evaluation of Decalcification Techniques for Rat Femurs Using HE and Immunohistochemical Staining. *Biomed Res Int* [Internet]. 2017 Jan 26;2017:9050754. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2017/9050754>
246. Leskovar T, Inkret J, Zupanič Pajnič I, Jerman I. Comparison of DNA preservation and ATR-FTIR spectroscopy indices of cortical and trabecular bone of metacarpals and metatarsals. *Sci Rep* [Internet]. 2023 Sep 19;13(1):15498. Available from:

<http://dx.doi.org/10.1038/s41598-023-41259-2>

247. Zhou W, Apkarian R, Wang ZL, Joy D. Fundamentals of scanning electron microscopy (SEM). *Scanning Microscopy for Nanotechnology: Techniques and Applications* [Internet]. 2007;1–40. Available from: https://blogs.gwu.edu/nanotechfellows/files/2017/06/SEM_fundamentals_UFAM-1rnfmit.pdf
248. Groger A, Megas IF, Noah EM, Pallua N, Grieb G. Proliferation of endothelial cells (HUVEC) on specific-modified collagen sponges loaded with different growth factors. *Int J Artif Organs* [Internet]. 2021 Nov;44(11):880–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1177/03913988211043198>
249. Gui L, Chan SA, Breuer CK, Niklason LE. Novel utilization of serum in tissue decellularization. *Tissue Eng Part C Methods* [Internet]. 2010 Apr;16(2):173–84. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEC.2009.0120>
250. Pulido-Escribano V, Torrecillas-Baena B, Camacho-Cardenosa M, Dorado G, Gálvez-Moreno MÁ, Casado-Díaz A. Role of hypoxia preconditioning in therapeutic potential of mesenchymal stem-cell-derived extracellular vesicles. *World J Stem Cells* [Internet]. 2022 Jul 26;14(7):453–72. Available from: <http://dx.doi.org/10.4252/wjsc.v14.i7.453>
251. Hu C, Li L. Preconditioning influences mesenchymal stem cell properties in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* [Internet]. 2018 Mar;22(3):1428–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/jcmm.13492>
252. Polymeri A, Giannobile WV, Kaigler D. Bone Marrow Stromal Stem Cells in Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Horm Metab Res* [Internet]. 2016 Nov;48(11):700–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1055/s-0042-118458>
253. Saunders SK, Cole SY, Acuna Sierra V, Bracamonte JH, Toldo S, Soares JS. Evaluation of perfusion-driven cell seeding of small diameter engineered tissue vascular grafts with a custom-designed seed-and-culture bioreactor. *PLoS One* [Internet]. 2022 Jun 16;17(6):e0269499. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0269499>
254. Grayson WL, Bhumiratana S, Cannizzaro C, Chao PHG, Lennon DP, Caplan AI, et al. Effects of initial seeding density and fluid perfusion rate on formation of tissue-engineered bone. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2008 Nov;14(11):1809–20. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0255>
255. Heller U, Evrard R, Lengelé B, Schubert T, Kadlub N, Boisson J. Decellularized vascularized bone grafts as therapeutic solution for bone reconstruction: A mechanical evaluation. *PLoS One* [Internet]. 2023 Jan 13;18(1):e0280193. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0280193>
256. Xu MS, Karoubi G, Waddell TK, Haykal S. Procurement and Perfusion-Decellularization of Porcine Vascularized Flaps in a Customized Perfusion Bioreactor. *J Vis Exp* [Internet]. 2022 Aug 1;(186). Available from: <http://dx.doi.org/10.3791/64068>
257. Pavlovschi E, Stoian A, Malcova T, Iordăchescu R, Verega G. Combined decellularization of vascularized bone allograft. In vivo experimental study stage. 2020 [cited 2022 Mar 10]; Available from: <http://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/14488>

LISTA DE ANEXE

Anexa 1.

Examinarea calitativă a grefelor vasculare native vs decelularizate (DAPI)

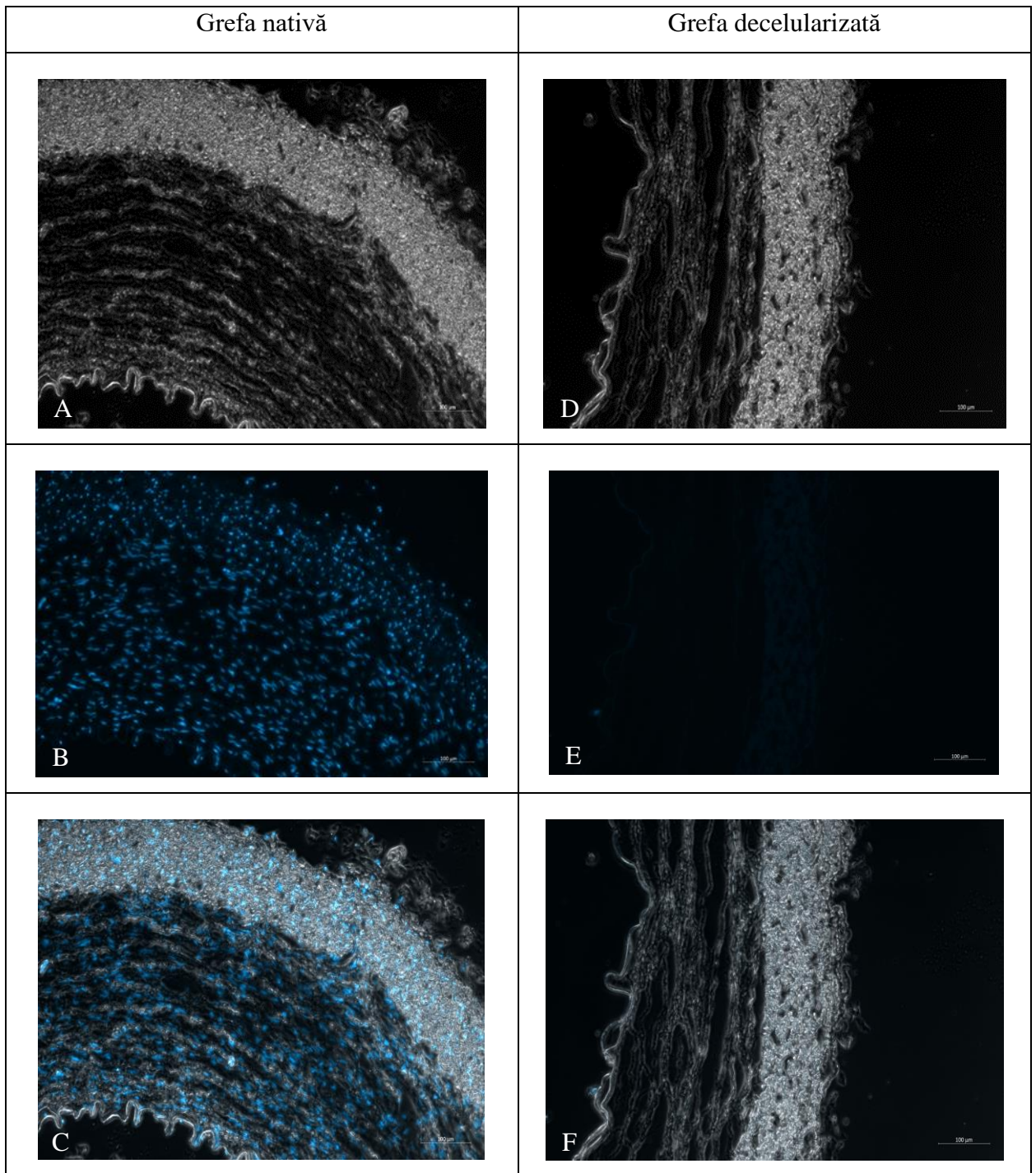


Figura 1. Grefa vasculară cu diametru mare (artera carotidă). Colorația DAPI. Grefa nativă (A, B, C) și grefa decelularizată (D, E, F). Câmp luminos (A, D), câmp DAPI (B, E) și câmpurile suprapuse (C, F). Scala: 100 μ m

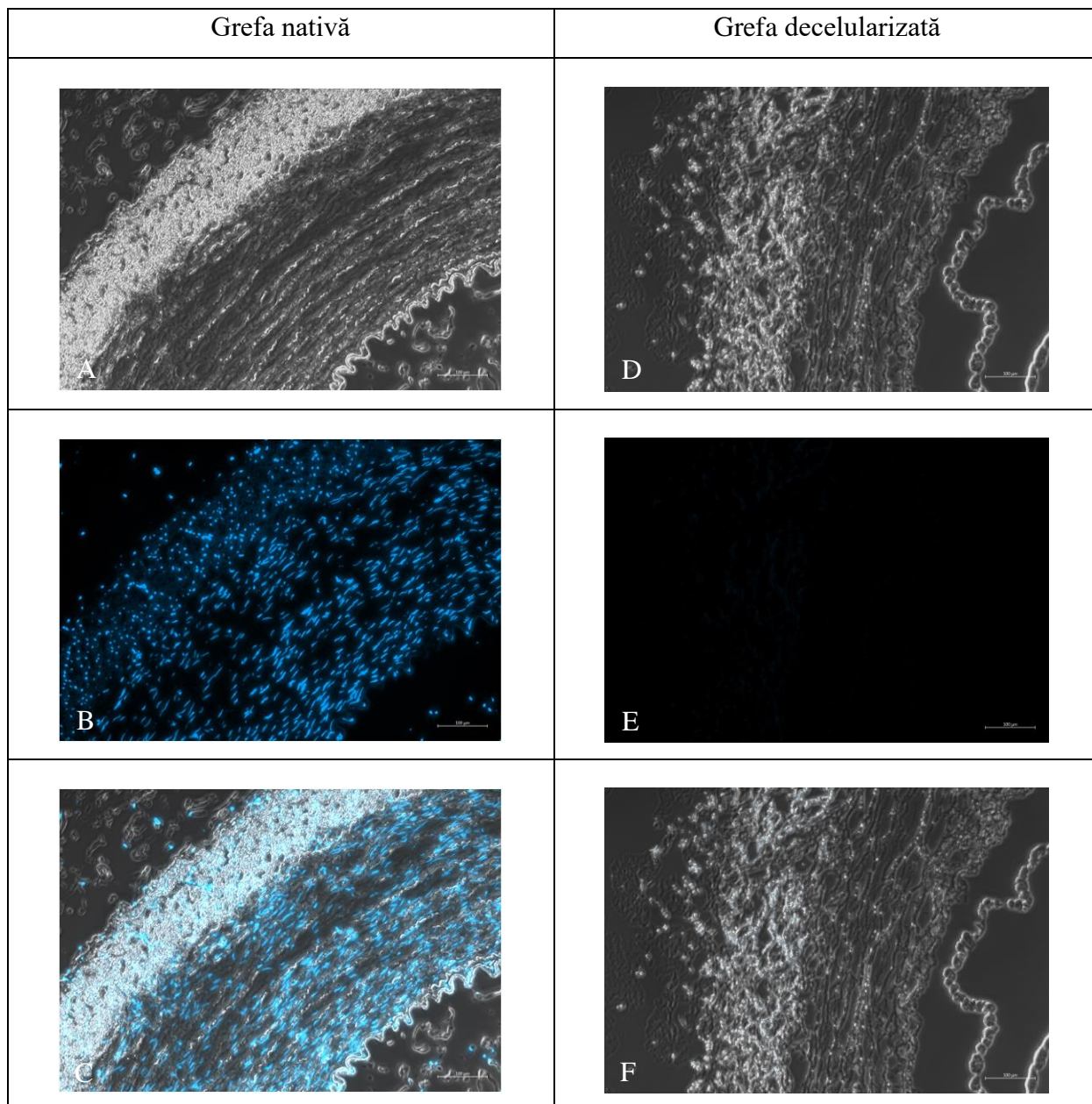


Figura 2. Grefa vasculară cu diametru mediu (artera femurală superficială). Colorația DAPI. Grefa nativă (A, B, C) și grefa decelularizată (D, E, F). Câmp luminos (A, D), câmp DAPI (B, E) și câmpurile suprapuse (C, F). Scala: 100 μ m

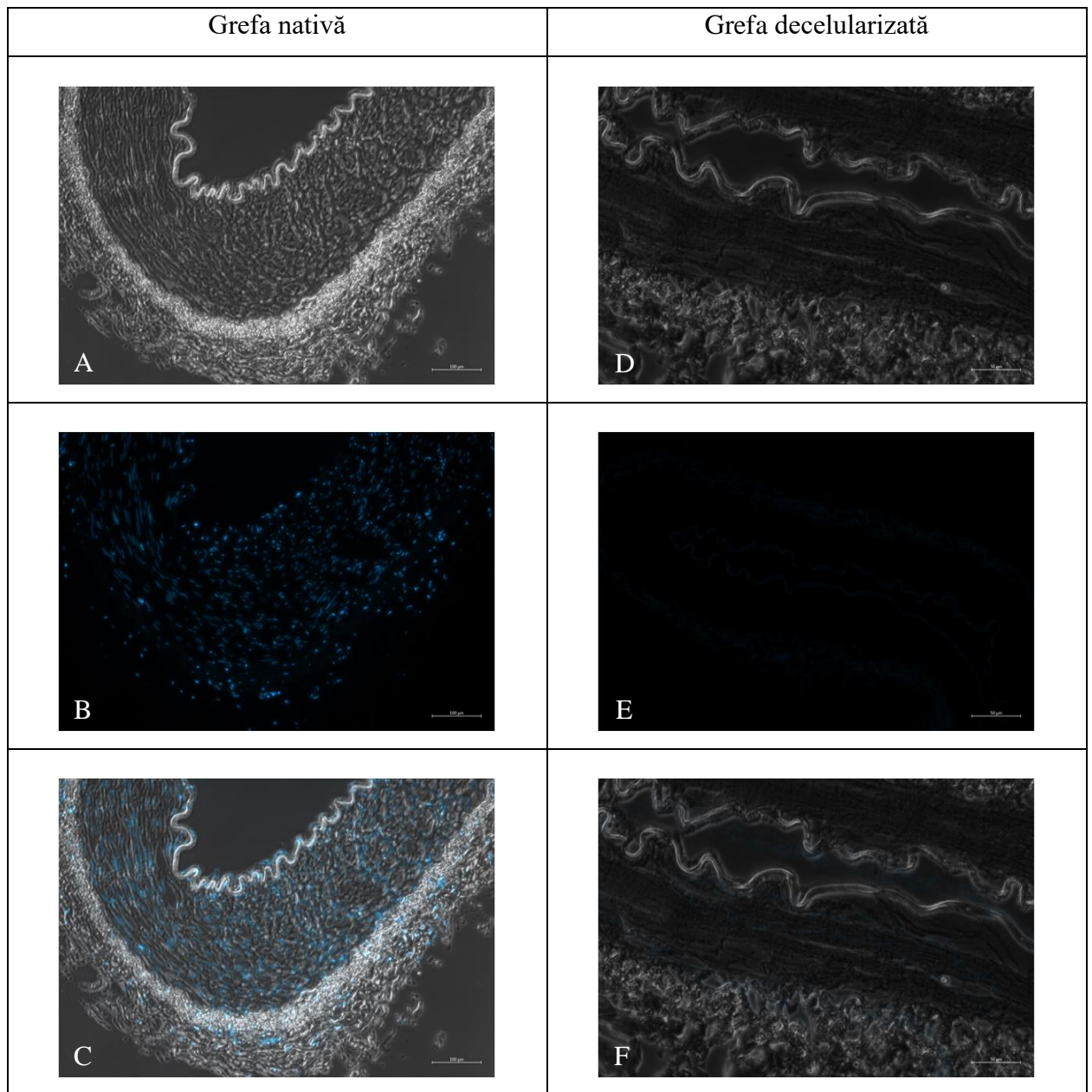


Figura 3. **Grefa vasculară cu calibru mic (artera tibială caudală). Colorația DAPI.** Grefa nativă (A, B, C) și grefa decelularizată (D, E, F). Câmp luminos (A, D), câmp DAPI (B, E) și câmpurile suprapuse (C, F). Scala. A, C, E: 100 μm ; B, D, F: 50 μm

Examinarea calitativă a grefelor osoase native vs decelularizate (SEM)

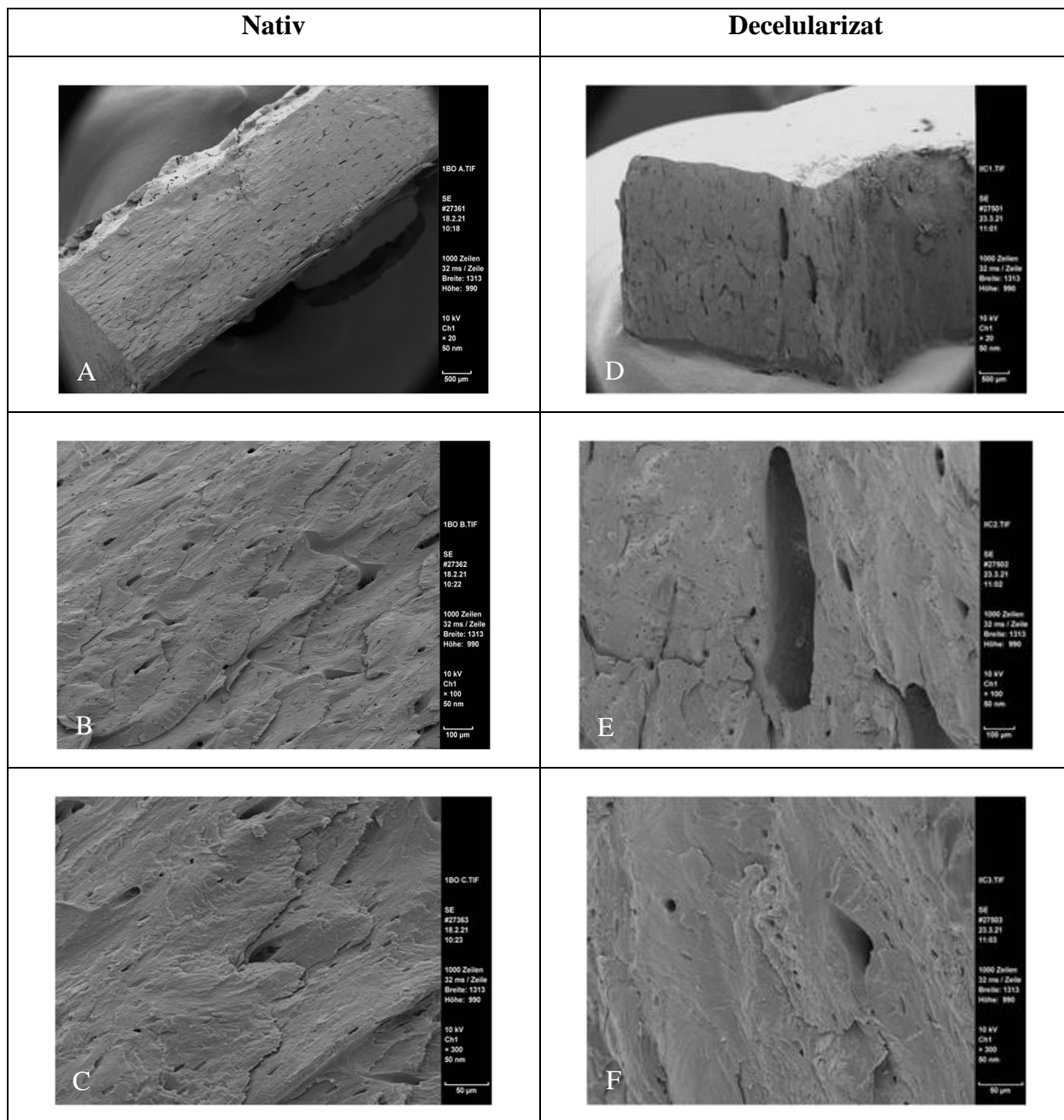


Figura 1. **Grefa osoasă corticală. SEM.** Grefa osoasă nativă (A, B, C) și grefa osoasă decelularizată (D, E, F). Scala. A, D: 500 µm; B, E: 100 µm; C, F: 50 µm

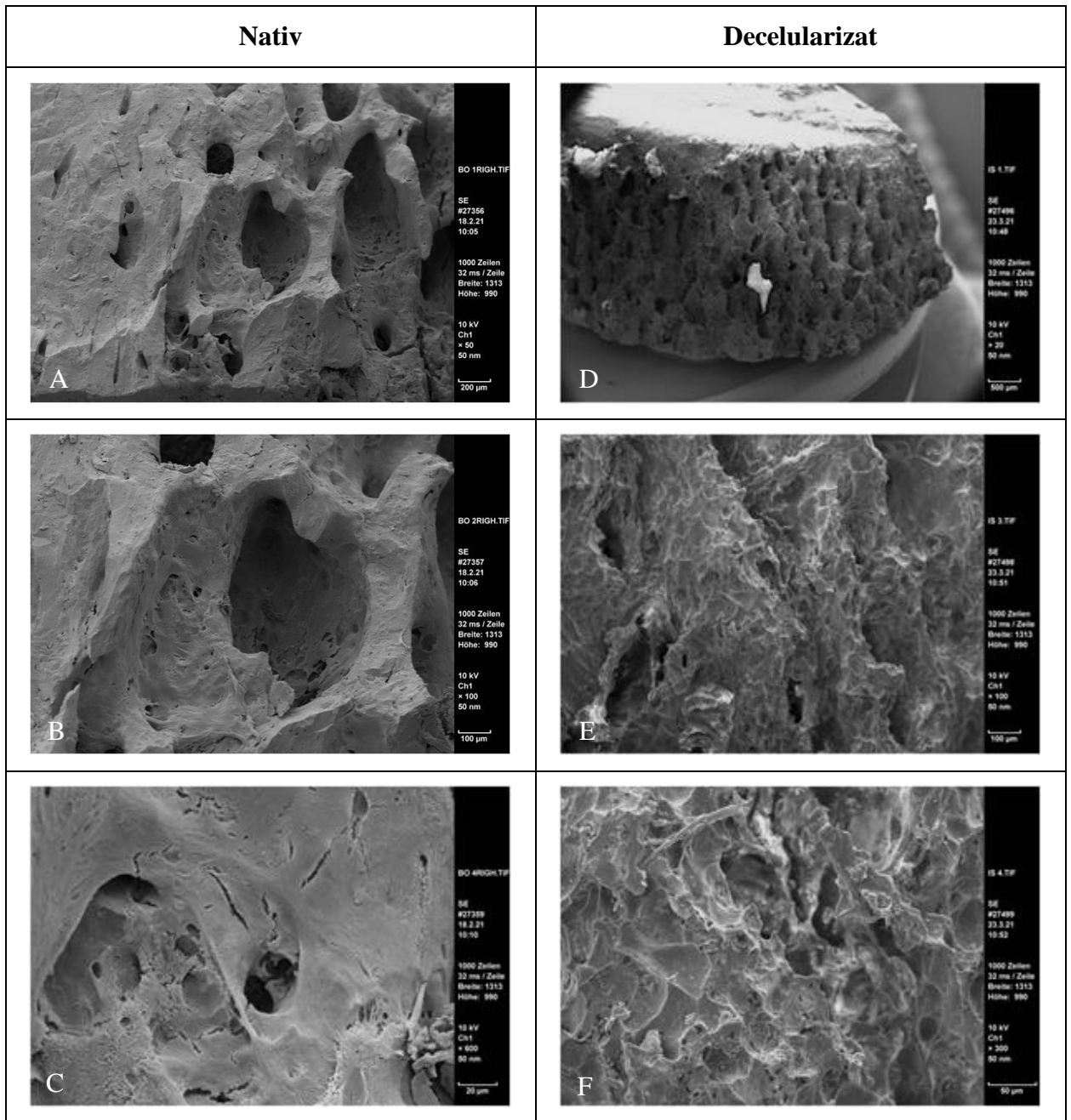


Figura 2. Grefa osoasă spongioasă. SEM. Grefa nativă (A, B, C) și grefa decelularizată (D, E, F). Scala. A, D: 500 μm; B, E: 100 μm; C, F: 50 μm

Informația privind valorificarea rezultatelor cercetării

LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI PARTICIPĂRILOR LA FORUMURI ȘTIINȚIFICE

realizate la teza de doctor în științe medicale, cu tema „Prepararea alogrefelor osoase pe pedicul vascular – studiu experimental”

I. Articole în reviste științifice

• Articole în reviste științifice internaționale:

1. **Alina Stoian**, Aisha Adil, Felor Biniazan, Siba Haykal. Two Decades of Advances and Limitations in Organ Recellularization. In: *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(8), 9179-9214; DOI: 10.3390/cimb46080543 (IF: 2.8).
2. Felor Biniazan*, **Alina Stoian***, and Siba Haykal. Adipose-Derived Stem Cells: Angiogenic Potential and Utility in Tissue Engineering. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 2024 Feb; 25(4): 2356. Published online 2024 Feb 16. PMCID: PMC10889096. PMID: 38397032. DOI: 10.3390/ijms25042356 (IF: 5.6).

• Articole în reviste științifice naționale acreditate:

✓ Articole în reviste științifice categoria B+

3. Pavlovschi E., **Stoian A.**, Verega Gr., Nacu V., In vivo experimental study of the arterial supply of the rabbit posterior limb. In: *Moldovan Medical Journal*. 2021; 64(6): pp. 26-32. ISSN 2537-6373. DOI: 10.52418/moldovan-med-j.64-6.21.05.

• Articole în lucrările conferințelor științifice:

✓ Articole în lucrările conferințelor incluse în baza de date Web of Science și SCOPUS

4. Malcova T., Globa L., Vascan A., Țugui E., **Stoian A.**, Nacu V. Evolution of the efficacy of decellularization treatment in preparing decellularized umbilical cord artery. In: *Tiginyanu I., Sontea V., Railean S. (eds). Springer, Cham, 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2019. IFMBE Proceedings, 2020; vol 77: pp. 589-593. ISBN: 1680-0737 / ISBN: 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).*
5. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Capros N., Verega Gr., Nacu V. Effectiveness of tissue engineering in obaining of the vascularized composite bone extracellular matrix. Experimental study. In: *Tiginyanu I., Sontea V., Railean S. (eds). Springer, Cham, 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2023; IFMBE Proceedings. 2023; vol 91: pp. 357-365. ISBN 978-3-031-42774-9 / ISBN: 978-3-031-42775-6 (online). DOI: 10.1007/978-3-031-42775-6_39 (SJR: 0.155, SCOPUS).*

AUTOR:
Secretar științific al Senatului,
dr. filos., Didina Nistreanu



6. Pavlovschi E., **Stoian A.**, Verega Gr., Nacu V. The Critical Size Bone Defects - In-Vivo Experimental Method of the Treatment with the Decellularized Vascularized Bone Allografts. In: *Tiginyanu I., Sontea V., Railean S. (eds). Springer, Cham, 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2023; IFMBE Proceedings. 2023; vol 91: pp. 332-347. ISBN 978-3-031-42774-9 / ISBN: 978-3-031-42775-6 (online). DOI: 10.1007/978-3-031-42775-6_37 (SJR: 0.155, SCOPUS).*

II. Abstracte și teze prezentate în cadrul conferințelor/congreselor științifice

• Internaționale, desfășurate în afara Republicii Moldova:

7. Malcova T., Globa T., Vascan A., Țugui E., **Stoian A.**, Nacu V. Evaluation of the efficacy of decellularization treatment in preparing decellularized umbilical cord artery. In: *Abstract Book. International molecular medicine symposium. Istanbul, Turcia: 2019: p. 76.*
8. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Verega Gr., Nacu V., Andree B., Hilfiker A., Experimental study in non/immunogen vascularized bone allograft. In: *Abstract book of 3in1 joint congress in plastic and reconstructive surgery. Timișoara, România, 2022: p. 36. ISBN: 978-606-786-274-4.*
9. Pavlovschi E., **Stoian A.**, Verega Gr., Nacu V., The vascularized bone allotransplantation in vivo experiment. Preliminary report. In: *Abstract book of 4th international european conferince on interdisciplinary scientific researcher. Warsaw, Poland, 2021: p. 264. ISBN: 978-1-955094-13-9.*

• Internaționale, desfășurate în Republica Moldova:

10. Pavlovschi E., **Stoian A.**, Mihaluta V. The vascularized allotransplant– successful alternative for massive bone defects. In: *Abstract book of Med Espera International Medical Congress for Students and Young Doctors. Chișinău. Republica Moldova, 2018: pp. 143-144. DOI: ibn.idsi.md/vizualizare_articol/114348.*
11. Pavlovschi E., **Stoian A.** The vascularized bone allotransplantation - in a rabbit model, preliminary report. In: *Abstract Book. MedEspera: 2020: 8th International Medical Congress for Students and Young Doctors. Chișinău:2020, pp. 115-116. ISBN 978-9975-151-11-5. DOI: ibn.idsi.md/vizualizare_articol/117306.*

• Naționale:

12. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Verega Gr., Birgit A., Hilfiker A., Nacu V. Experimental study in obtaining of a vascularised composite bone extracellular matrix. In: *Abstract Book. Conferința Științifică Anuală. Cells and tissues transplantation. Actualities and Perspectives. Chișinau: 2023, pp. 40. CZU: 617.7. DOI: repository.usmf.md/handle/20.500.12710/24272.*

AUTOR:
Secretar științific al Senatului,
dr. filoz., Didina Nisteanu



13. Pavlovschi E., **Stoian A.**, Gardikiotis I., Verega Gr., Nacu V., Cernei G. The vascularized bone allotransplantation after decellularization process, in vivo testing. In: *Abstract Book. Conferința Științifică Anuală. Cells and tissues transplantation. Actualities and Perspectives*. Chișinău: 2023, pp. 37. CZU: 616-089.57.085. DOI: 20.500.12710/24267.
14. Pavlovschi E., **Stoian A.**, Malcova T., Iordăchescu R., Verega Gr. Decelularizarea combinată a allogrefei osoase vascularizate. Etapă de studiu experimental in vivo. In: *Abstract Book. Congresul Consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”*, Chișinău: CEP „Medicina”, 2020, p. 519. DOI: ibn.idsi.md/vizualizare_articol/126485.
15. **Stoian A.**, Nacu V., Pavlovschi E., Macagonova O., Malcova T., Mihaluta V. Perspectiva de viitor a alotransplantului osos vascularizat. In: *Abstract Book. Congresul Consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău: CEP „Medicina”, 2020, p. 525. DOI: ibn.idsi.md/vizualizare_articol/126554.
16. Pavlovschi E., Verega Gr., **Stoian A.**, Nacu V. Surgery protocol of vascularized bone allotransplant. The next stage of in vivo experimental study. In: *Abstract book. Conferința Științifică Anuală. Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță*. Chișinău: CEP „Medicina”, 2021, p. 333. ISBN 978-9975-82-223-7 (PDF). DOI: ibn.idsi.md/vizualizare_articol/144671.
17. Balan E., Nacu V., Verega Gr., **Stoian A.**, Conservation features of bone allografts with the perspective of their reinclusion in the host organism. In: *Abstract book. Conferința Științifică Anuală. Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță*. Chișinău: CEP „Medicina”, 2021, p. 347. ISBN 978-9975-82-223-7 (PDF). DOI: ibn.idsi.md/vizualizare_articol/144782.
18. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Nacu V., Sladic S., Andree B., Hilfiker A., Principles of decellularization for composite vascularized bone graft. In: *Abstract book. Conferința Științifică Anuală. Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță*. Chișinău: CEP „Medicina”, 2021, p. 337. ISBN 978-9975-82-223-7 (PDF). DOI: ibn.idsi.md/vizualizare_articol/144677.

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

19. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Verega Gr., Nacu V. *Metodă de decelularizare pentru grefele osoase compozite vascularizate*. Certificat de inovație nr. 6058 din 24 mai 2023.
20. Pavlovschi E., **Stoian A.**, Nacu V., Verega Gr. *Alogrefele osoase vascularizate decelularizate ca metodă de tratament a defectelor osoase critice*. Certificat de inovație nr. 6052 din 16 mai 2023.

AUTOR:
Secretar științific al Senatului,
dr. filoz., Didina Nisteanu





IV. Participări cu comunicări la forumuri științifice

- **Internaționale:**

21. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Mihaluta V., Iordachescu R., Verega Gr., Nacu V. Initiation of the experimental study in obtaining of vascularized bone allograft. In: *11th BAPRAS Congress, 12th National Congress of RSSH and 13th National Congress of RSRM*. Cluj-Napoca, Romania, May 9-11, 2019.
22. Pavlovschi E., **Stoian A.**, Verega Gr., Nacu V. In: *The vascularized bone allotransplantation - In Vivo experimet. Preliminary report*. In: International european conferince on interdisciplinary scientific research. Warsaw, Poland, August 8-9, 2021.
23. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Verega Gr., Nacu V., Andree B., Hilfiker A. Experimental study in non-imunogen vascularized bone allograft. In: *19th National Congress of the Romanian Association of Plastic Surgeons, 14th National Congress of the Romanian Society of Reconstructive Microsurgery, 13th National Congress of the Romanian Society for Surgery of the Hand*. Timisoaa, Romania, April 28-30, 2022.
24. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Verega Gr., Nacu V. Effectiveness of tissue engineering in obtaining the extracellular composite vascularized bone matrix. In: *The 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering – ICNBME-2023*. Chisinau, September 20-23, 2023.
25. Pavlovschi E., **Stoian A.**, Verega Gr., Nacu V. The critical size bone defects – In-Vivo experimental method of the treatment with the decellularized vascularized bone allografts. In: *The 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering*. September 20-23, 2023.

- **Naționale:**

26. Pavlovschi E., **Stoian A.**, Mihaluța V. The vascularized allotransplant – successful alternative for massive bone defects. In: *7th edition of International Medical Congress for Students and Young Doctors*. Chisinau, 3-5 mai, 2018.
27. **Stoian A.** Inițierea studiului experimental de obținere a alogrefelor osoase vascularizate. În: *Conferința Științifică Anuală în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță*. Chișinău, 16-18 octombrie 2019.
28. Pavlovschi E., Verega Gr., **Stoian A.**, Nacu V. Surgery protocol of vascularized bone allotranslant. The next stage of in vivo experimental study. În: *Conferința Științifică Anuală în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță*. Chișinău, 20-22 octombrie 2021.
29. Balan E., Nacu V., Verega Gr., **Stoian A.** Conservation features of bone allografts with the perspective of their reinclusion in the host organism. În: *Conferinței Științifică Anuală în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță*. Chișinău, 20-22 octombrie 2021.

AUTOR:
Secretar științific al Senatului,
dr. filos., Didina Nistreanu



30. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Nacu V., Sladic S., Andree B., Hilfiker A. În: *Conferința Științifică Anuală în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță*. Chișinău, 20-22 octombrie 2021.
31. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Iordachescu R., Verega Gr., Nacu V. Alogrefa osoasă vascularizată – studiu experimental. În: *A XVIII-a Conferință Științifică a ortopezilor și traumatologilor din Republica Moldova*. Chișinău, 25 iunie 2022.
32. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Verega Gr., Nacu V., Andree B., Hilfiker A. Experimental study in obtaining of a vascularized composite bone extracellular matrix. În: *Conferința Științifică Anuală. Cells and tissues transplantation. Actualities and Perspectives*. Chisinau, 17-18, martie, 2023.

V. Participări cu postere la foruri științifice / expoziții

- **Internaționale:**

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

- **Naționale:**

34. **Stoian A.**, Nacu V., Pavlovschi E., Macagonova O., Malcova T., Mihaluța V. Perspectiva de viitor a alotransplantului osos vascularizat. În: *Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fonsarea USMF „Nicolae Testemițanu”*. Ediție online, Chișinău, 21-23 octombrie 2020.
35. Pavlovschi E., **Stoian A.**, Malcova T., Iordăchescu R., verega G., Nacu V. Decelularizarea combinată a alogrefei osoase vascularizate. Etapă de studiu experimental in vivo. În: *Congresul Consacrat aniversării a 75-a de la fonsarea USMF „Nicolae Testemițanu”*. Ediție online, Chișinău, 21-23 octombrie 2020.

VI. Cursuri educaționale și programe de burse

36. Proiect de stat No. 20.80009.5007.20, *Nanoarhitecturi în bază de GaN și matrici tridimensionale din materiale biologice pentru aplicații în microfluidă și inginerie tisulară*. GA 810652. Chișinău, Ianuarie 2020-Iunie 2023.
37. Proiect No. 810652 a Uniunii Europene Horizon 2020, *NanoMed TWIN*. Hannover, Germania, 01 Octombrie 2020-31 Martie 2021.
38. *Training Course on Intellectual Property Protection and Technology Transfer in the framework of the Horizon2020 project „NanoMedTwin”*. Online. Chisinau, 01 October-19 December 2020.
39. *Bursa de cercetare „Eugen Ionescu”*, 2021-2022. Cercetător științific stagiar, voluntariat. Iași, România, Decembrie 2021-Februarie 2022.

AUTOR:
Secretar științific al Senatului,
dr. filoz., Didina Nistreanu



DIPLOME ȘI DISTINCȚII





Republica Moldova
Ministerul Sănătății

CERTIFICAT DE INOVATOR

Nr. 6052

Pentru inovația cu titlul
**ALOGREFE OSOASE VASCULARIZATE
DECELULARIZATE CA METODĂ DE
TRATAMENT A DEFECTELOR OSOASE CRITICE**

Inovația a fost înregistrată pe data de
la Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie
"Nicolae Testemițanu"

Se recunoaște calitatea de autor(i)

**PAVLOVSKI Elena, STOIAN Alina,
NACU Viorel, VEREGA Grigore**

Data eliberării 16 Mai 2023.

L.S.


(Semnătura autorizată)



Technical University of Moldova



Academy of Sciences of Moldova



International Federation for Medical & Biological Engineering



European Alliance for Medical and Biological Engineering & Science



Nicolae Testețanu State Medical and Pharmaceutical University



Moldovan Society of Biomedical Engineering

Technical University of Moldova

Moldavian Society of Biomedical Engineering

CERTIFICATE



ICNBME - 2023
6th INTERNATIONAL CONFERENCE
on Nanotechnologies and
Biomedical Engineering

We hereby certify that

Alina STOIAN

**has participated at the 6th INTERNATIONAL
CONFERENCE ON NANOTECHNOLOGIES AND BIOMEDICAL
ENGINEERING - ICNBME-2023**

Chisinau, Republic of Moldova, on September 20-23th, 2023

Alina Stoian presented the paper **The Critical Size Bone Defects - In-vivo Experimental Method of the Treatment with the Decellularized Vascularized Bone Allografts** by *Elena Pavlovski, Alina Stoian, Grigore Verega, and Viorel Nacu*, at the 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering.

Prof. Victor SONTEA
Co-chair of ICNBME-2023



Technical University of Moldova



Academy of Sciences of Moldova



International Federation for Medical & Biological Engineering



European Alliance for Medical and Biological Engineering & Science



Nicolae Testețanu State Medical and Pharmaceutical University



Moldovan Society of Biomedical Engineering

Technical University of Moldova

Moldavian Society of Biomedical Engineering

CERTIFICATE



ICNBME - 2023
6th INTERNATIONAL CONFERENCE
on Nanotechnologies and
Biomedical Engineering

We hereby certify that

Alina STOIAN

**has participated at the 6th INTERNATIONAL
CONFERENCE ON NANOTECHNOLOGIES AND BIOMEDICAL
ENGINEERING - ICNBME-2023**

Chisinau, Republic of Moldova, on September 20-23th, 2023

Alina Stoian presented the paper **Effectiveness of Tissue Engineering in Obtaining the Extracellular Composite Vascularized Bone Matrix** by *Alina Stoian, Elena Pavlovski, Nicolae Capros, Grigore Verega, Viorel Nacu*, at the 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering.

Prof. Victor SONTEA
Co-chair of ICNBME-2023





Laboratory of Tissue Engineering and Cells Cultures



CERTIFICATE OF ATTENDANCE

EDUCATIONAL COURSE

“Actualities and Perspectives in Tissue Engineering and Cells Transplantation”

Alina Stoian

Viorel Nacu,

MD, PhD, Professor

Dedicated to the 78th anniversary of Nicolae Testemitanu State University of Medicine and Pharmacy Chisinau, Republic of Moldova, the 19th of October, 2023



CERTIFICATE

OF PARTICIPATION

This certificate is proudly presented to

Dr. Stoian Alina

in oral and technical presentation,
recognition and appreciation of research contributions to

4TH INTERNATIONAL EUROPEAN CONFERENCE
ON INTERDISCIPLINARY SCIENTIFIC RESEARCHES
AUGUST 8-9, 2021 / WARSAW, POLAND

with the paper entitled

THE VASCULARIZED BONE ALLOTRANSPLANTATION- IN VIVO EXPERIMENT.
PRELIMINARY REPORT

PROF. DR. KINGA FLAGA-GIERUSZYŃSKA
Honorary President of the Conference



www.eucongress.org



EACCME

European Accreditation Council for Continuing Medical Education

Certificate

3in1 Joint Congress

Timisoara, Romania, 28/04/2022-30/04/2022

has been accredited by the European Accreditation Council for Continuing Medical Education (EACCME®) for a maximum of **20** European CME credits (ECMEC®s).

Each medical specialist should claim only those credits that he/she actually spent in the educational activity.

The EACCME® is an institution of the European Union of Medical Specialists (UEMS), www.uems.eu. Through an agreement between the European Union of Medical Specialists and the American Medical Association, physicians may convert EACCME® credits to an equivalent number of AMA PRA Category 1 Credits™. Information on the process to convert EACCME® credits to AMA credits can be found at www.ama-assn.org/education/earn-credit-participation-international-activities.

Live educational activities occurring outside of Canada, recognised by the UEMS-EACCME® for ECMEC® credits are deemed to be Accredited Group Learning Activities (Section 1) as defined by the Maintenance of Certification Program of the Royal College of Physicians and Surgeons of Canada.

Dr. ALINA STOIAN

has been awarded **[20]** European CME Credits (ECMEC®s) for his/her attendance at this event

Prof. Cristian Radu Jecan, MD, PhD
President, Romanian Association of Plastic Surgeons

Assoc. Prof. Zorin Crăiniceanu, MD, PhD
President, Romanian Association of Hand Surgery

Alexandru Nistor, MD, PhD
President-elect, Romanian Association for Reconstructive Microsurgery

56 / 30.04.2022

**29th Congress of the
European Association
of Tissue and Cell Banks**

October 22, 2021
Virtual Congress
eatcbcongress.org



CME CERTIFICATE

This is to confirm that

Prof./Dr./MS./Mr.

ALINA STOIAN

has participated in the

**29th Congress of the
European Association of Tissue and Cell Banks**

and has been awarded the following amount of CME Credits (ECMEC®s)

7 CME Credits

For the Congress Office

EATCB 2021, c/o WMA GmbH

Alser Strasse 4

A-1090 Vienna, Austria



CME Credit Information:

The **29th Conference of the European Association of Tissue and Cell Banks (EATCB 2021)** has been accredited the European Accreditation Council for Continuing Medical Education (EACCME®) for a maximum of **7** European CME credits (ECMEC®s). The EACCME is an institution of the European Union of Medical Specialists (UEMS), www.uems.net.

Through an agreement between the European Union of Medical Specialists and the American Medical Association, physicians may convert EACCME® credits to an equivalent number of AMA PRA Category 1 Credits™. Information on the process to convert EACCME® credits to AMA credits can be found at www.ama-assn.org/education/earn-credit-participation-international-activities.

Live educational activities occurring outside of Canada, recognised by the UEMS-EACCME® for ECMEC® credits are deemed to be Accredited Group Learning Activities (Section 1) as defined by the Maintenance of Certification Program of the Royal College of Physicians and Surgeons of Canada.

Congress Office: WMA GmbH, Alser Strasse 4, A - 1090 Vienna, Austria
Tel: +43 1 405 13 83 18 - Fax: +43 1 405 13 83 918 - e-mail: organisation@eatcb.org - w: www.eatcbcongress.org



Certificate of Attendance
Alina Stoian
attended ISAPS World
on March 27 - 28, 2021

Nazim Cerkes, MD, PhD
ISAPS President

Ozan Sozer, MD
Education Council Chair

MINISTERUL SĂNĂTĂȚII AL REPUBLICII MOLDOVA
UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"NICOLAE TESTEMIȚANU"
ASOCIAȚIA ORTOPEZILOR-TRAUMATOLOGI
DIN REPUBLICA MOLDOVA

CERTIFICAT DE PARTICIPARE

STOIAN ALINA

SE ACORDĂ

Conferința științifică XVIII
"Leziunile locomotorului, – principii minim invazive de tratament"
a Ortopezilor traumatologilor din R. Moldova

25 Iunie 2022 or. Chișinău

5 CREDITE

Președinte al Asociației
ortopezilor-traumatologi
din Republica Moldova
profesor universitar
Nicolae Caproș

Secretar al Asociației
ortopezilor-traumatologi
din Republica Moldova
Conferențiar universitar
Ion Vacarelcu





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



HR EXCELLENCE IN RESEARCH

DIPLOMĂ

Se decernează

Doamnei Alina STOIAN

***Pentru prezentarea lucrării: Principii de decelularizare a
grefelor osoase vascularizate***

***Grupul de autori: Stoian Alina, Pavlovschi Elena, Nacu Viorel,
Sanja Sladic, Birgit Andre, Hilfiker Andres, Verega Grigore***

**CONFERINȚA ȘTIINȚIFICĂ ANUALĂ
CERCETAREA ÎN BIOMEDICINĂ ȘI SĂNĂTATE:
CALITATE, EXCELENȚĂ ȘI PERFORMANȚĂ**



HR EXCELLENCE IN RESEARCH



Chișinău, Republica Moldova

Rector

E. Ceban

Emil Ceban,

*profesor universitar, dr. hab. șt. med.,
președinte al Comitetului
organizatoric al Conferinței*

Prorector pentru activitate
de cercetare

S. Groppa

Stanislav Groppa,

*profesor universitar, dr. hab. șt. med.,
academician al AȘM,
președinte al Biroului Comitetului
științific al Conferinței*



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

DIPLOMĂ

DE ONOARE

Se decernează Dnei/Dlui Stoian Alina
pentru prezentarea lucrării Inițierea în studiul experimental de
obținere a alogrefelor osoase vasculareizate

în cadrul Conferinței științifice anuale a cadrelor științifico-didactice,
doctoranzilor, masteranzilor, rezidenților și studenților

16-18 octombrie 2019



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

CERTIFICAT

DE PARTICIPARE

Se acordă Dnei/Dlui Stoian Alina

pentru participare activă la Zilele Universității
și Conferința științifică anuală a cadrelor științifico-didactice,
doctoranzilor, masteranzilor, rezidenților și studenților

15-19 octombrie 2018

12 ore
de educație medicală continuă





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



CERTIFICAT

DE PARTICIPARE

Se acordă Dnei/Dlui Stoian Alina

pentru participare activă la Zilele Universității
și Conferința științifică anuală consacrată aniversării a 90-a
de la nașterea ilustrului medic și savant Nicolae Testemițanu
18-20 octombrie 2017

12 ore
de educație medicală continuă



Prorector
Prorector pentru activitate științifică,
profesor universitar, dr. hab. șt. med.

INFORMAȚIE PERSONALĂ

Stoian Alina



📍 Republica Moldova
✉ drstoianalina@gmail.com
🌐 <https://www.facebook.com/alina.stoian.1694?mibextid=LQQJ4d>

Sexul: F
Cetățenia: MD/RO

EXPERIENȚA PROFESIONALĂ

- 16/10/2023 – prezent Cercetător științific
Rețeaua de Sănătate Universitară, Institutul de Cercetare a Spitalului General din Toronto, Strada College 101, Toronto, ON, M5G, 1L
Siba.haykal@yale.edu (MD, PhD, FRCSC, FACS, PI - investigator principal).
- 02/2020 – prezent Asistent universitar
Departamentul de ortopedie și traumatologie. Clinica de Chirurgie Plastică, Reconstructivă și Microchirurgie a Aparatului Locomotor, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, str. Ștefan cel Mare 165, Chișinău, Republica Moldova MD-2004
natalia.lupu@usmf.md (resurse umane).
- 2020 – 2023 Cercetator stiintific stagiar
Laboratorul de Inginerie Tisulară și Cultură Celulară, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, str. Ștefan cel Mare 165, Chișinău, Republica Moldova MD-2004.
viorel.nacu@usmf.md (MD, PhD, Profesor, șef laborator)
- 12.2021 – 02.2022 Cercetator stiintific voluntar
Centrul Avansat de Cercetare și Dezvoltare în Medicină Experimentală (CEMEX), „Grigore T. Popa”, Universitatea de Medicină și Farmacie, Iași, România. str. Mihail Kogalniceanu 9-13, Iasi 700259, Romania.
cemex@umfiasi.ro
- 2015 – 2019 Medic rezident,
Specialitatea Chirurgie Plastică, Estetică și Microchirurgie Reconstructivă. Institutul de Medicină de Urgență, str. Toma Ciorba nr.1, Chișinău MD-2004, Republica Moldova
grigore.verega@usmf.md (MD, PhD, Profesor, conducător de rezidențiat).

STUDII

2022 – 2023	Programul formării profesionale continue Psihopedagogie (Modulul psihopedagogic) Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, str. Ștefan cel Mare 165, Chișinău, Republica Moldova.
2017 – 2022	Doctorat Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, str. Ștefan cel Mare 165, Chișinău, Republica Moldova MD-2004 phdschool@usmf.md
2014 – 2019	Medic specialist Specialitatea Chirurgie Plastica, Estetica și Microchirurgie Reconstructivă Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, str. Ștefan cel Mare 165, Chișinău, Republica Moldova MD-2004 rezidentiat@usmf.md
2008 – 2014	Medic Facultatea Medicina Generală, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” str. Ștefan cel Mare 165, Chișinău, Republica Moldova MD-2004 contact@usmf.md
2005 – 2008	Elev Profil real, Liceul teoretic „Mihai Eminescu”, str. Mihai Eminescu 48, Cimișlia MD-4101, Republica Moldova mihaieminescu@yandex.com

FORMARE

13.06.2022 – 16.06.2022 08.08.2022 – 12.08.2022	Stagiu clinic în augmentarea mamară, Spitalul Polisano, 1A str. Izvorului, Sibiu, Romania hsiclovan@gmail.com (supervisor)
01.10.2020 – 31.03.2021	Cercetător stagiar (mobilitate de Doctorat) Școala de Medicină din Hanovra, Laboratoarele de Cercetare Leibniz pentru Biotehnologie și Organe Artificiale. Secția Chirurgie Cardioracică, Transplant și Vasculară. Strada Calr-Neuberg nr. 1, 30625, Hanovra, Germania. Andree.Birgit@mh-hannover.de (PhD, supervisor)
01.10.2020 – 19.12.2020	Curs de instruire "Protecția proprietății intelectuale și transferul de tehnologie" (proiectul Horizon2020 nanoMedTwin), Chișinău, Republica Moldova.
26.04.2017	AAHS (American Association for Hand Surgery) pre-congres curs avansat în chirurgia mâinii Cluj-Napoca, România.
21.06.2017 – 24.06.2017	Curs ISAPS (International Society of Aesthetic Plastic Surgery). Școala de Vara pentru Rezidenți în Chirurgie Plastica, Poiana Brasov, Romania.

- 23.06.2017 – 24.06.2017 Cursul didactic a Societatea Internationala de Chirurgie Plastica, Poiana Brasov, Romania.
- 13.11.2017 – 26.11.2017 Stagiul clinic în Chirurgie Plastică, Estetică
Dr. Gustavo Abrile-Cirurgia Plastica & Spa, Av. Gdor. Roca 960, N3300NOC
Posadas, Misiones, Argentina
gustavoabrile@gmail.com (supervisor)
- 09.11.2016 Seminar AO Trauma - Principiile actuale ale managementului fracturilor
Roadshow ediția Moldova, Chișinău.
- 01.04.2016 – 03.04.2016 Curs ISAPS (International Society of Aesthetic Plastic Surgery). Scoala de Vara pentru Rezidenti in Chirurgie Plastica, Poiana Brasov, Romania.

COMPETENȚE PERSONALE

Limba maternă Româna

Alte limbi străine cunoscute	INȚELEGERE		VORBIRE		SCRIERE
	Ascultare	Citire	Participare la conversație	Discurs oral	
Engleza	C1	C1	C1	C1	B2
Rusa	C1	C1	C1	C1	B2

INFORMAȚII SUPLIMENTARE

Conferințe/Congrese

- 5-6 April** 51st Annual Toronto Aesthetic Plastic Surgery Symposium, Toronto, Canada.
- 4 April** 21st Toronto Breast Surgery Symposium
- 3-4.11/2023** National Lymphedema Conference, Toronto, Canada.
- 21-24.09.2022** ISAPS (International Society of Aesthetic Plastic Surgery) World Congress, Istanbul, Turcia.
- 28-30.04.2022** 3in1 Joint Congress. 19th National Congress of the Romanian Association of Plastic Surgeons. 14th National Congress of the Romanian Society of Reconstructive Microsurgery. 13th national Congress of the Romanian Society for Surgery of the Hand, Timisoara, Romania.
- 22.10.2021** 29th Congress of the European Association of Tissue and Cell Banks (online).
- 20-22.10.2021** Annual Conference SUMPh “Nicolae Testemitanu”, Chisinau, Republic of Moldova.
- 8-9.07.2021** 4th International European Conference on Interdisciplinary Scientific Researches, Warsaw, Poland.
- 27-28.03.2021** ISAPS (International Society of Aesthetic Plastic Surgery) World Congress (online).
- 16-18.05.2019** International Molecular Medicine Symposium by the Bosphorus. Istanbul, Turcia.
- 09.05.2019- 11.05.2019** 11th BAPRAS Congress, 12th National Congress of RSSH and 13th National Congress of the RSRM, Cluj-Napoca, Romania.
- 16.05.2018- 19.05.2018** XVth Congress of the Romanian association of plastic surgeons, XIIth Congress of the Romanian Aesthetic Surgery Society, XXth Meeting of the euro mediteranean burns Council, Cluj-Napoca, Romania.
- 11.05.2018-13.05.2018** 10th edition of the international Medical Congress of Anti-Aging, Bucharest, Romania.

3-5.05.2018 7th edition of International Medical Congress for Students and Young Doctors. Chisinau, Republic of Moldova.

24.08.2017-27.08.2017 9th European Plastic Surgery Research Council Bucharest, Romania.

21.06.2017-24.06.2017 Romanian Aesthetic Society National Conference, Poiana Brasov, Romania.

26.04.2017-29.04.2017 The 12th National Congress of the Romanian Society for Reconstructive Microsurgery. The National Conference of the Romanian Association of Plastic Surgeons, Cluj-Napoca, România

26.04.2017-29.04.2017 The 11th National Congress of the Romanian Society for Surgery of the Hand. Cluj-Napoca, România.

12.10.2016-14.10.2016 VIIIth National Congress of the Traumatology and Orthopedy, Republic of Moldova.

2.06.2016-11.06.2016 XIVth Congress of ROAPS, Xth Congress of RASS, Bucharest Romania.

8.06.2016-11.06.2016 XIVth Congress of ROAPS, Xth Congress of RASS, Bucharest, Romania.

12.10.2016-14.10.2016 VIIIth National Congress of the Traumatology and Orthopedy, Republic of Moldova.

Publicații/Articole

Two Decades of Advances and Limitations in Organ Recellularization. **Alina Stoian**, Aisha Adil, Felor Biniazan, Siba Haykal. *Curr. Issues Mol. Biol.* 2024, 46(8), 9179-9214; <https://doi.org/10.3390/cimb46080543>

Adipose-Derived Stem Cells: Angiogenetic Potential and Utility in Tissue Engineering. F Biniazan*, **A Stoian***, S Haykal. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25(4), 2356; <https://doi.org/10.3390/ijms25042356>.

Effectiveness of tissue engineering in obtaining of the vascularized composite bone extracellular matrix. Experimental study. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Capros N., Verega Gr., Nacu V. In: Tiginyanu I., Sontea V., Railean S. (eds). Springer, Cham, 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2023. https://doi.org/10.1007/978-3-031-42775-6_39

The Critical Size Bone Defects - *In-Vivo* Experimental Method of the Treatment with the Decellularized Vascularized Bone Allografts. Pavlovschi E., **Stoian A.**, Verega Gr., Nacu V. In: Tiginyanu I., Sontea V., Railean S. (eds). Springer, Cham, 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2023. https://doi.org/10.1007/978-3-031-42775-6_37

In vivo experimental study of the arterial supply of the rabbit posterior limb. E Pavlovschi, **A Stoian**, Gr. Verega, V. Nacu. *Moldovan Medical Journal.* 2021. <https://doi.org/10.52418/moldovan-med-j.64-6.21.05>

Evolution of the efficacy of decellularization treatment in preparing decellularized umbilical cord artery. Malcova T., Globa L., Vascan A., Ţugui E., **Stoian A.**, Nacu V. In: Tiginyanu I., Sontea V., Railean S. (eds). Springer, Cham, 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2019. https://doi.org/10.1007/978-3-030-31866-6_105

Surgical treatment of infected bone defect in distal femur using island fibular flap. Iordachescu, **A. Stoian**, V. Mihaluta, O. catarau, M. Crudu, Gr. Verega. In: *Arta Medica.* ISSN 1810-1852. 2017 https://repository.usmf.md/bitstream/20.500.12710/9657/1/Iordachescu_Rodica_Stoian_Alina_Mihaluta_Viorica.TRATAMENTUL_CHIRURGICAL_AL_DEFECTULUI_OSOS_INFECTA_T.pdf

Plasty of Achilles region with propeller tendon-fasciocutaneous peroneal artery perforator flap

after radical excision of a neglected squamous cell carcinoma. Mihaluta, V., **Stoian, A.**, Iordăchescu, R., Pavlovschi, E., Cociug, A., Borș, E., Smolenschi, S., Verega, G. (2018). Archive of Clinical Cases, 5(3), Arch Clin Cases 2018; 5(3):104-108.

<https://doi.org/10.22551/2018.20.0503.10136>

Some peculiarities of migration of the island fibular flap in the proximal direction bellow calf borders. R. Iordachescu, **A. Stoian**, V. Mihaluta, I. Stegarescu, G. Verega. Вопросы реконструктивной и пластической хирургии № 3 (62) сентябрь 2017.

<https://journals.tsu.ru/uploads/import/1627/files/02.pdf>

Abstracte în cadrul congreselor și conferințelor științifice

Tratamentul chirurgical al defectului osos infectat la nivelul extremității femurale distale prin plastie cu lambou fibular insular. R. Iordachescu, **A. Stoian**, V. Mihaluta, O. catarau, M. Crudu, Gr. Verega. In: Arta Medica. ISSN 1810-1852. 2017.

Managementul defectelor osoase mari prin metoda membranei induse.

RAISCHI, Ion; **STOIAN, Alina**; IORDĂCHESCU, Rodica; DUMNAZEV, Ruslan; CEMÎRTAN. In: Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. 2023. Chișinău, Republica Moldova.

Evaluarea opțiunilor chirurgicale și impactul acestora în maladia dupuytren: rezultate și considerații.

FORTUNA, Elvira; CEBOTARI, Dana; ZABUTNAIA, Maria; **STOIAN, Alina**; MIHALUȚA, Viorica; BUZU, Dumitru. In: Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. 2023. Chișinău, Republica Moldova.

Utilizarea alogrefelor de nerv decelularizate în reconstrucția defectelor de nerv periferic.

ANTON, Doina-Cezara; VEREGA, Grigore; **STOIAN, Alina**; NACU, Viorel. In: Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. 2023. Chișinău, Republica Moldova.

Amniotic membrane as a source of treatment in trophic ulcer of the lower limb.

MIHALUȚA, Viorica; **STOIAN, Alina**; VEREGA, Grigore; NACU, Viorel. In: Cells and tissues transplantation. Actualities and perspectives. 2023. Chișinău. Republica Moldova.

Membrana amniotică decelularizată în tratamentul ulcerelor la pacienții diabetici.

MIHALUȚA, Viorica; **STOIAN, Alina**; IGNATOV, Olga; VEREGA, Grigore; NACU, Viorel. In: Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. 2023. Chișinău, Republica Moldova.

Membrana amniotică decelularizată în tratamentul ulcerelor la pacienții diabetici.

MIHALUȚA, Viorica; **STOIAN, Alina**; IGNATOV, Olga; VEREGA, Grigore; NACU, Viorel. In: Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. 2023. Chișinău, Republica Moldova.

Decellularized Amniotic Membrane: An Innovative Solution for Tissue Regeneration and Ulcer Therapy.

MIHALUȚA, Viorica; **STOIAN, Alina**; IGNATOV, Olga; VEREGA, Grigore; NACU, Viorel. In: Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering. NanoBioMat 2023. Summer Edition. 2023.

The vascularized bone allotransplantation after decellularization process, in vivo testing.

PAVLOVSCHI, Elena; **STOIAN, Alina**; GARDIKIOTIS, Ioannis; VEREGA, Grigore; NACU, Viorel; CERNEI, Gherman. In: Cells and tissues transplantation. Actualities and perspectives. 2023. Chișinău.

Experimental study in obtaining of a vascularised composite bone extracellular matrix.

STOIAN, Alina; PAVLOVSCHI, Elena; VEREGA, Grigore; BIRGIT, Andree; HILFIKER, Andres; NACU, Viorel. In: Cells and tissues transplantation. Actualities and perspectives. 2023. Chișinău.

Experimental study in non/immunogen vascularized bone allograft.

Stoian A., Pavlovschi E., Verega Gr., Nacu V., Andree B., Hilfiker A., In: Abstract book of 3in1 joint

congress in plastic and reconstructive surgery. Timișoara, România, 2022.

The vascularized bone allotransplantation in vivo experiment. Preliminary report.

PAVLOVSCHI E., **STOIAN A.**, Verega Gr., Nacu V., In: Abstract book of 4th international european conference on interdisciplinary scientific researcher. Warsaw, Poland, 2021.

Dupuytren's disease – treatment particularities.

FORTUNA, Elvira; **STOIAN, Alina**; MIHALUȚA, Viorica; BUZU, Dumitru; VEREGA, Grigore. In: Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. 2021. Chișinău, Republica Moldova.

The application of medial plantar flap.

CEBOTARI, Dana; IORDĂCHESCU, Rodica; **STOIAN, Alina**; FORTUNA, Elvira; VEREGA, Grigore. In: Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. 2021. Chișinău, Republica Moldova.

A review of complications and their treatments in facial aesthetic surgery.

ZABUTNAIA, Maria; IORDĂCHESCU, Rodica; **STOIAN, Alina**; CEBOTARI, Dana; VEREGA, Grigore. In: Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. 2021. Chișinău, Republica Moldova.

Conservation features of bone allografts with the perspective of their reinclusion in the host organism.

BALAN, Elisa; NACU, Viorel; VEREGA, Grigore; **STOIAN, Alina**. In: Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. 2021. Chișinău, Republica Moldova.

Principles of decellularization for composite vascularized bone graft.

STOIAN, Alina; PAVLOVSCHI, Elena; NACU, Viorel; SANJA, Sladic; BIRGIT, Andree; HILFIKER, Andres. In: Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. 2021. Chișinău, Republica Moldova.

Surgery protocol of vascularized bone allotransplant. The next stage of in vivo experimental study.

PAVLOVSCHI, Elena; VEREGA, Grigore; **STOIAN, Alina**; NACU, Viorel. In: Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. 2021. Chișinău, Republica Moldova.

The use of amniotic membrane in wounds of the lower limbs at diabetic patients, literary review.

MIHALUȚA, Viorica; **STOIAN, Alina**; IGNATOV, Olga; PROCOPCIUC, Vitalie; VEREGA, Grigore; NACU, Viorel. In: Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. 2021. Chișinău, Republica Moldova.

Amniotic membrane in the treatment of defects in diabetic patients.

MIHALUȚA, Viorica; **STOIAN, Alina**; FEGHIU, Leonid; FORTUNA, Elvira. In: MedEsperaInternational Medical Congress for Students and Young Doctors. 8. 2020. Chisinau, Republic of Moldova.

Artrodeza genunchiului cu lambou compozit fibular. Raport de caz clinic.

PAVLOVSCHI, Elena; **STOIAN, Alina**; IORDĂCHESCU, Rodica; MIHALUȚA, Viorica. In: Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”. 2020. Chișinău.

Decelularizarea combinată a allogrefei osoase vascularizate. etapă de studiu experimental in vivo.

PAVLOVSCHI, Elena; **STOIAN, Alina**; MALCOVA, Tatiana; IORDĂCHESCU, Rodica; VEREGA, Grigore. In: Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”. 2020. Chișinău.

Lambourile locoregionale în tratamentul defectelor gambei și gleznei parvenite după exereze oncologice.

POPA, Daniela; IORDĂCHESCU, Rodica; **STOIAN, Alina**; MIHALUȚA, Viorica; FORTUNA, Elvira; VEREGA, Grigore. In: Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. 2020. Chișinău.

Percutaneous needle aponeurotomy.

FORTUNA, Elvira; **STOIAN, Alina**; IORDĂCHESCU, Rodica; ZABUTNAIA, Maria; VOICU,

Paulina; CEBOTARI, Dana. In: MedEsperaInternational Medical Congress for Students and Young Doctors. 8. 2020. Chisinau, Republic of Moldova.

Pedicled groin flap for soft tissue coverage.

CEBOTARI, Dana; IORDĂCHESCU, Rodica; **STOIAN, Alina**; FORTUNA, Elvira; GOLOGAN, Paulina; ZABUTNAIA, Maria. In: MedEsperaInternational Medical Congress for Students and Young Doctors. 8. 2020. Chisinau, Republic of Moldova.

The vascularized bone allotransplantation - in a rabbit model, preliminary report.

PAVLOVSCHI, Elena; **STOIAN, Alina**. In: MedEsperaInternational Medical Congress for Students and Young Doctors. 8. 2020. Chisinau, Republic of Moldova.

Latissimus Dorsi flap in reconstruction of the soft-tissue defects of the trunk.

ZABUTNAIA, Maria; IORDĂCHESCU, Rodica; **STOIAN, Alina**; CEBOTARI, Dana; VOICU, Paulina; FORTUNA, Elvira. In: MedEsperaInternational Medical Congress for Students and Young Doctors. 8. 2020. Chisinau, Republic of Moldova.

Breast reconstruction on irradiated territory using tissue expander technique and Latissimus Dorsi flap: a case report.

GOLOGAN, Paulina; **STOIAN, Alina**; IORDĂCHESCU, Rodica; ZABUTNAIA, Maria; CEBOTARI, Dana. In: MedEsperaInternational Medical Congress for Students and Young Doctors. 8. 2020. Chisinau, Republic of Moldova.

The post-oncologic reconstruction of inferior limb with perforator flap.

OSMATESCU, Angela; **STOIAN, Alina**. In: MedEsperaInternational Medical Congress for Students and Young Doctors. 8. 2020. Chisinau, Republic of Moldova.

Lamboul fibular în reconstrucția defectului osos mandibular. Caz clinic.

STOIAN, Alina; MIHALUȚA, Viorica; GHEȚIU, Alexandru; CALISTRU, Anatol; SÎRBU, Dumitru; VEREGA, Grigore. In: Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. 2020.

Perspectiva de viitor a alotransplantului osos vascularizat.

STOIAN, Alina; NACU, Viorel; PAVLOVSCHI, Elena; MACAGONOVA, Olga; MALCOVA, Tatiana; MIHALUȚA, Viorica. In: Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. 2020. Chișinău.

Membrana amniotică: sursă de tratament al defectelor cutanate la pacienții diabetici.

MIHALUȚA, Viorica; PROCOPCIUC, Vitalie; IGNATOV, Olga; **STOIAN, Alina**; VEREGA, Grigore; NACU, Viorel. In: Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”. 2020. Chișinău.

Fasciotomia percutană în contractura Dupuytren. Caz clinic.

FORTUNA, Elvira; **STOIAN, Alina**; MIHALUȚA, Viorica; CEBOTARI, Dana; POPA, Daniela; VEREGA, Grigore. In: Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. 2020. Chișinău.

Utilizarea terapiei cu presiune negativă în tratamentul defectelor infectate.

GOLOGAN, Paulina; IORDĂCHESCU, Rodica; **STOIAN, Alina**; MIHALUȚA, Viorica; FORTUNA, Elvira; VEREGA, Grigore. In: Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. 2020. Chișinău.

Utilizarea lamboului latissimus dorsi în reconstrucția defectului cutanat masiv apărut după exereza oncologică a spatelui.

ANTON, Cezara; **STOIAN, Alina**; FORTUNA, Elvira; MIHALUȚA, Viorica; IORDĂCHESCU, Rodica; VEREGA, Grigore. In: Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. 2020. Chișinău.

Lamboul corticoperiosteocutanat în tratamentul pseudartrozelor septice de tibie. Caz clinic.

IODĂCHESCU, Rodica; **STOIAN, Alina**; GORNEA, Tatiana; IVANOV, Vladimir; VEREGA, Grigore. In: Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. 2020. Chișinău.

Importanța estetică a mâinii operate.

CEBOTARI, Dana; IORDĂCHESCU, Rodica; **STOIAN, Alina**; FORTUNA, Elvira; ZABUTNAIA, Maria; VEREGA, Grigore. In: Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. 2020. Chișinău.

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

Reconstruction of the scalp defect with the trapezius muscle flap (clinical case).

MIHALUȚA, Viorica; **STOIAN, Alina**; PAVLOVSCHI, Elena. In: MedEsperaInternational Medical Congress for Students and Young Doctors. 7. 2018. Chisinau, Republic of Moldova.

The vascularized allotransplant– successful alternative for massive bone defects.

PAVLOVSCHI, Elena; **STOIAN, Alina**; MIHALUȚA, Viorica. In: MedEsperaInternational Medical Congress for Students and Young Doctors. 7. 2018. Chisinau, Republic of Moldova.

Lamboul musculo-cutanat de mușchi trapez (caz clinic).

MIHALUȚA, Viorica; **STOIAN, Alina**; CUCOS, Natalia; STEGĂRESCU, Ion; STRATAN, Vladimir; VEREGA, Grigore. In: Conferințele Institutului Regional de Oncologie Iasi. Vol. 6. 2017. Iași, România.

Rezolvarea unui caz complicat septic după protezarea totală de genunchi, la un pacient oncologic.

VEREGA, Grigore; IORDĂCHESCU, Rodica; **STOIAN, Alina**; MIHALUȚA, Viorica; CUCOS, Natalia. In: Arta Medica, Chisinau, 2016

Tratamentul defectelor posttraumatice la nivelul membrului pelvin la pacienții diabetici.

VEREGA, Grigore; IORDĂCHESCU, Rodica; MIHALUȚA, Viorica; **STOIAN, Alina**; CUCOS, Natalia; PANCIUC, Alina. In: Arta Medica, 2016.

Reconstrucția defectelor tisulare secundare fracturilor deschise la nivelul gambei – caz clinic.

CATARĂU, Olesea; VEREGA, Grigore; **STOIAN, Alina**; IORDĂCHESCU, Rodica; MELENCIUC, Maxim; VRABII, Vitalii. In: Arta Medica, Chisinau, 2016.

Lamboul Latissimus Dorsi pediculat în defectele trunchiului și membrului superior: posibilități și limite.

CATARĂU, Olesea; VEREGA, Grigore; **STOIAN, Alina**; PANCIUC, Alina; GARBUZ, Mihai. In: Arta Medica, Chisinau, 2016.

Lambourile loco-regionale în tratamentul defectelor tegumentare actinice.

VEREGA, Grigore; IORDĂCHESCU, Rodica; MUNTEANU, Ana; **STOIAN, Alina**; MIHALUȚA, Viorica. In: Arta Medica, Chisinau, 2016.

Plastia defectelor gleznei și piciorului generate de cancerul pavimentos al pielii.

VEREGA, Grigore; IORDĂCHESCU, Rodica; **STOIAN, Alina**; MIHALUȚA, Viorica; CATARĂU, Olesea. In: Arta Medica, Chisinau, 2016.

Fasciotomia închisă în patologia Dupuytren – discuții asupra unui caz clinic.

VEREGA, Grigore; CUCOȘ, Nicolae; **STOIAN, Alina**; CATARĂU, Olesea; STRATAN, Valentina; MIHALUȚA, Viorica. In: Arta Medica, Chisinau, 2015.

Reconstrucția sânelui pe un teritoriu afectat actinic prin utilizarea plastiei cu lambou latissimus dorsi și a dermatensiei (caz clinic).

VEREGA, Grigore; IORDĂCHESCU, Rodica; CATARĂU, Olesea; **STOIAN, Alina**; MIHALUȚA, Viorica; GARBUZ, Mihai. In: Arta Medica, Chisinau, 2015.

Declarația privind asumarea răspunderii

Subsemnatul, 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.

Numele: STOIAN, Alina

Semnătura



Data: 30.09.2024

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.

Name: STOIAN, Alina

Signature



Date: 30.09.2024

Déclaration sur la responsabilité

Je déclare la responsabilité personnelle que les informations présentées dans cette thèse sont le résultat de mes propres recherches et réalisations scientifiques. Je me rends compte que, sinon, en subiront les conséquences conformément à la loi.

Nom: STOIAN, Alina

Signature



Date: 30.09.2024