

ȘCOALA DOCTORALĂ ÎN DOMENIUL ȘTIINȚE MEDICALE

Cu titlu de manuscris

CZU: 616.72-018.3-001-003.93-092.9:602.9:611.018.3(043.2)

COBZAC VITALIE

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

341.01. INGINERIE TISULARĂ ȘI CULTURI CELULARE

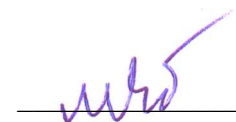
Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Chișinău, 2023

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

Conducător

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



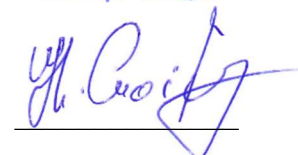
Conducator prin cotutelă

Vereștiuc Liliana,
dr. șt. ing. mater., prof. univ.



Membrii comisiei de îndrumare:

Croitor Gheorghe,
dr. hab. șt. med., conf. univ.



Taran Anatolie,
dr. hab. șt. med., conf. univ.



Butnaru Maria,
dr. șt. biol., conf. univ.



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

Componența Comisiei de susținere publică a tezei de doctorat:

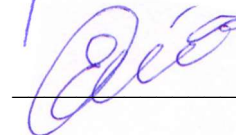
Președinte:

Caproș Nicolae,
dr. hab. șt. med., prof. univ.



Secretar:

Erhan Nicolae,
dr. șt. med., conf. univ.,



Membrii:

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



Vereștiuc Liliana,
dr. șt. ing. mater., prof. univ.



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



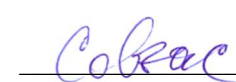
Bețișor Alexandru,
dr. șt. med., conf. univ.,



Butnaru Maria,
dr. șt. biol., conf. univ.,



Autor
Cobzac Vitalie



CUPRINS

Introducere.....	4
1. METODOLOGIE GENERALĂ	6
1.1 Prezentarea generală a studiului efectuat	6
1.2 Prepararea și păstrarea reactivilor	7
1.3 Anestezia animalelor	7
2. IZOLAREA, CULTIVAREA ȘI IDENTIFICAREA CELULELOR STEM MEZENCHIMALE DIN MĂDUVA OSOASĂ.....	7
2.1 Metode	7
2.2 Rezultate	8
3. IZOLAREA ȘI CULTIVAREA CONDROCITELOR DIN CARTILAJUL ARTICULAR DE IEPURE.	9
3.1 Metode	9
3.2 Rezultate	10
4. OBȚINEREA GREFEI BIFAZICE DIN ȚESUT OSTEOCONDAL PRIN TEHNICI DE INGINERIE TISULARĂ.	11
4.1 Metode	11
4.2 Rezultate	12
5. TESTAREA <i>IN VIVO</i> A GREFELOR COMBinate ÎN REGENERAREA CARTILAJULUI ARTICULAR.	17
5.1 Metode	17
5.2 Rezultate	21
SINTEZA REZULTATELOR OBȚINUTE	23
CONCLUZII	24
RECOMANDĂRI PRACTICE	24
BIBLIOGRAFIE	25
LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE	27

Introducere

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

Alterarea biomecanicii ce a apărut ca urmare a unei leziuni suportate la nivel de articulație va duce la degradarea artrozică progresivă a articulației. Circa 12% din toate cazurile de artroză au fost de origine posttraumatică [7]. De asemenea, a fost dovedit că chiar și după stabilizarea articulației traumatizate prin metode chirurgicale, oprirea degradării articulare nu va fi stopată. Acest proces de degradare artrozică a articulațiilor se datorează leziunilor survenite la nivel molecular și celular ca urmare a traumatismului suportat, ceea ce duce la acumularea de enzime degradante și citokine, soldat cu alterarea structurii colagenului, hidratare excesivă a matricii și fisurarea suprafeței articulare. De asemenea, a fost constatat că circa 50% din pacienți după o leziune severă a genunchiului au dezvoltat gonartroză până la 20 de ani, iar dacă era prezentă și o fractură intraarticulară riscul artrozei creștea până la 75% [7, 8].

Există o ipoteză, că din cauza lipsei vaselor sangvine, nervilor și vaselor limfatice în structura cartilajului articular, răspunsul inflamator la o oarecare leziune a acestuia este predominant condrocitar, acesta la rândul lui fiind exagerat. A fost presupus că atenuarea precoce a acestui răspuns la leziune ar putea opri degradarea ireversibilă la nivel molecular a condrocitelor și țesuturilor articulare [8]. Până la momentul actual au fost descrise diverse modalități experimentale, non-chirurgicale de tratament a defectelor de cartilaj articular, ca utilizarea unor compuși biologic activi de tip p188 și rotenona [8]. Fiind membranostabilizatori, aceștia inhibă sau blochează proteina p38 activată de stress, inhibă activarea glicogen sintazei kinaza-3 și procesul inflamator legat de interleukina-6 [9]. De asemenea, a fost testată utilizarea inhibitorilor citokinelor proinflamatorii ca antagoniștii receptorilor interleukinei-1 (IL-1RA) și a factorului de necroză tumorală- α 1 (TNF- α 1). Testele pe model animal au arătat că utilizarea antagoniștilor receptorilor IL-1RA a redus edemul osului subcondral, fibrilarea suprafeței articulare și necroza condrocitelor. De asemenea, utilizarea antagonistului receptorilor TNF- α 1, s-a soldat cu diminuarea expresiei genelor metaloproteinazelor (MP) MP-1, MP-3 și MP-13 ceea ce a redus sinteza prostaglandinelor și a crescut sinteza de lubricină [10]. Un alt grup de substanțe cercetate, cu potențial de inhibiție a procesului degradării cartilajului după o leziune la nivel de articulație, au fost agenții pentru protecția matricii cartilajinoase. Din aceste substanțe fac parte captatorii de specii reactive de oxigen, inhibitorii de oxid nitric, inhibitorii de citokine inflamatorii și inhibitorii specifici de MP [11]. În testele ce au fost efectuate *in vitro* și pe model animal, au fost obținute rezultate promițătoare în utilizarea factorilor de creștere cu scop de a stimula regenerarea cartilajului lezat prin activarea procesului anabolic al cartilajului [12]. Rezultate bune au fost obținute și la utilizarea proteinelor morfogenetice osoase BMP-7 și BMP-2, datorită efectelor sale anabolice și anticatabolice asupra cartilajului [13], printre care se enumără stimularea regenerării și reparării cartilajului articular și asigurarea integrării eficiente a cartilajului nou format cu cel din

jur [14]. Efecte similare au fost obținute și la utilizarea de *Insulin-like growth factor-1* în defectele de cartilaj cauzate de artroză [15]. Având în vedere că metodele non-chirurgicale de tratament ale defectelor de cartilaj nu au obținut o răspândire vastă și rămân doar la nivel de laborator și centre de cercetare, regenerarea defectelor de cartilaj articular a devenit în exclusivitate povara chirurgiei ortopedice și medicinei regenerative.

Tratamentul chirurgical al defectelor de cartilaj articular la nivelul articulațiilor mari în mare parte a depins de accesul către acestea. La compararea accesibilității către articulațiile șoldului, genunchiului, gleznei și umărului, tratamentul cartilajului articular la nivel de șold a fost mult mai complicat în realizare, iar cazurile ce ar necesita regenerarea cartilajului articular la nivel de umăr și gleznă au fost mult mai rare comparativ cu articulația genunchiului. Pentru a evita degradarea artrozică a articulației, tacticile contemporane de tratament, tind să repare chirurgical și defectele mici de cartilaj articular, care în cazul genunchiului reprezintă $<4 \text{ cm}^2$ [4]. De regulă, scopul tratamentului leziunilor de cartilaj a fost reducerea sindromului algic, creșterea amplitudei mișcărilor în articulație și prevenirea sau întârzierea degradării artrozice a articulațiilor, ce se soldau cu invalidizarea pacientului, unde ca ultima ieșire din situație era efectuarea artroplastiei totale [16]. La ziua de azi au fost descrise numeroase modalități de tratament ale defectelor de cartilaj, din acestea fac parte diverse tehnici chirurgicale prin implicarea măduvei osoase [2], transplantarea de țesut osteocondral (OC) alogen [17] sau autolog [18], implantarea de condrocite autologe și celule stem mezenchimale (CSM) într-un defect combinate, sau nu, cu un suport tridimensional [19]. Necătând la numeroase metode de tratament, obținerea în final a unui țesut cartilagos hialin articular nu a fost posibilă [20]. Totodată, utilizarea în regenerarea cartilajului articular a grefelor combinate cu celule cu potențial condroprogenitor rămâne una de perspectivă [21]. A fost constatat că grefele combinate obținute pentru regenerarea cartilajului articular trebuie să consiste din structuri ce mimează cartilajul articular și trebuie să fie populate cu celule ce au potențial condroprogenitor [13].

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

Obiectivele cercetării:

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

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

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

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

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

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

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

1. METODOLOGIE GENERALĂ

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

1.1 Prezentarea generală a studiului efectuat

În cercetarea efectuată m-am condus de primul din conceptele “celor trei R”, adoptat de Congresul Internațional de Standardizare Biologică (San Antonio, SUA, 1979) [33]. Ca urmare, în cercetare au fost utilizați 55 iepuri de casă, cu vârsta de 5 ± 0.5 luni, masa corpului de 3.51 ± 0.49 kg, 30 femele și 25 masculi. Din aceștia în calitate de donatori de celule și țesuturi pentru efectuarea cercetărilor au fost 13 iepuri. Celulele obținute au fost CSM din măduva osoasă și condrocitele izolate din cartilajul articular hialin, iar de la femurele distale a fost colectat țesutul osteocondral pentru pregătirea grefelor osteocondrale demineralizate și decelularizate (OCDD). Animalele donatoare de țesuturi au fost sacrificate în camera cu CO₂ în conformitate cu protocolul operațional standardizat. Pentru testele *in vivo* au fost create 3 loturi a câte 12 iepuri: primul lot era constituit din iepurii defectele defectele experimentale osteocondrale ale cărora au fost tratate cu grefe OCDD combinate cu condrocite, în al doilea lot defectele experimentale au fost tratate cu grefe OCDD combinate cu CSM și lotul martor consta din iepurii defectele de cartilaj a cărora au fost tratate prin transfer de țesut osteocondral autolog. Au fost înregistrate 7 cazuri de eșec, dintre care 2 fracturi intraoperatorii și 5 decese la termeni diferiți. Cazurile de eșec au fost înlocuite cu alți iepuri. Doar un iepure cu fractură a fost utilizat ulterior în calitate de donator de țesuturi.

Teza are o structurare tradițională complexă, iar studiile prezentate în cadrul acesteia au fost realizate în 3 etape, ce sunt prezentate în tabelul 1.1.

Tabelul 1.1. **Designul studiului.**

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

1.2 Prepararea și păstrarea reactivilor

Pentru realizarea cercetărilor cu celule au fost pregătite următoarele soluții și medii de cultură: mediu de cultură pentru condrocite, mediul pentru izolarea și cultivarea CSM, mediul pentru diferențierea condrocitară, mediu pentru cultura CSM, soluție colagenază 0.6%, soluție Tripsină-EDTA 0.25%, mediu pentru conservarea celulelor.

Pregătirea reactivilor pentru testul de citotoxicitate cu Bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu (MTT): soluția stock MTT de 0.5% m/v în Soluție salină echilibrată Hanks (HBSS) fără roșu de fenol și soluția de lucru MTT 0.5% v/v în mediu de cultură celulară.

Pentru examinarea probelor la microscopia fluorescentă cu Diclorhidrat de 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) au fost pregătite următoarele reactive: soluția de 4% paraformaldehidă, soluția stock de 1mM DAPI în DMSO; soluția de lucru DAPI în Dulbecco bufer fosfat salin (DPBS) și soluția de permeabilizare membranară.

Pentru efectuarea testului de degradare enzimatică au fost pregătite următoarele reactive: reactivul de ninhidrină și soluția de colagenază 0.01% în bufer fosfat salin (PBS).

Pentru examinarea histologică au fost pregătite următoarele reactive: soluția de 10% Formaldehidă buferizată, soluția de 0.4% Albastru de Toluidină, soluția de 0.1M Bufer acetat de natriu; soluții de 0.001% și 0.02% de Fast Green, soluția de 0.1% Safranin O și soluție de 1% acid acetic.

1.3 Anestezia animalelor

La nivelul șoldului sau spatelui au fost injectate soluțiile de xylla 5 mg/kg (De Adelaar, Olanda), soluție diazepeks 0.5% – 2 mg/kg (Grindex, Letonia) și soluție ketamin 35 mg/kg (Farmako, Moldova). La fiecare 30 de minute s-a adăugat câte o jumătate din dozele inițiale de preparate pentru prelungirea anesteziei.

Analiza statistică a fost realizată cu ajutorul programelor Excel din Microsoft Office versiunea 2020 și SPSS (Statistical Package for the Social Sciences. Versiunea 18.0, Inc. Chicago, IL, SUA).

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

2.1 Metode

În experiment au fost utilizați 9 iepuri. După efectuarea anesteziei și înlăturarea blâniei de la nivelul bazinului, în condiții sterile, utilizând o seringă de 5 ml cu 1250-2000 U heparină măduva osoasă (MO) a fost colectată din aripa osului iliac după o tehnică proprie. În laborator seringă cu MO prelevată a fost procesată în condiții sterile. Prin centrifugare pe gradient de concentrație HiSep

LSM 1077 (HiMedia, India), au fost separate celulele nucleate și apoi incubate la 37°C cu 5% CO₂ (Smart Cell, Heal Force) în flacon pentru culturi celulare de 25cm², în mediu pentru izolarea și cultivarea CSM - HiMeso XL (HiMedia, India). CSM izolate au fost cultivate pe parcursul a două pasaje. Celulele izolate au fost identificate drept CSM prin diferențiere pe linie condrocitară [25].

2.2 Rezultate

Durata procesului de prelevare a MO de la începutul anesteziei a durat în mediu 36 ±3 minute, fără înregistrarea cărorva complicații la animalele experimentale. În mediu au fost prelevate 3.39 ±1.27 ml de MO. Durata medie de cultivare a celulelor în primul pasaj până la confluența de 70-80% a fost de 7±1 zile.

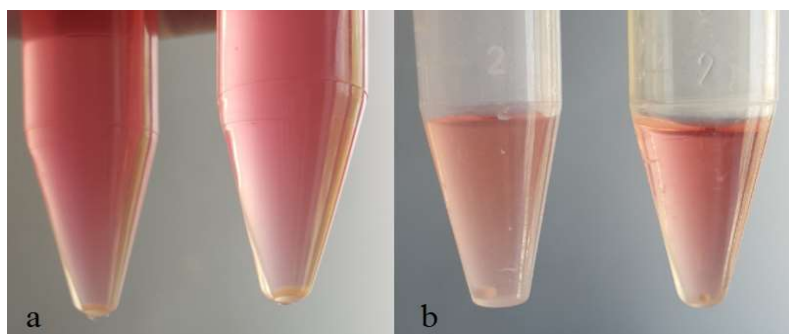


Figura 2.1. **Diferențierea celulară pe linie condrocitară în eprubete de 15 ml din polipropilen. Aspect a 1×10^6 CSM la începutul diferențierii pe linie condrocitară (a) și formarea agregatelor condrocitare (b).**

A fost determinată o corelație puternică între volumul de MO prelevată și numărul de zile necesare pentru a obține o confluență celulară ($p < 0.001$). Cu cât volumul de MO era mai mare cu atât viteza de confluență a celulelor era mai rapidă și invers. Cu toate acestea, nu a fost determinată nici o corelație dintre numărul de celule obținute în primul pasaj și volumul de MO prelevat ($p > 0.5$), aceasta poate fi explicat prin faptul că durata de cultivare a celulelor pentru a obține confluența celulară necesară era diferită, numărul de CSM era diferit de la caz la caz, iar nivelul de confluență stabilit vizual nu este o apreciere obiectivă. Deci, în urma cultivării celulelor în primul pasaj au fost obținute circa $7.47 \times 10^5 \pm 6.9 \times 10^4$ de celule per flacon, iar după 5 zile de cultivare în pasajul II în flacoane de 75 cm², până la o confluență celulară de 80-90% au fost obținute $4.12 \times 10^6 \pm 4.64 \times 10^5$ celule per flacon.

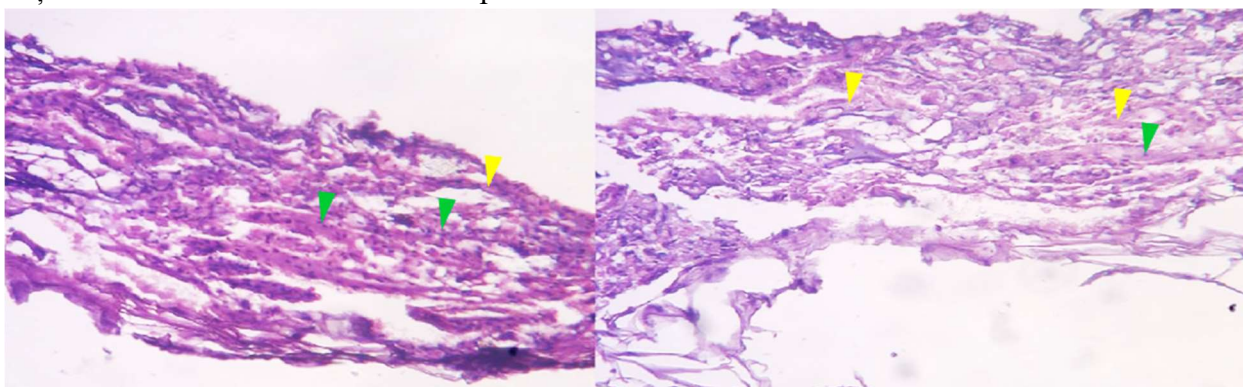


Figura 2.2. **Colorarea cu Hematoxină-Eozină a agregatelor condrocitare x60 (MT-2, Olympus). A fost determinată prezența unei densități mari de nucleu (verde), dar și formarea de MEC (galben).**

Ținând cont de faptul că în pasajul II durata de cultivare a CSM era aceeași, a fost determinat că numărul de celule obținute în pasajul II depinde în mod direct de numărul celulelor viabile obținute în pasajul I ($p < 0.001$). Ca urmare, durata medie de cultivare a celulelor pe parcursul

primelor 2 pasaje a fost de 12 ± 1 zile, viabilitatea celulară fiind de 100% în toate cazurile.

În procesul de diferențiere condrocitară sa fost determinată formarea de agregate celulare care erau de formă sferică neregulată, atașate de fundul eprubetei [25]. De asemenea, în primele zile de diferențiere, celulele puteau fi ușor dispersate prin pipetare, iar după ce au devenit agregate cu aspect de ou, acest lucru nu mai era posibil [25]. Chiar dacă agregatele celulare erau constituite din același număr de celule, acestea puteau fi de dimensiuni diferite, aproximativ 1.5-3 mm în diametru (figura 2.1).

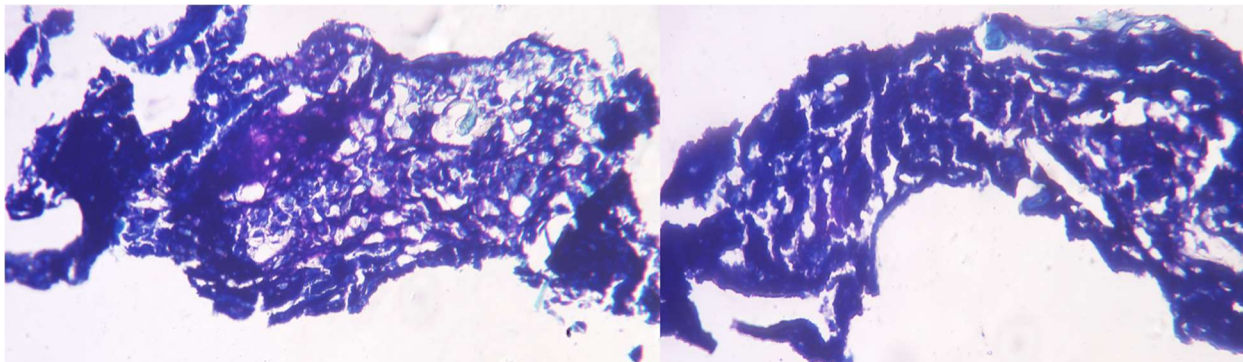


Figura 2.3. Colorarea cu Albastru de Toluidină și Fast Green a agregatelor formate x40 (MT-2, Olympus). Prezența unei colorări în albastru-violet închis demonstrează prezența în MEC a unui conținut înalt de GAG.

La examenul histologic cu Hematoxină-Eozină a fost determinată o celularizare bogată a agregatelor obținute, evidențiată printr-o densitate mare de nuclee, dar și formarea de matrice extracelulară (MEC) (figura 2.2). La colorarea cu Albastru de Toluidină și Fast Green, structura obținută a fost colorată intens în culori violetă și albastră, ceea ce este specific pentru glicozaminoglicani (GAG) ce sunt prezenți în MEC a țesutului cartilajului (figura 2.3). La colorarea cu Safranin O a fost determinat un număr mare de nuclee de culoare întunecată, iar MEC sintetizată de către celule, bogată în GAG, a fost colorată în roșu, ceea ce este specific pentru țesutul cartilajului (figura 2.4).

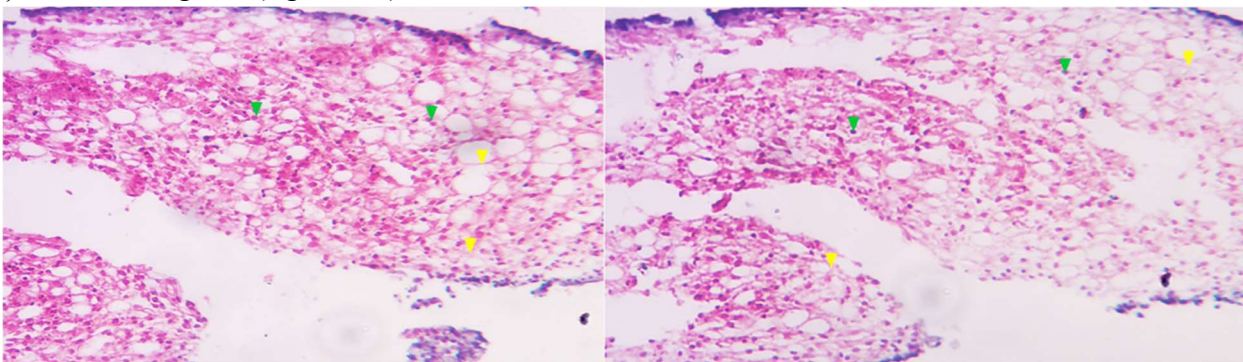


Figura 2.4. Colorarea cu Safranin O a agregatelor formate x60 (MT-2, Olympus). A fost determinată colorarea MEC în roșu (galben) datorită prezenței de GAG, și o densitate mare de nuclee (verde).

3. IZOLAREA ȘI CULTIVAREA CONDRUCITELOR DIN CARTILAJUL ARTICULAR DE IEPURE.

3.1 Metode

Cu anestezie generală, după înlăturarea blăni, în condiții sterile, prin abord parapatelar medial, de aproximativ 1-1.5 cm lungime, a fost deschisă articulația genunchiului [26, 27]. Apoi, de pe suprafața neportantă a condilului femural de la nivelul șanțului trohlear, au fost prelevate

bucăți mici de cartilaj articular, ce au fost introduse într-o eprubetă de 15 ml cu mediu de cultură pentru condrocite. În hota cu flux laminar (LN 090, Nuve), cartilajul prelevat a fost spălat cu PBS (HiMedia, India) și mărunțit cu un bisturiu până la fragmente de 1-2 mm³, după care fragmentele au fost introduse într-o eprubetă sterilă de 15 ml cu 5 ml de tripsină-EDTA 0.25% pentru predigestie [22]. Bucățile de cartilaj au fost agitate timp de 10 minute la un agitator orbital (ES-20, Biosan) la 150 rpm, 37°C. Apoi, bucățile de cartilaj au fost resuspendate în câte 2 ml de soluție colagenază 0.6%. În dependență de modalitatea de dogestie în colagenază au fost formate 2 grupuri, în fiecare câte 9 cazuri. În grupul I bucățile de cartilaj cu soluția de colagenază au fost introduse în eprubete de 15 ml, iar în grupul II în flacoane pentru cultură celulară de 25 cm² (Nunc, Suedia). Vasele din ambele grupe au fost introduse în incubator (Heal Force, Start Cell) la 37°C cu 5% CO₂ și amplasate pe agitator tip rocker (MR-1, Biosan). Pe agitator eprubeta a fost pusă în poziție orizontală, iar flaconul a fost plasat pe una din suprafețele sale laterale [26]. Vasele din ambele grupe au fost agitate la 20-25 oscilații/minut. Durata de digestie enzimatică în grupul I a fost fixă, de 360 minute, iar în grupul II a variat în dependență de cantitatea de celule prezente în câmpul de vedere. Astfel, după 120 minute de digestie, procesul a fost monitorizat sub microscop fiecare 10-20 de minute, cu întreruperea procesului de digestie enzimatică a cartilajului când condrocitele eliberate din țesut ocupau aproximativ 50-60% din câmpul de vedere, chiar dacă cartilajul nu era complet digerat. Condrocitele obținute în fiecare caz au fost introduse în câte un flacon de cultură celulară de 25 cm² (Nunc, Suedia) și incubate la 37°C, 5% CO₂.

Celulele izolate au fost identificate drept condrocite în urma cultivării în supraconfluență pe parcursul a 16 zile, în calitate de martor paralel au fost cultivate CSM. MEC sintetizată de celulele respective a fost identificată drept cartilaginoasă prin utilizarea colorărilor specifice pentru GAG – Albastru de toluidină cu Fast Green și Safranin O.

3.2 Rezultate

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

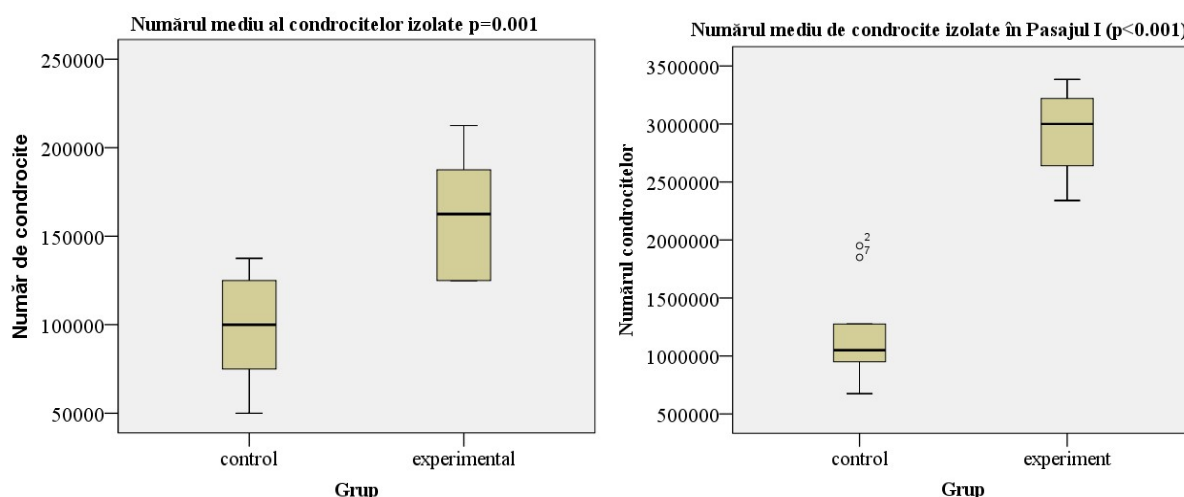


Figura 3.1. **Reprezentarea comparativă a numărului de condrocite izolate (stânga) și numărul total de condrocite obținut în primul pasaj (dreapta).**

Astfel, în grupul control în mediu au fost izolate $9.2 \times 10^4 \pm 3.1 \times 10^4$ condrocite [26], atunci când în grupul experimental, prin monitorizare continuă, au fost izolate aproape de 2 ori mai multe – $1.6 \times 10^5 \pm 3.4 \times 10^4$ celule ($p = 0.001$) (figura 3.1). De asemenea, durata îndelungată de expunere

la colagenază a influențat negativ numărul celulelor izolate în grupul control comparativ cu cel experimental ($p < 0.001$) (figura 3.2).

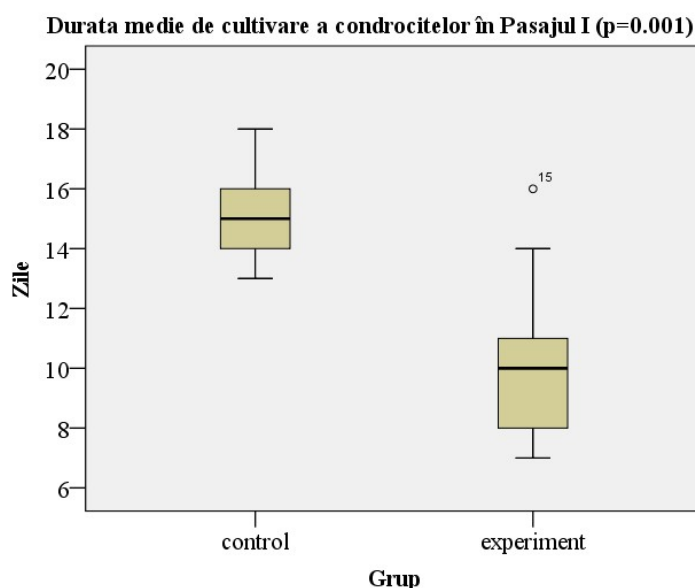


Figura 3.2. Confluența condrocitelor pe parcursul primului pasaj.

La compararea valorilor procentuale, după numărarea celulelor în hemocitometru prin excludere cu 0.4% tripan albastru, în grupul de control a fost obținută o rată a viabilității celulare de 85.36% (95% ÎI:72.73-97.97), iar în grupul experimental de 98.09% (95% ÎI:93.10-101.49). O diferență necritică ($p = 0.055$), însă care în caz de izolare a unui număr mic de celule, din motiv că celelalte au fost distruse de colagenază, orice reducere a numărului și viabilității celulare poate avea efecte negative asupra potențialului de cultivare a acestora [25, 26]. Având în vedere că numărul de celule viabile, din grupul control, cultivate în primul pasaj au fost de $7.5 \times 10^4 \pm 2.1 \times 10^4$ celule, iar în grupul experimental de $1.6 \times 10^5 \pm 3.5 \times 10^4$ celule ($p = 0.001$), durata de cultivare a condrocitelor până la confluența până la 70-80%, în ambele grupe a fost diferită. În grupul control durata de cultivare a primului pasaj a fost de 17 ± 2 zile, iar în grupul experimental de 11 ± 3 zile ($p = 0.001$) (figura 3.2). Ca urmare, numărul de celule obținute în primul pasaj a grupului control a fost de $1.2 \times 10^6 \pm 4.3 \times 10^5$ celule, iar în grupul experimental de $2.92 \times 10^6 \pm 3.6 \times 10^5$ celule, cu viabilitatea de 100% în ambele grupe, ceea ce reprezintă o diferență semnificativă ($p < 0.001$).

Utilizarea tehnicilor histochemice cu scop de colorare a MEC secretate de condrocite pe parcursul a 16 zile de cultivare în supraconfluență, ne-a permis colorarea în roșu-oranj a acestora cu Safranin O, pe când în lotul martor – CSM colorarea specifică lipsea sau era foarte slab exprimată. Același lucru este caracteristic și pentru colorarea cu Albastru de Toluidină și Fast Green, unde MEC a fost colorată în albastru-violet. Astfel, a fost demonstrat că celulele izolate din cartilajul articular hialin au secretat matrice extracelulară specifică cartilajului și deci erau condrocite.

4. OBȚINEREA GREFEI BIFAZICE DIN ȚESUT OSTEOCONDAL PRIN TEHNICI DE INGINERIE TISULARĂ.

4.1 Metode

Condilii femurali ai iepurilor eutanasiați au fost demineralizați în soluție 0.6M HCl Sigma, SUA) care a fost schimbată zilnic până la demineralizarea osului. Apoi, bucățile de țesut osteocondral demineralizat (OCD) au fost degresate, spălate și tratate cu soluții bufer pentru

normalizarea pH-ului. După demineralizare și spălare, au fost create 6 grupe experimentale de țesut OCD. În dependență de agentul de decelularizare utilizat și doza acestuia au fost create grupele decelularizate cu diverse concentrații de Dodecil sulfat de sodiu (Sigma, Marea Britanie) - SDS 2%, SDS 1% și SDS 0.5%; și grupele decelularizate cu diverse concentrații de Triton X-100 (HiMedia, India) - TrX 2%, TrX 1% și TrX 0.5%. Lotul martor era reprezentat de țesutul OCD și țesutul osteocondral normal (OCN). Decelularizarea a fost efectuată pe agitator cu incubator (ES-20, Biosan) la 200 rpm temperatura camerei timp de 24 ore.

Cu scop de a selecta o grefă potrivită pentru combinare cu celule autologe cu potențial condroprogenitor au fost realizate mai multe teste: a fost determinată cantitatea de ADN restantă în probe paralel cu depistarea nucleelor la examenul histologic prin colorare cu Hematoxină-Eozină; a fost evaluată biocompatibilitatea probelor prin realizarea testelor de viabilitate celulară cu CSM și condrocite, utilizând MTT și a populării probelor cu același tip de celule; au fost analizate proprietățile fizico-chimice ale probelor prin realizarea testului de umflare, determinarea modulului de elasticitate și a vitezei de degradare enzimatică.

4.2 Rezultate

Cuantificarea ADN-ului

La utilizarea kit-ului de purificare a ADN-ului genomic Thermo Scientific GeneJET (Thermo Scientific, Lituania) și a protocolului de lucru furnizat de producător, a fost determinat că țesutul OC normal conține 40.65 ± 15.25 ng/ μ l de ADN [28].

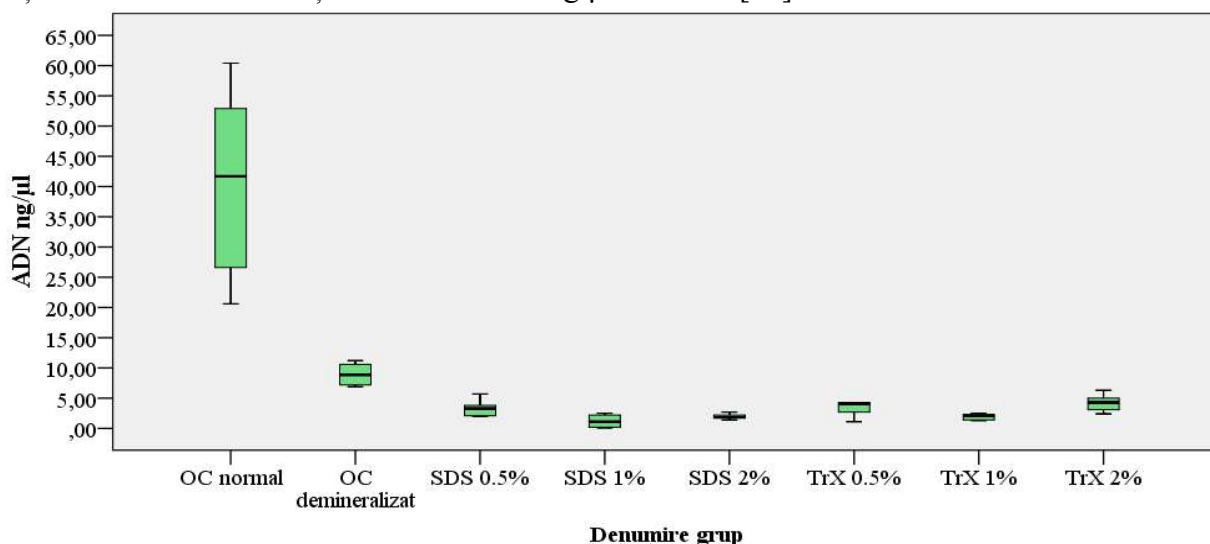


Figura 4.1. Concentrația de ADN în țesutul OC normal, demineralizat și demineralizat-decelularizat.

Ca urmare a utilizării HCl de 0.6M pentru demineralizarea osului din complexul tisular osteocondral a fost determinat că acesta, de asemenea, a contribuit la eliminarea semnificativă a ADN-ului din țesuturi, cu aproximativ 78% ($p < 0.001$). Decelularizarea țesutului OC demineralizat cu diverse concentrații de surfactanți timp de 24 ore de asemenea a redus și mai semnificativ conținutul ADN-ului din probe. Iar înlăturarea ADN-ului până la un conținut sub 5% a fost realizată cu soluții de SDS cu concentrația de 1% și 2%, dar și soluție de TrX cu concentrația de 1% (figura 4.1). La compararea concentrației de ADN în lotul martor – țesut OCD, cu cea a probelor experimentale, de asemenea, a fost determinată o diferență semnificativă ($p < 0.01$). Diferența dintre cantitatea de ADN restant în grupul martor și în grupurile experimentale comparativ cu țesutul OC normal este reprezentată în Tabelul 4.1.

Tabelul 4.1. **Cantitatea de ADN restant în țesuturile OC după demineralizare și decelularizare raportate la țesutul OC normal.**

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

A fost determinat că concentrația și tipul de surfactant influențează viteza decelularizării țesutului osteocondral. La compararea eficacității decelularizării prin utilizarea aceluiași concentrații de surfactanți, a fost determinat că la concentrațiile de 0.5% și 1% de SDS și TrX nivelul de decelularizare nu prezintă diferențe majore ($p > 0.1$), iar la utilizarea acestor surfactanți cu concentrația de 2% a fost obținută o diferență semnificativă a concentrației de ADN ($p = 0.003$), în cazul utilizării de 2% TrX conținutul de ADN a fost mult mai mare, tabelul 4.1.

Examenul histologic

La examenul histologic a fost reconfirmat faptul că decelularizarea țesutului OC depinde de tipul și concentrația surfactantului utilizat. A fost determinată prezența nucleelor sau fragmentelor de nucleu predominant în țesuturile OC decelularizate cu TrX. De asemenea, a fost determinată o intensitate diferită a colorării specifice cu Alabastru de Toluidină și Fast Green pentru identificarea de GAG în cartilajul decelularizat. La decelularizarea țesutului OC demineralizat cu SDS, intensitatea colorării era mai înaltă comparativ cu utilizarea de TrX, ceea ce denotă o concentrație mai înaltă de GAG în probele tratate cu SDS, dar cu mult mai joasă comparativ cu proba martor sau cartilajul normal [28].

Testul de viabilitate celulară cu MTT

În urma efectuării testului de viabilitate celulară cu MTT la 24, 48 și 72 ore a fost determinată o activitate metabolică celulară înaltă, în special la contactul probelor cu condrocitele (figura 4.2). Aceste rezultate indică prezența a diverși factori de creștere în probele OCD și OCDD testate, aceștia fiind favorabili activității condrocitare, cea mai înaltă activitate fiind înregistrată la termen de 72 ore cu peste 140% (95% ÎÎ: 121.98-165.88), ca urmare a contactului condrocitelor cu proba de țesut OC demineralizat ($p < 0.05$), aceasta nefiind tratată cu surfactanți. De asemenea, cea mai mică activitate de 116.34% (95% ÎÎ: 114.02-118.66) a fost a probei de țesut OC demineralizat și apoi decelularizat cu TrX de 1%. Comparativ cu condrocitele activitatea metabolică a CSM a fost mai restrânsă, dar bună. În primele 24 ore viabilitatea CSM a variat în mediu între 90% și 100%, iar la 48 și 72 ore între 80-90%, fără vre-o diferență statistică între grupe ($p > 0.5$) (figura 4.2).

Testul de populare celulară

După cultivarea CSM și condrocitelor pe probele de țesut OCD și OCDD cu diverse concentrații de surfactanți, a fost determinat că multiplicarea celulară a fost mai abundentă în cazul condrocitelor la 7 zile de cultivare. La ziua a 14-a de cultură celulară, gradul de populare a probelor a fost uniform de abundent atât cu condrocite cât și cu CSM (figura 4.3)

Scanarea electronmicroscopică (SEM)

Rezultatele SEM a probelor de cartilaj articular populate cu CSM și condrocite. La SEM a fost determinată prezența diferenței între țesuturile populate cu celule și cele nepopulate. În cazul

probelor populate cu celule a fost determinată prezența de celule unice, dar și a celulelor ce formează o peliculă pe suprafața secțiunii de cartilaj, pe alocuri cu îngroșări. Pe probele nepoluate cu celule a fost vizualizată ultrastructura țesutului osteocondral și prezența lacunelor în care s-au aflat condrocite.

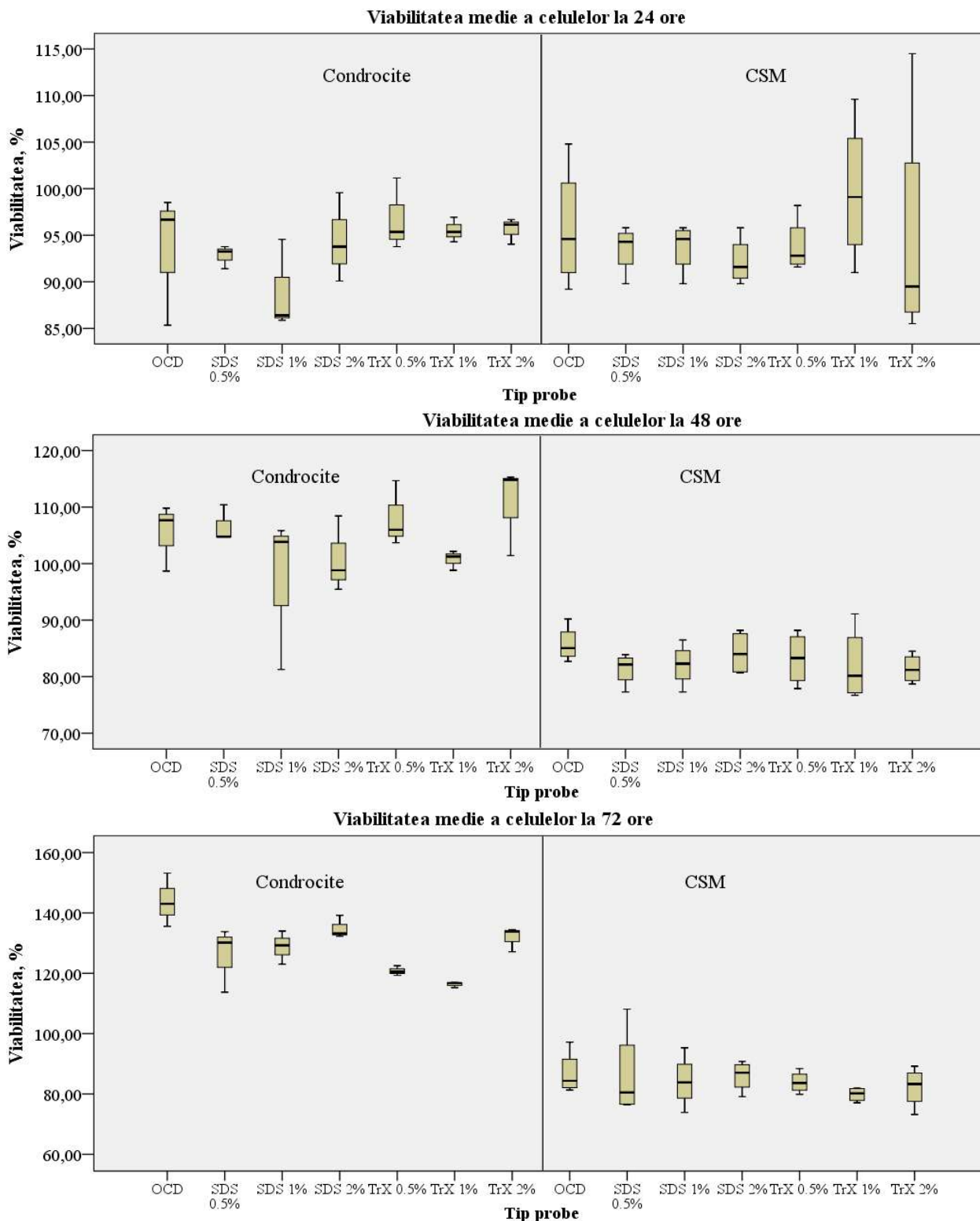


Figura 4.2. Rezultatele evaluării citotoxicității probelor prin testul MTT, la contact cu condrocite și CSM la termen de 24, 48 și 72 ore.

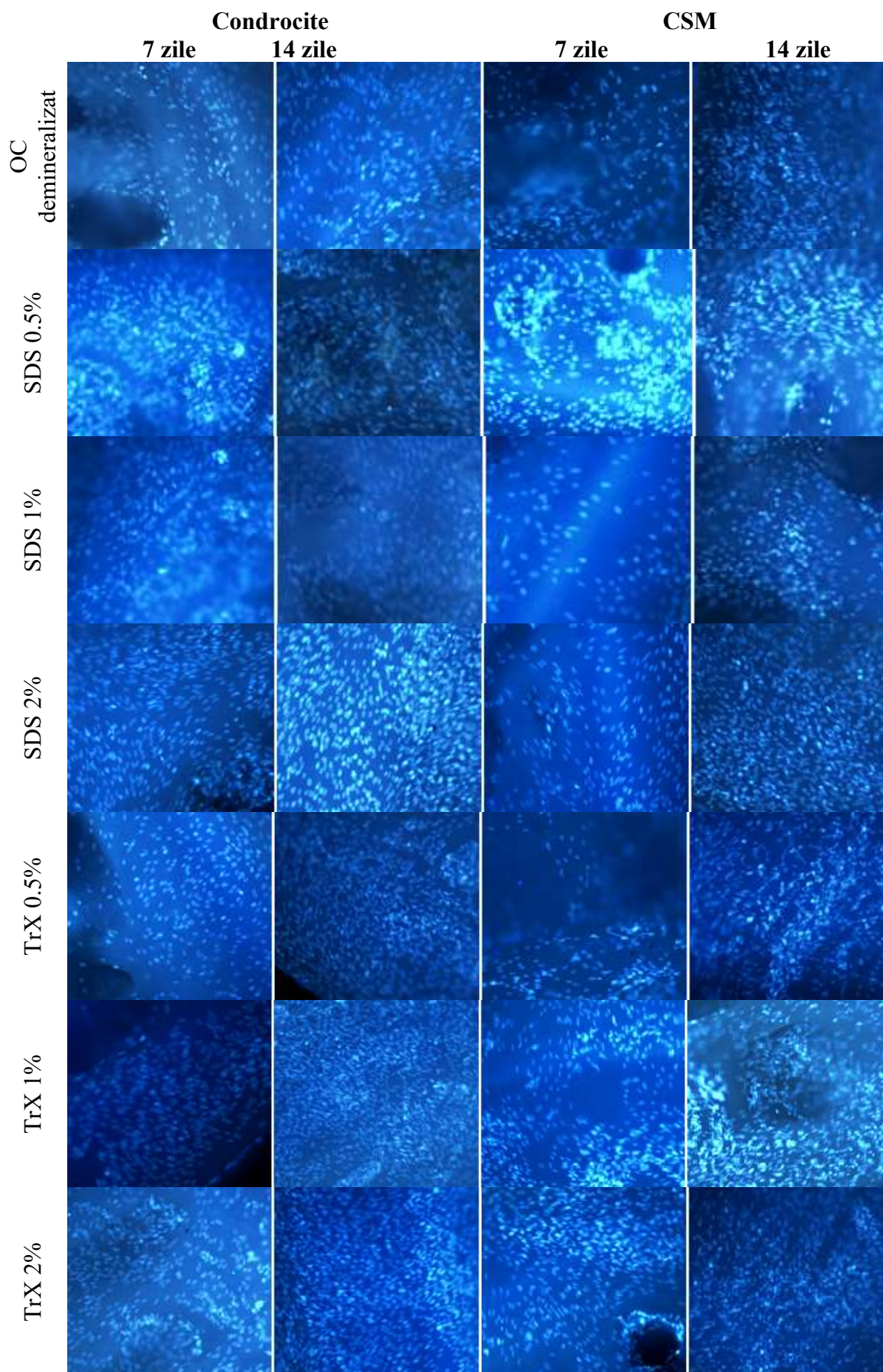


Figura 4.3. Rezultatele populării probelor de țesut osteocondral cu condrocite și CSM, colorate cu DAPI și vizualizate prin microscopie cu fluorescență (DM IL, Leica).

Degradarea enzimatică

Conform rezultatelor obținute a fost determinată o diferență statistic semnificativă între grupurile de cercetare în perioade diferite ale degradării enzimaticice. A fost determinat că cel mai repede au degradat probele de țesut OC demineralizat (martor) și cele decelularizate cu TrX 0.5% ($p > 0.5$), atingând vârful concentrației maxime de aminoacizi depistați la ziua a 7-a. Următoarele probe, cu o viteză înaltă de degradare au fost cele decelularizate cu TrX de 1% și 2% ($p > 0.1$), comparativ cu lotul martor acestea nu și-au atins valorile maxime până la ziua a 14-a a experimentului ($p > 0.1$). A fost determinat că probele de țesut OCD ce au fost decelularizate cu SDS aveau o viteză de degradare enzimatică mult mai lentă comparativ cu lotul martor și probele decelularizate cu TrX, aceasta a fost clar observat începând cu perioada de 24 ore de la începutul testului ($p < 0.01$). De asemenea, a fost constatat că cu cât concentrația de SDS utilizată pentru decelularizare a fost mai mare, cu atât viteza de degradare enzimatică a fost mai mică (figura 4.4). Cea mai mică viteză de degradare a fost în grupul țesuturilor OC demineralizate și decelularizate cu SDS de 2% ($p < 0.01$).

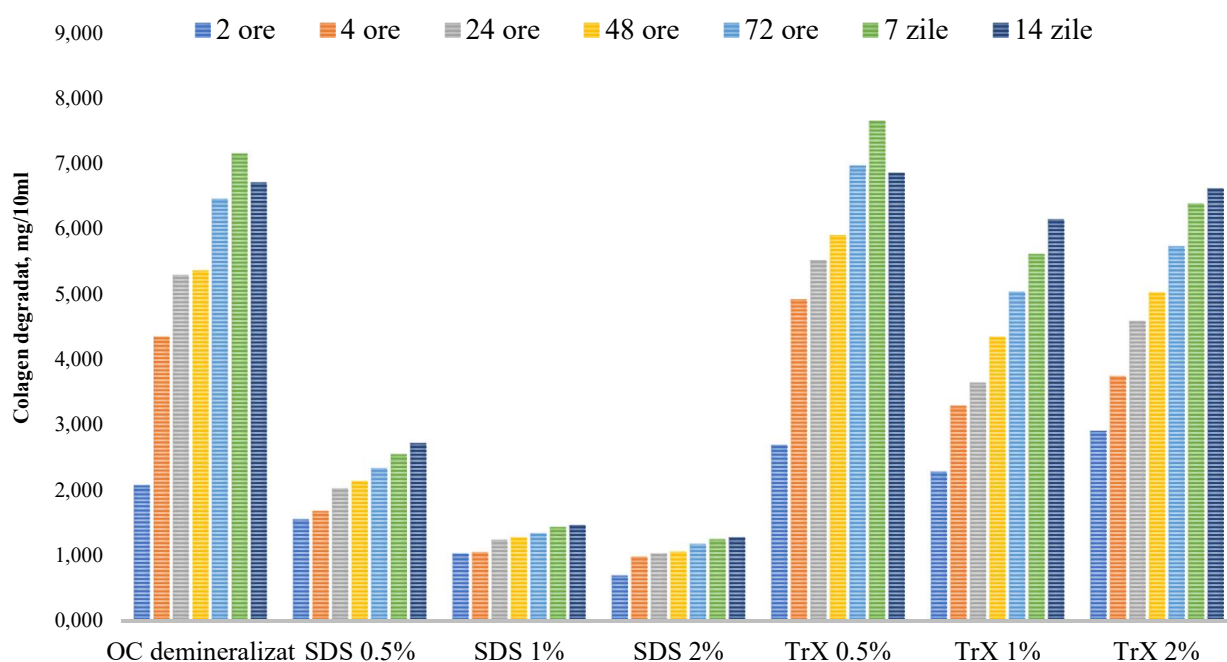


Figura 4.4. **Reprezentarea grafică a rezultatelor degradării enzimaticice a probelor cu collagenază.**

Testul de umflare

Rezultatele obținute la măsurarea capacității de umflare a probelor de țesut OC demineralizat și probelor OC demineralizate și decelularizate cu SDS și TrX nu prezintă diferență statistic semnificativă ($p > 0.05$).

Modulul de elasticitate

După aprecierea modulului de elasticitate a fost determinată o diferență statistic semnificativă între țesutul OC normal și grupele de țesut OC demineralizate și OC demineralizate și decelularizate ($p = 0.001$). De asemenea, a fost determinată o diferență statistic semnificativă între modulul lui Young al grupului de țesut OC demineralizat și cel al probelor din grupul OCD demineralizat cu SDS de 0.5% ($p = 0.009$), pe când în celelalte cazuri între grupul control și celelalte grupuri experimentale, diferență statistic semnificativă nu a fost depistată ($p > 0.1$). Acest fapt poate fi explicat prin neomogenitatea structurii complexelor de țesut osteocondrale comparate,

deoarece provin de la animale diferite, se caracterizează printr-un grad diferit de mineralizare a osului subcondral, grosime a cartilajului și gradul de compactare a țesutului osos demineralizat.

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

5.1 Metode

Pregătirea grefelor pentru transplantare

De la iepurii eutanasiați în cadrul experimentului, au fost prelevate femurele distale și păstrate la -84°C (ULUF 450-2M, Arctiko). Pentru obținerea grefelor, după înlăturarea țesuturilor moi, femurele prelevate au fost demineralizate în HCl de 0.6 M, apoi, cu un cuțit circular de pe suprafața portantă a fiecărui condil au fost secționare 31 bucăți de țesut OCD cu diametrul de $3.61 \pm 0.1 \text{ mm}$, înălțimea de $4.33 \pm 0.1 \text{ mm}$ și volumul mediu de $44.05 \pm 1.15 \text{ mm}^3$. Bucățile de țesut OCD au fost perforate longitudinal cu un ac de seringă calibrul 23G și degresate cu H_2O_2 de 3% timp de 24 ore și cu alcool de 70% timp de 6 ore prin agitare pe șeicher-incubator la 200 rpm. Probele de țesut OCD obținute au fost spălate cu apă distilată, după care au fost decelularizate în soluție SDS de 1% pe parcursul a 24 ore, și iar spălate în apă distilată pe parcursul a 3 zile, schimbând apa de 2-3 ori pe zi. În hota cu flux laminar (LN 090, Nuve) grefele OCDD și perforate longitudinal au fost sterilizate în soluție alcool de 70% timp de 2 ore. Grefele sterilizate au fost spălate cu HBSS (Lonza, Belgia) timp de 24 ore cu schimbarea soluției de 3 ori. Ziua următoare grefele au fost desiccate prin centrifugare pe meșe din tifon steril în eprubete sterile de 15 ml la 4000 rpm timp de 20 minute (Universal 32R, Hettich Zentrifugen), după care au fost congelate la -84°C (ULUF 450-2M, Arctiko) până la utilizare (figura 5.1).

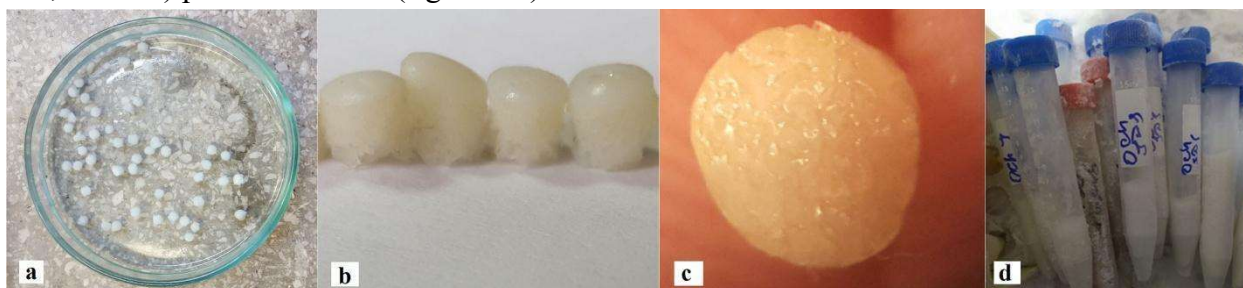


Figura 5.1. Obținerea și păstrarea grefelor OCDD: (a) procesarea grefelor, (b) țesut OCD neperforate, (c) grefă OCDD perforată longitudinal, (d) grefele OCDD conservate la -84°C . Obținerea celulelor cu potențial condroprogenitor și combinarea acestora cu grefe OCDD

Celulele cu potențial condroprogenitor necesare pentru obținerea grefelor combinate au fost obținute conform metodelor expuse în capitolele precedente. Grefele OCDD perforate longitudinal au fost combinate cu celule autologe – CSM ($n=12$) și condrocite ($n=12$). Cu scop de transplantare au fost utilizate doar celulele din primul pasaj. CSM au fost cultivate după modalitate descrisă în capitolul precedent, în flacon de cultură celulară de 25 cm^2 utilizând mediul de cultură compus din DMEM/F-12 Ham (Sigma, Marea Britanie), 10% Ser fetal bovin (SFB) (Lonza, Belgia) și 1% soluție antibiotic cu antimicotic. În ziua când CSM și condrocitele au ajuns la o confluență de 80-90%, grefele OCDD pregătite pentru transplantare au fost decongelate și încălzite până la 37°C în șeicher-incubator (ES-20, Biosan), iar celulele detașate de suprafața de cultură a flaconului utilizând soluție 0.25% tripsină-EDTA. După centrifugarea celulelor detașate, acestea au fost resuspendate într-un ml mediu de nutriție specific tipului de celule. Suspensia celulară după pipetare a fost transferată în tuburi Eppendorf de 1.5 ml, ce a fost centrifugată la 3500 rpm timp de 3 minute (Combi-Spin FVL-2400N, Boeco). Ulterior, mediul din tuburi a fost extras parțial, lăsând un volum de 50-60 μl la fund. Eprubete de 15 ml cu grefele OCDD și dispozitivul pentru

fixarea și celularizarea grefelor de dimensiuni mici (DFCGDM) sterile [27, 28] au fost introduse în hota cu flux laminar de aer (LN 090, Nuve). DFCGDM este un dispozitiv ce a fost elaborat cu scopul de a celulariza grefele prin metoda gravitațională, iar utilizarea acestuia a fost descrisă în lucrările anterioare [27]. Dispozitivul a fost introdus într-un stativ și înlăturat capacul. Grefa cu o pincetă a fost extrasă din eprubetă și introdusă în containerul dispozitivului de fixare [32]. Cu o micropipetă (LightDrop 10-100 μ l, ThermoFisher) au fost pipetate celulele din tubul Eppendorf în cele 50-60 μ l restante, după care suspensia celulară a fost transferată pe grefa OCDD amplasată în containerul DFCGDM. Pe dispozitiv sa fost aplicat capacul, după care acesta a fost introdus într-o eprubetă de 15 ml (figura 5.2) ce apoi a fost introdusă în incubator cu capacul întredeschis la 37°C, 5% CO₂ (SmartCell, HealForce). După transplantarea grefelor combinate, cu scop de a determina câte celule au fost în realitate transplantate, eprubetele de 15 ml, tuburile Eppendorf și containerile DFCGDM au fost spălate cu mediu de nutriție specific tipului de celule. Apoi celulele au fost numărate în hemacitometru prin excluderea celor moarte cu soluția de 0.4% albastru de tripan [26, 32].

Transplantarea grefelor combinate în defectele critice experimentale

După finisarea etapei de pregătire a grefelor combinate cu celule cu potențial condroprogenitor, a fost realizată pregătirea animalelor experimentale pentru efectuarea transplantării. Astfel, în ziua intervenției chirurgicale toți iepurii au fost pe nemâncate cântăriți și aneșteziați. A fost pregătit câmpul operator la nivelul articulației unui genunchi, apoi prin abord parapatelar medial, de aproximativ 4-5 cm, a fost realizată deschiderea articulației genunchiului.

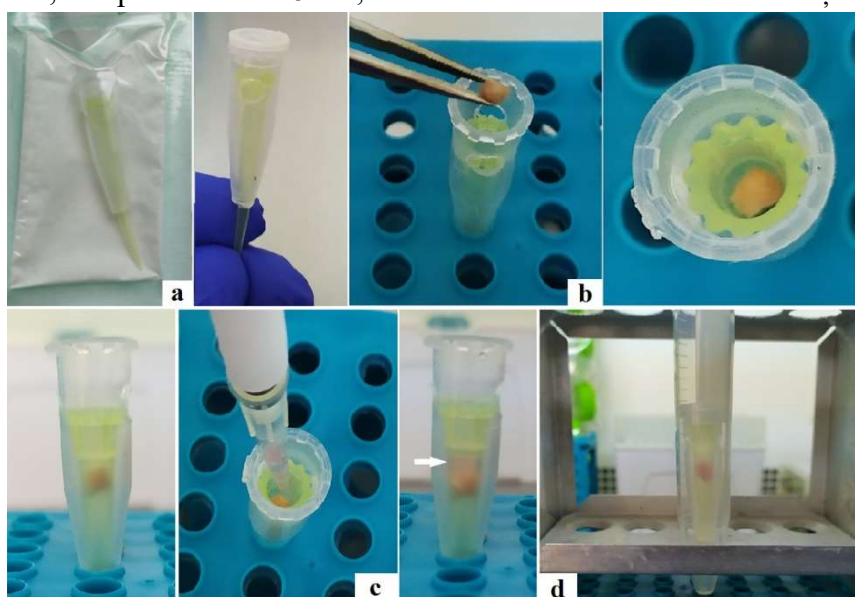


Figura 5.2. Procesul de populare a grefelor OCDD cu celule: (a) DFCGDM steril, (b) introducerea grefei OCDD în suportul dispozitivului, (c) transferul celulelor pe grefă, cu săgeată albă este indicat nivelul suspensiei celulare situate deasupra grefei, (d) introducerea DFCGDM într-o eprubetă de 15 ml.

După hemostază patela a fost luxată lateral, iar genunchiul maximal flectat. Apoi, pe suprafața portantă a condilului femural medial, consecutiv, cu burghie de diametrul 1.5, 2, 3, 3.5 și 3.7 mm au fost efectuate cu precauție [27], la turații mici, fără a deschide canalul medular, câte un defect critic de aproximativ 3.7 mm în diametru și 4-4.5 mm adâncime [24]. În acel moment grefele combinate au fost scoase din incubator și aduse în sala de operație, unde containerile cu grefele combinate cu CSM (n =12) sau condrocite (n =12) au fost puse pe masa de operație.

Suporturile cu grefe combinate au fost secționare la bază cu o foarfecă, iar grefele au fost cu precauție împinse în defecte cu o broșă, fără a le deteriora sau stoarce de celulele.

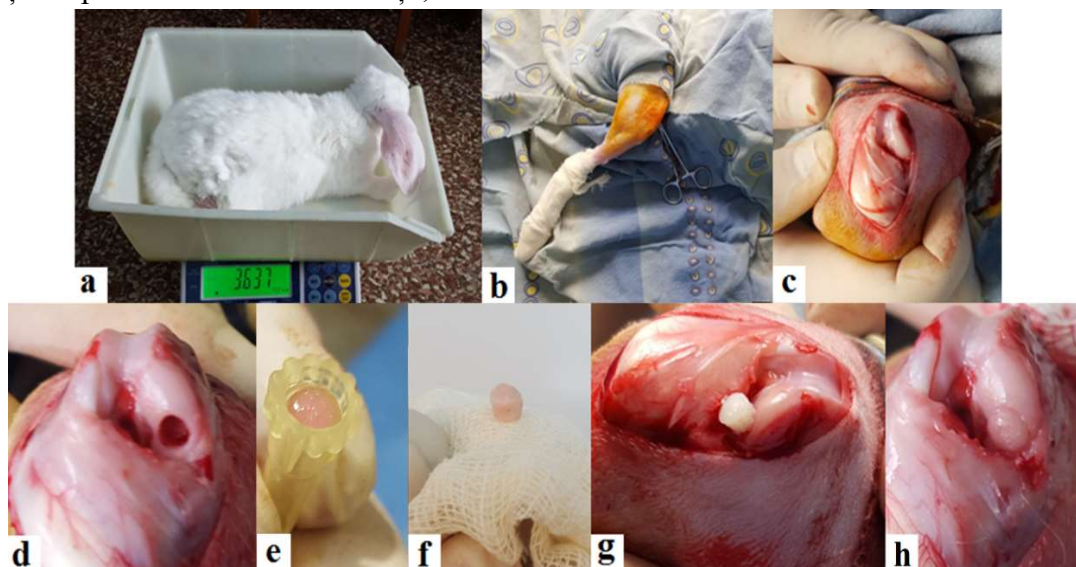


Figura 5.3. Transplantarea grefelor OCDD combinate cu CSM și condrocite autologe, (a) cântărirea animalelor și anestezia generală, (b) pregătirea câmpului operator, (c) artrotomie parapatelară medială cu luxarea laterală a patelei, (d) crearea defectului experimental, (e, f) grefa combinată cu celule autologe și (g, h) implantarea grefei în defectul experimental.

Toate grefele au fost transplantate cu partea sa cartilaginoasă orientată în sus (figura 5.3). După implantarea grefelor a fost redusă luxația de patelă, cu genunchiul în extensie plăgile au fost suturate și aplicat pansament cu soluție de 10% povidon-iod (EGIS, Ungaria). Menținând genunchiul în extensie, de partea laterală a membrului inferior operat s-a aplicat o scândurică subțire, mai lată ca membrul și cu lungimea corespunzătoare cu distanța de la șold până la gleznă, care a fost fixată de membrul operat cu bandaj gipsat, lăsând o fereastră la nivelul plăgii postoperatorii pentru pansamente.

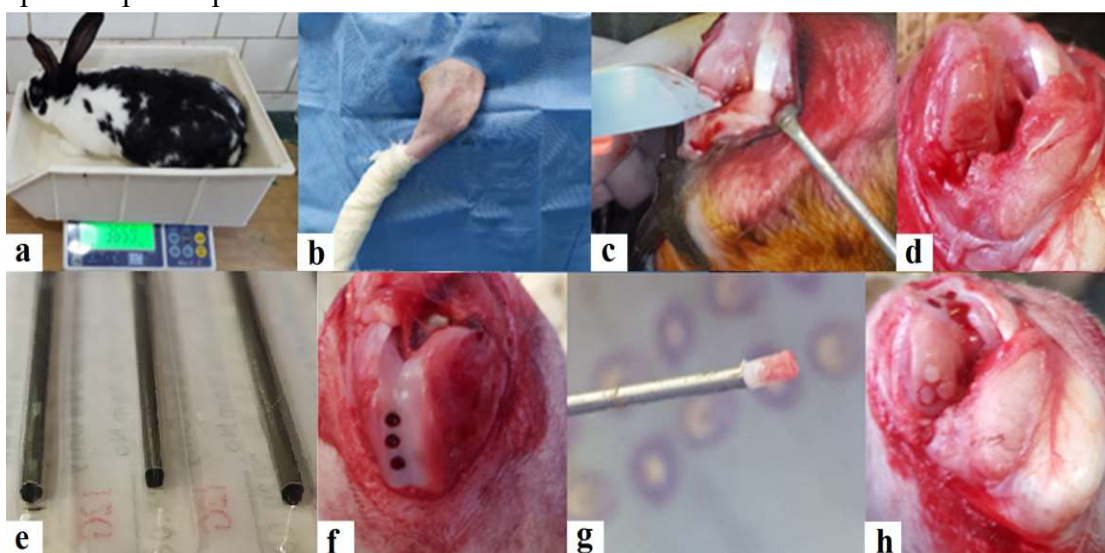


Figura 5.4. Transferul de țesut osteocondral autolog, (a, b) anestezia animalului și pregătirea câmpului operator, (c, d) crearea defectului de cartilaj, (e, f, g) prelevarea de grefe osteocondrale autologe de pe suprafața neportantă a suprafeței articulare femurale și transplantarea lor.

Transferul de țesut osteocondral autolog

Metoda de tratare a defectelor critice experimentale prin transfer de țesut autolog a fost selectată ca metodă de tratare a defectelor cartilagineoase în grupul de control, deoarece este o tehnică de regenerare a țesutului cartilaginios care utilizează țesuturile proprii în procesul de tratament [16]. Lotul de iepuri (n=12) la care defectele experimentale de cartilaj au fost tratate prin transferul de țesut OC autolog au fost pregătiți pentru intervenția chirurgicală la fel ca și cei din grupele experimentale. După artrotomie, luxarea laterală a pateleii și flectarea genunchiului, cu un bisturiu a fost creat un defect circular prin înlăturarea cartilajului pe o suprafață cu diametrul de 3.7 mm la nivelul suprafeții portante a condilului femural medial, la același nivel unde au fost implantate și grefele combinate în grupele experimentale. În defectul experimental de cartilaj, cu burghie de diametru mic, au fost efectuate câte 3 găuri de 1.7 mm în diametru, amplasate sub formă de triunghi, cu o adâncime de 4-4.5 mm [27].

	Criterii	Scara	
1	Patternul celular în cartilajul regenerat	Cartilaj hialin	0
		Predominant cartilaj hialin	1
		Predominant fibrocartilaj	2
		Doar non-cartilaj	3
2	Morfologia celulară (se alege inițial categoria - a, b, c, sau d)	(a) normală	0
		(b) în mare parte celule rotunde cu morfologie condrocitară:	
		> 75% din țesut cu coloane în zona radială	0
		25-75% din țesut cu coloane în zona radială	1
		<25% din țesut cu coloane în zona radială (structură dezorganizată)	2
		(c) circă 50% de celule rotunde cu morfologie condrocitară:	
		> 75% din țesut cu coloane în zona radială	2
		25-75% din țesut cu coloane în zona radială	3
		<25% din țesut cu coloane în zona radială (structură dezorganizată)	4
		(d) în mare parte celule fusiforme (fibroblast-like)	5
3	Formarea de clustere condrocitare	Absentă	0
		<25% din celule	1
		25-100% din celule	2
4	Nivelul de celularizare	Celularitate normală	0
		Hipo celularitate ușoară	1
		Hipo celularitate moderată	2
		Hipo celularitate severă	3
5	Metacromazia matriciei	normală	0
		ușor redusă	1
		moderat redusă	2
		marcat redusă	3
		nu se colorează	4
6	Suprafața articulară	Netedă și intactă	0
		Laminare orizontală superficială	1
		Fisuri până de la 25% până la 100% din grosime	2
		Perturbări severe, rupturi, inclusiv fibrilații	3
7	Integrarea grefei cu cartilajul articular din jur	Continuitate și integrare normală	0
		Celularitate redusă	1
		Lacună sau lipsa de continuitate pe o parte	2
		Lacună sau lipsa de continuitate pe două părți	3
8	Arhitectura întregului defect fără includerea marginelor	normală	0
		1-3 defecte mici	1
		1-3 defecte mari	2
		distrucție severă	3
9	Grosimea cartilajului nou format	100% din cartilajul adiacent normal	0
		50-100% din cartilajul adiacent normal	1
		0-50% din cartilajul adiacent normal	2
10	Prezența modificărilor degenerative ale cartilajului adiacent	Celularitate normală, fără clustere, colorare normală	0
		Celularitate normală, puține clustere, colorare moderată	1
		Celularitate moderată, număr clustere moderat, colorare moderată	2
		Hipo celularitate severă, fără colorare	3
11	Umplerea defectului în raport cu suprafața cartilajului adiacent normal	111-125 %	1
		91-110 %	0
		76-90 %	1
		51-75 %	2
		26-50 %	3
		<25 %	4
12	Formarea liniei de demarcație	Completă	0
		75-99 %	1
		50-74 %	2
		25-49 %	3
		<25 %	4
13	Procentul noului os subcondral restabilit	90-100 %	0
		75-89 %	1
		50-74 %	2
		25-49 %	3
		<25 %	4

Scorul histologic unificat al cartilajului regenerat (SHUCR)

Cu o un ac pentru piercing de calibrul 12 G, cu diametrul intern de 1.7 mm, atașat la un aparat de găurit, cu rotații lente pentru a evita supraîncălzirea țesutului, din șanțul trohlear au fost prelevate bucăți de țesut osteocondral autolog [27], care au fost implantate în defectele proaspăt create la aceeași înălțime sau cu până la 1 mm mai sus față de cartilajul adiacent normal (figura 5.4). După reducerea luxației de patelă, ținând genunchiul în extensie a fost suturată plaga, aplicat pansament aseptice, iar mai apoi și imobilizare gipsată fără a compresa țesuturile moi.

Evaluarea rezultatelor testelor *in vivo* pe iepuri

Iepurii operați au fost scoși din experiment prin eutanasiere în camera cu CO₂ la termen de 6 săptămâni, câte 3 animale din fiecare lot și 12 săptămâni ceilalți 9 rămași din fiecare grup. Femurele distale au fost introduse în formaldehidă buferizată de 10%, pH=7.4. După decalcifierea osului și încorporare în parafină, probele au fost secționare cu microtomul la grosimea de 5μm și aplicare pe lamele. Prepararele au fost colorate cu Hematoxină-Eozină, Safranin O și Albastru de Toluidină cu Fast Green.

Evaluarea obiectivă a rezultatelor a fost efectuată conform Scorului histologic unificat al cartilajului regenerat (SHUCR), care a fost alcătuit prin combinarea a 3 scoruri larg utilizate în evaluarea cartilajului regenerat la animale. Autori a acestor scoruri au fost Sellers și coaut. (1997) [27, 29], Wakitani și coaut. (1994) [30] și O'Driscoll și coaut. (1986) [31]. SHUCR a fost constituit din 13 criterii [27]. Fiecărui criteriu i-a fost atribuită o scară personală, iar fiecare valoare numerică din acest scor are caracteristica sa specifică. Valoarea sumară maximală a tuturor criteriilor este de 43 puncte, iar cea minimală – 0 puncte. Rezultatul evaluării calității țesutului regenerat depinde de punctajul acumulat, cu cât calitatea țesutului regenerat este mai înaltă cu atât punctajul va fi mai mic și invers, cu cât punctajul obținut va fi mai mare cu atât calitatea țesutului regenerat va fi mai joasă.

5.2 Rezultate

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

Tabelul 5.1. Diferența dintre numărul de celule obținute în cultura primară și a celor transplantate cu grefe din cadrul loturilor experimentale.

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

După transplantarea grefelor combinate, ca urmare a spălării tuburilor Eppendorf, eprubetelor de 15 ml în care au fost centrifugate celulele, dar și a suportului DFCGDM, a fost determinat numărul real de celule transplantate. Astfel, numărul real de condrocite transplantate a fost de $2.54 \times 10^6 \pm 2.73 \times 10^5$ celule cu o viabilitate de 87.59% (95% ÎÎ:84.51-90.67), ceea ce reprezintă 86.97% (95% ÎÎ:84.09-89.84) din totalul condrocitelor obținute prin cultivare. De asemenea, numărul real de CSM transplantate a fost de $1.37 \times 10^6 \pm 3.57 \times 10^5$ celule, cu o viabilitate de 90.91% (95% ÎÎ:88.9560-92.8590), ce reprezintă 88.32% (95% ÎÎ:86.45-90.17) din totalul de

CSM obținute. Aceasta fiind în ambele cazuri o diferență statistic semnificativă comparativ cu numărul inițial de celule obținute din primul pasaj ($p < 0.001$). Așadar, a fost determinat că viabilitatea totală a celulelor la momentul transplantării a fost în mediu de 89.25% (95% ÎÎ:87.42-91.07), ceea ce reprezintă o diferență semnificativă dacă comparăm cu viabilitatea celulară imediat după detașarea celulelor în cultura primară ($p < 0.05$), însă fără diferență semnificativă între ratele de celule viabile transplantate pe grupe ($p > 0.5$). De asemenea, nu există diferență statistic semnificativă între durată perioadelor de la detașarea celulelor și până la transplantarea acestora în cadrul grupelor experimentale ($p > 0.5$). Astfel, în cazul grefelor combinate cu condrocite această perioadă a fost de 73 ± 12 minute, iar în cazul grefelor combinate cu CSM aceasta a fost de 69 ± 14 minute. Diferența între cantitatea de celule obținute și cele transplantate, dar și viabilitatea lor este prezentată în tabelele 5.1 și 5.2. Ca urmare a utilizării dispozitivului de fixare și celularizare a grefelor de dimensiuni mici rata totală de celule transplantate a fost de 87.64% (95% ÎÎ:86.04-89.24), ce reprezintă un rezultat foarte bun.

Animalele scoase din experiment la 6 săptămâni, conform SHUCR în toate cazurile aveau un scor histologic aproape similar. În cazul primei evaluări lotul martor a obținut un scor de 26.33 ± 1.53 puncte, lotul tratat cu grefe OCDD combinate cu condrocite a primit 28.33 ± 1.53 puncte ($p > 0.1$) și lotul tratat cu grefe combinate cu CSM a primit 27.67 ± 2.08 puncte ($p > 0.2$).

Tabelul 5.2. **Diferența între viabilitatea celulelor obținute în cultura primară și a celor transplantate cu grefe din cadrul loturilor experimentale.**

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

În cazul celei de-a doua evaluări lotul martor a obținut 28 ± 1 puncte, lotul tratat cu grefe OCDD combinate cu condrocite a obținut 30 ± 3.61 puncte ($p > 0.4$) și lotul tratat cu grefe combinate cu CSM a obținut 28 ± 2.65 puncte ($p = 1$). Ca urmare, nu a fost determinată vre-o diferență statistic semnificativă între lotul martor și loturile experimentale (figura 5.5).

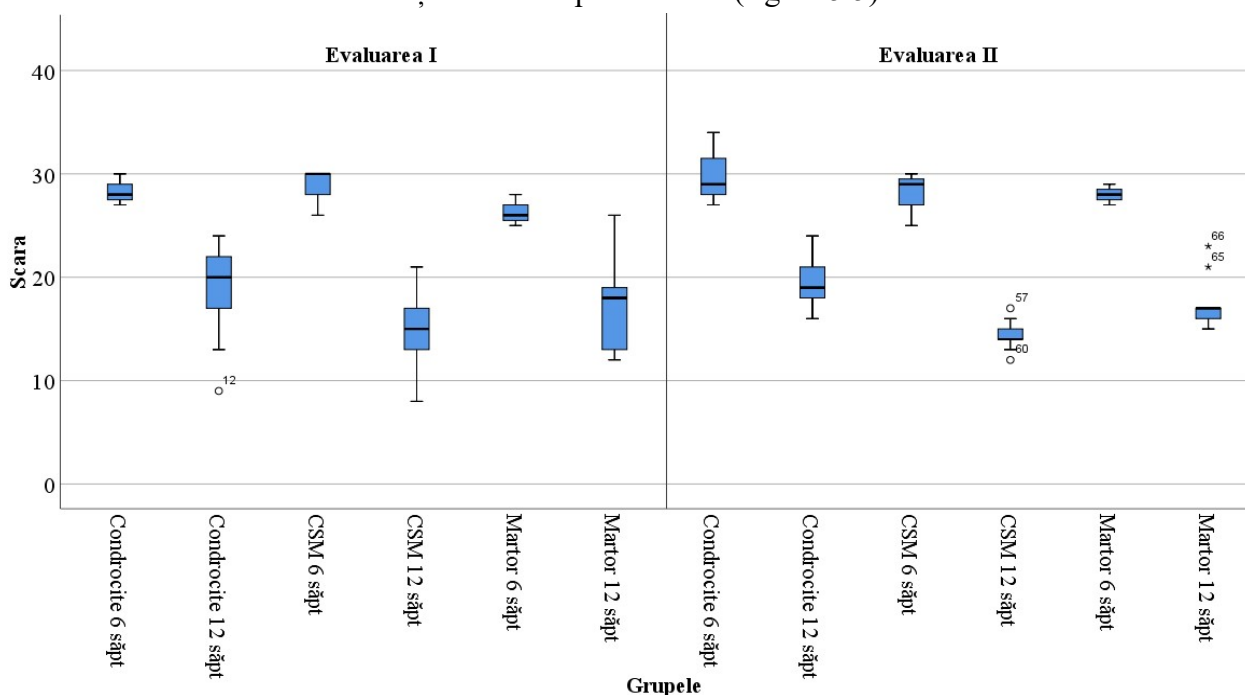


Figura 5.5. **Reprezentarea grafică a ambelor evaluări, a loturilor experimentale și martor, la 6 și 12 săptămâni postoperator.**

La analiza rezultatelor SHUCR la animalele scoase din experiment la 12 săptămâni, la prima evaluare pentru lotul martor a fost obținut un scor de 17.22 ± 4.84 puncte, pentru lotul tratat cu grefe OCDD combinate cu condrocite 18.68 ± 5 puncte ($p > 0.5$) și pentru cel tratat cu CSM au fost obținute 14.89 ± 3.76 puncte ($p > 0.2$). În cazul celei de-a doua evaluări lotul martor a obținut un scor de 17.67 ± 2.60 puncte, cel tratat cu grefe combinate cu condrocite a obținut 19.22 ± 2.44 puncte ($p > 0.2$) și lotul tratat cu grefe combinate cu CSM a obținut un scor de 14.33 ± 1.5 puncte ($p = 0.004$). Drept urmare, în cazul primei evaluări nu a fost determinată vre-o diferență statistic semnificativă între lotul martor și cele experimentale, pe când la a doua evaluare a fost obținută o diferență semnificativă între lotul martor și cel tratat cu grefe OCDD combinate cu CSM (figura 5.5), necătând la faptul că între rezultatele ambelor evaluări ale defectelor tratate cu grefe OCDD și CSM diferență semnificativă nu este ($p = 0.745$), tabelul 5.3.

Tabelul 5.3. Compararea statistică a rezultatelor SHUCR realizat de 2 experți (p).

Grup	Evaluare 1	p_1^* față de martor	Evaluare 2	p_2^* față de martor	p_1/p_2^*
Martor 6 săpt	26.33 ± 1.53		28 ± 1		$p = 0.189$
OCDD și condrocite 6 săpt	28.33 ± 1.53	$p > 0.1$	30 ± 3.61	$p > 0.4$	$p = 0.502$
OCDD și CSM 6 săpt	27.67 ± 2.08	$p > 0.2$	28 ± 2.65	$p = 1$	$p = 0.759$
Martor 12 săpt	17.22 ± 4.84		17.67 ± 2.60		$p = 0.811$
OCDD și condrocite 12 săpt	18.68 ± 5	$p > 0.5$	19.22 ± 2.44	$p > 0.2$	$p = 0.768$
OCDD și CSM 12 săpt	14.89 ± 3.76	$p > 0.2$	14.33 ± 1.5	$p = 0.004$	$p = 0.745$
$*p_1$ – semnificația statistică față de lotul martor la Evaluarea 1; $*p_2$ – semnificația statistică față de lotul martor la Evaluarea 2; $*p_1/p_2$ – semnificația diferenței între Evaluarea 1 și Evaluarea 2.					

La compararea rezultatelor obținute în cadrul aceluiași lot, la animalele ce au fost scoase din experiment la termen de 6 și 12 săptămâni, a fost determinată o diferență semnificativă între rezultatele obținute ($p < 0.05$). De asemenea, a fost evaluat gradul de asociere între numărul de celule real transplantate și calitatea regenerării cartilajului articular. A fost determinat că numărul de condrocite sau CSM utilizate în combinație cu grefa OCDD nu a influențat calitatea de regenerare a țesutului cartilaginosa ($p > 0.1$). Evaluarea independentă a rezultatelor histologice de către 2 experți au fost redată în figura 5.5 și tabelul 5.3.

SINTEZA REZULTATELOR OBȚINUTE

Medicina regenerativă ca domeniu nou al medicinei moderne se confruntă cu numeroase provocări printre care și regenerarea cartilajului articular. Baza medicinei regenerative este obținerea și cultivarea de celule ce au potențial de regenerare a țesuturilor și organelor afectate. Regenerarea cartilajului articular este un proces anevoios din cauza particularităților sale anatomice și modului de nutriție, cauzele leziunilor fiind variate, ce duc în final la degradarea artrozică a articulației.

În cadrul studiului efectuat au fost elaborate și implementate în practica de laborator noi metode: de prelevare a MO pentru izolarea CSM fără sacrificarea animalului, ceea ce a dat posibilitatea de utilizat în tratamentul leziunilor de cartilaj articular a CSM autologe; a fost redusă semnificativ durata de izolare a condrocitelor, dar și crescut semnificativ numărul de condrocite izolate din cartilajul articular de iepure, fapt ce a redus riscul degradării fibroblastice excesive a condrocitelor pe parcursul cultivării, de asemenea, tehnica utilizată poate fi implementată fără probleme în procesul de izolare a condrocitelor pentru transplantarea de condrocite autologe la

oameni; au fost elaborate și testate mai multe metode de obținere a grefelor prin tehnici de inginerie tisulară; pentru combinarea grefelor obținute cu celule autologe – CSM și condrocite, pentru transplantare a fost elaborat un dispozitiv special pentru fixarea și popularea cu celule a grefelor de dimensiuni mici; în cadrul studiului, în premieră a fost stabilită cantitatea reală de celule transplantate și viabilitatea lor la momentul transplantării; de asemenea, cu scop de a evalua obiectiv rezultatele testelor *in vivo* a fost elaborat un scor histologic – Scorul histologic unificat al cartilajului regenerat.

Procesul de elaborare și testare a grefelor combinate cu celule autologe cu potențial condroprogenitor în cadrul studiului efectuat este unul complet, deoarece acesta include etapele de obținere și testare *in vitro* a grefelor, dar și testarea *in vivo* pe animale, înainte de a putea fi utilizată în clinică.

CONCLUZII

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

RECOMANDĂRI PRACTICE

1. Etapa testării *in vivo*, pe animale de laborator, a materialelor biologice create cu scop de regenerare a cartilajului articular, este necesar de realizat prin implantare în defecte critice atât la nivelul suprafețelor articulare portante, cât și a celor neportante.

2. Defectele critice executate pe o suprafață articulară portantă la iepure cu scop de a testa potențialul de regenerare a cartilajului articular, este necesar să nu depășească diametrul critic minimal de 3 mm, deoarece defectele de dimensiuni mai mari prezintă risc de fractură intraoperatorie a condilului femoral, reduc semnificativ suprafața portantă a condilului femoral, dar și potențialul de regenerare prin tehnici de inginerie tisulară.
3. Evaluarea eficacității decelularizării unui țesut este necesar de efectuat prin determinarea: concentrației de ADN raportat la ng/mg; a prezenței celulelor la examinarea histologică prin colorarea cu Hematoxilină-Eozină; a rămășițelor de ADN prin examinarea fluorescentă cu DAPI; și după caz, determinarea concentrației de GAG și a hidroxiprolinei.

BIBLIOGRAFIE

1. VILLALVILLA, A., GÓMEZ, R., LARGO, R., HERRERO-BEAUMONT, G. Lipid transport and metabolism in healthy and osteoarthritic cartilage. *Int J Mol Sci.* 2013; 14(10), pp. 20793-808. ISSN 1422-0067. Disponibil: DOI: 10.3390/ijms141020793
2. KARUPPAL, R. Current concepts in the articular cartilage repair and regeneration. *J Orthop.* 2017; 14(2), pp. A1-A3. ISSN 0972-978X. Disponibil: DOI: 10.1016/j.jor.2017.05.001
3. KNUTSEN, G., DROGSET, JO., ENGBRETSSEN, L., GRØNTVEDT, T., LUDVIGSEN, TC., LØKEN, S., SOLHEIM, E., et al. A randomized multicenter trial comparing autologous chondrocyte implantation with microfracture: Long-term follow-up at 14 to 15 years. *J Bone Joint Surg Am.* 2016; 98(16), pp. 1332-9. ISSN 0375-9229. Disponibil: DOI: 10.2106/JBJS.15.01208
4. JEUKEN, RM., VAN HUGTEN, PPW., ROTH, AK., TIMUR, UT., BOYMANS, TAEJ., VAN RHIJN, LW., BUGBEE, WD., EMANS, PJ. A systematic review of focal cartilage defect treatments in middle-aged versus younger patients. *Orthop J Sports Med.* 2021; 9(10):23259671211031244. ISSN 2325-9671. Disponibil: DOI: 10.1177/23259671211031244
5. ARØEN, A., LØKEN, S., HEIR, S., ALVIK, E., EKELAND, A., GRANLUND, OG., ENGBRETSSEN, L. Articular cartilage lesions in 993 consecutive knee arthroscopies. *Am J Sports Med.* 2004; 32(1), pp. 211-5. ISSN 0363-5465. Disponibil: DOI: 10.1177/0363546503259345
6. TETTEH, ES., BAJAJ, S., GHODADRA, NS. Basic science and surgical treatment options for articular cartilage injuries of the knee. *J Orthop Sports Phys Ther.* 2012; 42(3), pp. 243-53. ISSN 1938-1344. Disponibil: DOI: 10.2519/jospt.2012.3673
7. FELSON, DT. Osteoarthritis as a disease of mechanics. *Osteoarthritis Cartilage.* 2013; 21(1), pp. 10-5. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1016/j.joca.2012.09.012
8. CHUBINSKAYA, S., HAUDENSCHILD, D., GASSER, S., STANNARD, J., KRETTEK, C., BORRELLI, J., JR. Articular cartilage injury and potential remedies. *J Orthop Trauma.* 2015; 29(12), pp. S47-52. ISSN 0890-5339. Disponibil: DOI: 10.1097/BOT.0000000000000462
9. BAJAJ, S., SHOEMAKER, T., HAKIMIYAN, AA., RAPPOPORT, L., PASCUAL-GARRIDO, C., OEGEMA, TR., et al. Protective effect of P188 in the model of acute trauma to human ankle cartilage: the mechanism of action. *J Orthop Trauma.* 2010; 24(9), pp. 571-6. ISSN 0890-5339. Disponibil: DOI: 10.1097/BOT.0b013e3181ec4712
10. REESINK, HL., WATTS, AE., MOHAMMED, HO., JAY, GD., NIXON, AJ. Lubricin/proteoglycan 4 increases in both experimental and naturally occurring equine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2017; 25(1), pp. 128-137. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1016/j.joca.2016.07.021

11. MORE, AS., KUMARI, RR., GUPTA, G., LINGARAJU, MC., BALAGANUR, V., PATHAK, NN., et al. Effect of iNOS inhibitor S-methylisothiourea in monosodium iodoacetate-induced osteoarthritic pain: implication for osteoarthritis therapy. *Pharmacol Biochem Behav.* 2013; 103(4), pp. 764-72. ISSN 0091-3057. Disponibil: DOI: 10.1016/j.pbb.2012.12.013
12. FORTIER, LA., BARKER, JU., STRAUSS, EJ., MCCARREL, TM., COLE, BJ. The role of growth factors in cartilage repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2011; 469(10), pp. 2706-15. ISSN 0009-921X. Disponibil: DOI: 10.1007/s11999-011-1857-3
13. CAO, R., ZHAN, A., CI, Z., WANG, C., SHE, Y., XU, Y., et al. A biomimetic biphasic scaffold consisting of decellularized cartilage and decalcified bone matrixes for osteochondral defect repair. *Front Cell Dev Biol.* 2021; 9:639006. ISSN 2296-634X. Disponibil: DOI: 10.3389/fcell.2021.639006
14. CHUBINSKAYA, S., HURTIG, M., RUEGER, DC. OP-1/BMP-7 in cartilage repair. *Int Orthop.* 2007; 31(6), pp. 773-81. ISSN 1432-5195. Disponibil: DOI: 10.1007/s00264-007-0423-9
15. DECKER, RS. Articular cartilage and joint development from embryogenesis to adulthood. *Semin Cell Dev Biol.* 2017; 62:50-56. ISSN 1084-9521. Disponibil: DOI: 10.1016/j.semcdb.2016.10.005
16. OZTÜRK, A., OZDEMIR, MR., OZKAN, Y. Osteochondral autografting (mosaicplasty) in grade IV cartilage defects in the knee joint: 2- to 7-year results. *Int Orthop.* 2006; 30(3), pp. 200-4. ISSN 1432-5195. Disponibil: DOI: 10.1007/s00264-005-0068-5
17. GODIN, JA., SANCHEZ, G., CINQUE, ME., CHAHLA, J., KENNEDY, NI., PROVENCHER, MT. Osteochondral allograft transplantation for treatment of medial femoral condyle defect. *Arthrosc Tech.* 2017; 6(4), pp. e1239-e1244. ISSN 2212-6287. Disponibil: DOI: 10.1016/j.eats.2017.04.010
18. HANGODY, L., VÁSÁRHELYI, G., HANGODY, LR., SÜKÖSD, Z., TIBAY, G., BARTHA, L., BODÓ, G. Autologous osteochondral grafting--technique and long-term results. *Injury.* 2008; 39(1), pp. S32-9. ISSN 0020-1383. Disponibil: DOI: 10.1016/j.injury.2008.01.041
19. NIEMEYER, P., ALBRECHT, D., ANDEREYA, S., ANGELE, P., ATESCHRANG, A., AURICH, M., et al. Autologous chondrocyte implantation (ACI) for cartilage defects of the knee: A guideline by the working group "Clinical Tissue Regeneration" of the German Society of Orthopaedics and Trauma (DGOU). *Knee.* 2016; 23(3), pp. 426-35. ISSN 0968-0160. Disponibil: DOI: 10.1016/j.knee.2016.02.001
20. MADEIRA, C., SANTHAGUNAM, A., SALGUEIRO, JB., CABRAL, JM. Advanced cell therapies for articular cartilage regeneration. *Trends Biotechnol.* 2015; 33(1), pp. 35-42. ISSN 1879-3096. Disponibil: DOI: 10.1016/j.tibtech.2014.11.003
21. KRAEUTLER, MJ., KAENKUMCHORN, T., PASCUAL-GARRIDO, C., WIMMER, MA., CHUBINSKAYA, S. Peculiarities in ankle cartilage. *Cartilage.* 2017; 8(1), pp. 12-18. ISSN 1947-6035. Disponibil: DOI: 10.1177/1947603516642572
22. BERNINGER, MT., WEXEL, G., RUMMENY, EJ., IMHOFF, AB., ANTON, M., HENNING, TD., VOGT, S. Matrix-assisted autologous chondrocyte transplantation for remodeling and repair of chondral defects in a rabbit model. *J Vis Exp.* 2013; (75), pp. e4422. ISSN 1940-087X. Disponibil: DOI: 10.3791/4422
23. TAKAHASHI, T., SATO, M., TOYODA, E., MAEHARA, M., TAKIZAWA, D., MARUKI, H., et al. Rabbit xenogeneic transplantation model for evaluating human chondrocyte sheets used in articular cartilage repair. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018; 12(10), pp. 2067-2076. ISSN 1932-7005. Disponibil: DOI: 10.1002/term.2741

24. MENG, X., ZIADLOU, R., GRAD, S., ALINI, M., WEN, C., LAI, Y., et al. Animal models of osteochondral defect for testing biomaterials. *Biochem Res Int.* 2020; 2020:9659412. ISSN 2090-2255. Disponibil: DOI: 10.1155/2020/9659412
25. **COBZAC, V.**, MOSTOVEI, A., JIAN, M., NACU, V. An efficient procedure of isolation, cultivation and identification of bone marrow mesenchymal stem cells. *Mold Med J.* 2019; 62(1), pp. 35-41. ISSN 2537-6373. Disponibil: DOI: 10.5281/zenodo.2590011
26. **COBZAC, V.**, VERESTIUC, L., JIAN, M., NACU, V. Chondrocytes isolation from hyaline cartilage by continuous monitoring method. *Mold Med J.* 2021; 64(6), pp. 13-19. ISSN 2537-6373. Disponibil: <https://doi.org/10.52418/moldovan-med-j.64-6.21.03>
27. **COBZAC, V.**, JIAN, M., GLOBA, T., NACU, V. Joint cartilage experimental defect regeneration by hierarchic biphasic combined grafts. *Mold Med J.* 2022; 66(2), pp. 20-29. ISSN 2537-6373. Disponibil: <https://doi.org/10.52418/moldovan-med-j.65-2.22.03>
28. **COBZAC, V.**, VEREȘTIUC, L., JIAN, M., NACU V. Assessment of ionic and anionic surfactants effect on demineralized osteochondral tissue. In: *International Conference on Innovative Research - ICIR EUROINVENT 2019* 16–17 Mai 2019, Iasi, Romania. IOP Conference Series: Materials Science and Engineering; 2019; 572:012084. ISSN 1757-899X. Disponibil: DOI: 10.1088/1757-899X/572/1/012084
29. SELLERS, RS., PELUSO, D., MORRIS, EA. The effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) on the healing of full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1997; 79(10), pp. 1452-63. ISSN 0375-9229. Disponibil: DOI: 10.2106/00004623-199710000-00002
30. WAKITANI, S., GOTO, T., PINEDA, SJ., YOUNG, RG., MANSOUR, JM., CAPLAN, AI., GOLDBERG, VM. Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. *J Bone Joint Surg Am.* 1994; 76(4), pp. 579-92. ISSN 0375-9229. Disponibil: DOI: 10.2106/00004623-199404000-00013
31. O'DRISCOLL, SW., KEELEY, FW., SALTER, RB. The chondrogenic potential of free autogenous periosteal grafts for biological resurfacing of major full-thickness defects in joint surfaces under the influence of continuous passive motion. An experimental investigation in the rabbit. *J Bone Joint Surg Am.* 1986; 68(7), pp. 1017-35. ISSN 0375-9229.
32. **COBZAC, V.**, JIAN, M., NACU, V. Cellularization of small sized grafts from biological material using the gravitational modality principle. In: *International Conference on Innovative Research - ICIR EUROINVENT 2021*, 20–21 Mai 2021, Iasi, Romania. *J. Phys.: Conf. Ser.* 2021; 1960:012004. ISSN 1742-6596. Disponibil: DOI: 10.1088/1742-6596/1960/1/012004
33. KALTER, SS, HENNESSEN, W. The standardization of animals to improve biomedical research, production, and control. In: Karger Basel S. (ed.) *IABS International Congress for Biological Standardization 1979*, 16-20 Septembrie 1979, San Antonio, Texas, USA. *International Association of Biological Standardization*; 1980. 247 p. ISSN 0301-5149

LUCRĂRI ȘTIINȚIFICE

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

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

1. **Cobzac V.**, Verestiuc L., Jian M. Nacu V. Assesment of ionic and anionic surfactants effect on demineralized osteochondral tissue. In: *IOP Conf. Ser.: Mater. Sci. Eng.* 2019; 572:012084. doi:10.1088/1757-899X/572/1/012084 (**SCOPUS**).

2. **Cobzac V.**, Jian M., Nacu V. Cellularization of small sized grafts from biological material using the gravitational modality principle. In: *J. Phys.: Conf. Ser.* 2021; 1960:012004. doi: 10.1088/1742-6596/1960/1/012004 (**SCOPUS**).
 3. **Cobzac V.**, Jian M., Globa T., Nacu V. The cartilaginous tissue regeneration on weight bearing and non-weight bearing surfaces of the knee. In: *IFMBE Proceedings*. 2022; 87:334–341. doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-92328-0_44 (**SCOPUS**).
- **Articole în reviste științifice naționale acreditate:**
 - ✓ **articole în reviste de categoria B/B+**
 - 4. **Cobzac V.**, Mostovei A., Jian M., Nacu V. An efficient procedure of isolation, cultivation and identification of bone marrow mesenchymal stem cells. In: *Mold Med Journal*. 2019; 62(1):35-41. doi: 10.5281/zenodo.2590011 (**DOAJ**).
 - 5. **Cobzac V.**, Verestiuc L., Jian M., Nacu V. Chondrocytes isolation from hyaline cartilage by continuous monitoring method. In: *Mold Med Journal*. 2021; 64(6):13-19. doi: <https://doi.org/10.52418/moldovan-med-j.64-6.21.03> (**DOAJ**).
 - 6. **Cobzac V.**, Jian M., Globa T., Nacu V. Joint cartilage experimental defect regeneration by hierarchic biphasic combined grafts. In: *Mold Med J*. 2022; 66(2):20-29. doi: <https://doi.org/10.52418/moldovan-med-j.65-2.22.03> (**DOAJ**).
 - 7. Jian M., **Cobzac V.**, Nacu V. Dispozitive și metode brevetate cu utilizare în ingineria tisulară. In: *INTELLECTUS*. 2022; 1:94-100. doi: <https://doi.org/10.56329/1810-7087.22.1.09>
 - **Rezumate/abstracte/teze în lucrările conferințelor științifice internaționale**
 8. **Cobzac V.**, Verestiuc L., Jian M., Nacu V. Preclinical testing of decellularized and demineralized osteochondral allografts on rabbit model. In: *The 56th annual meeting of veterinary sciences „Towards a global health”*. Iași, România; 2017. p.79
 9. **Cobzac V.**, Coșciug S., Jian M., Nacu V. Appreciation of cartilage permeability within demineralized and decellularized osteochondrol allogeneic graft with trypan blue. In: *Матеріали Науково-практичної конференції з міжнародною участю. Актуальні питання травматології та остеосинтезу*. Чернівці, Україна; 2017. p. 140.
 10. **Cobzac V.**, Jian M., Coșciug S., Nacu V. Comparison of in vitro effect of osteochondral demineralised and demineralised-decellularized grafts on cells used in cartilage regeneration. In: *EATB 26*. Treviso, Italia; 2017. p. 24-25.
 11. **Cobzac V.**, Verestiuc L., Jian M., Coșciug S., Nacu V. Preclinical testing of ODDG. Preliminary report. In: *The 2nd International Biomedical Congress of Sofia*. Sofia, Bulgaria; 2017. p.74.
 12. Nacu V., **Cobzac V.**, Jian M., Verestiuc L. Decellularized-demineralized osteochondral allografts testing on rabbit model. Preliminary report. In: *TERMIS 2018*. Kyoto, Japonia; 2018. p.78.
 13. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M., Coșciug S., Paladi C, Macagonova O. Method of collagen sponge obtaining. In: *The International Student Innovation and Scientific Research Exhibition „Cadet INOVA '18”*. Sibiu, Romania; 2018. p. 207.
 14. **Cobzac V.**, Nacu V., Croitor G., Coșciug S., Jian M. Grafting for restoring the osteochondral defect. In: *The International Student Innovation and Scientific Research Exhibition „Cadet INOVA '18”*. Sibiu, Romania; 2018. p. 208.

15. **Cobzac V.**, Nacu V., Croitor G., Coșciug S., Jian M. Grafting for restoring the osteochondral defect. In: *Proceedings of the 10th Edition of Euroinvent European Exhibition of Creativity and Innovation*. Iasi, Romania; 2018. p. 191.
16. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M., Coșciug S., Paladi C, Macagonova O. Method of collagen sponge obtaining. În: *Salonul Internațional al Cercetării Științifice, Inovării și Inventicii, Ediția XVI*. Cluj-Napoca, Romania; 2018. p. 186-187.
17. **Cobzac V.**, Verestiuc L., Jian M., Nacu V. Assesment of ionic and anionic surfactants effect on demineralized osteochondral tissue. In: *The 5th International Conference on Innovative Research. ICIR 2019*. Iasi, Romania; 2019. p. 122.
18. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M., Sarev V., Macagonova O. Device for reticulation of collagen sponge with glutaraldehyde vapors. In: *The International Student Innovation and Scientific Research Exhibition „Cadet INOVA '19”*. Sibiu, Romania; 2019. p. 175.
19. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M., Coșciug S., Paladi C., Macagonova O. Method of collagen sponge obtaining. In: *Proceedings of the 11th Edition of Euroinvent European Exhibition of Creativity and Innovation*. Iasi, Romania. 2019. p. 195-196.
20. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M., Sarev V., Macagonova O. Device for reticulation of collagen sponge with glutaraldehyde vapors. In: *Proceedings of the 11th Edition of Euroinvent European Exhibition of Creativity and Innovation*. Iasi, Romania. 2019. p. 197.
21. **Cobzac V.**, Nacu V., Croitor G., Coșciug S., Jian M. Grafting for restoring the osteochondral defect. În: *Salonul Internațional al Cercetării Științifice, Inovării și Inventicii, Ediția XVII*. Cluj-Napoca, Romania. 2019. p. 213-214.
22. **Cobzac V.**, Jian M., Mostovei A., Nacu V. Bone augmentation with natural and synthetic materials. In: *International Chemical Engineering and Material Symposium, SICHEM 2020*. Bucharest, Romania; 2020. p. 114.
23. **Cobzac V.**, Nacu V., Glavan A., Jian M., Sedaia E., Ababii P. Small-sized graft fixation and cellularization device. In: *The International Student Innovation and Scientific Research Exhibition „Cadet INOVA '20”*. Sibiu, Romania; 2020. p. 233.
24. **Cobzac V.**, Nacu V., Glavan A., Jian M., Sedaia E., Ababii P. Small-sized graft fixation and cellularization device. In: *Proceedings of the 13th Edition of Euroinvent European Exhibition of Creativity and Innovation*. Iasi, Romania; 2021. p. 194.
25. Jian M., Nacu V., **Cobzac V.**, Braniște T. Method of isolation of cell cultures. În: *Salonul Internațional de Invenții și Inovații „Traian Vuia”, ediția a VIII-a*. Timișoara, România; 2022. p. 51.
26. **Cobzac V.**, Jian M., Nacu V. The efficiency of device for fixation and cellularization of small sized grafts. In: *International Conference on Innovative Research, ICIR 2021*. Iași, Romania; 2021. p. 79.
27. **Cobzac V.**, Verestiuc L., Jian M., Nacu V. Selection of an appropriate cross-linking method of collagen sponges for articular cartilaginous tissue engineering. In: *Virtual International Scientific Conference on “Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering – NanoBioMat 2021”*. Bucharest, Romania; 2021. p. 40.
28. Jian M., Nacu V., **Cobzac V.**, Braniște T. Method of isolation of cell cultures. In: *Proceedings of the 14th Edition of Euroinvent European Exhibition of Creativity and Innovation*. Iasi, Romania; 2022. p. 171.

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

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

- **Brevete de invenții, patente, certificate de înregistrare, materiale la saloanele de invenții**

40. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M., Sarev V., Macagonova O. Dispozitiv pentru reticularea spongiei de colagen cu vapori de glutaraldehidă. Brevet de invenție MD 1137 Y. BOPI nr.4/2017, 2017.04.30.
41. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M., Coșciug S., Paladi C., Macagonova O. Metodă de obținere a spongiei de colagen. Brevet de invenție MD 1169 Y. BOPI nr.7/2017, 2017.07.31.
42. **Cobzac V.**, Nacu V., Croitor G., Coșciug S., Jian M. Grefă pentru restabilirea defectului osteocondral. Brevet de invenție MD 1177 Y. BOPI nr.8/2017, 2017.08.31.

43. **Cobzac V.**, Nacu V., Glavan A., Jian M., Sedaia E., Ababii P. Dispozitiv pentru fixarea și celularizarea grefelor de dimensiuni mici. Brevet de invenție MD 1332 Y. BOPI nr.4/2019, 2019.04.30.
44. **Cobzac V.**, Nacu V., Jian M. Dispozitiv pentru separarea pastei osoase demineralizate. Brevet de invenție MD 1582 Y. BOPI nr.12/2021, 2021.12.31.
45. Jian M., Nacu V., **Cobzac V.**, Braniște F. Metodă de izolare a culturilor celulare. Brevet de invenție MD 1584 Y. BOPI nr.12/2021, 2021.12.31.

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

- ✓ **internaționale**

46. **Cobzac V.**, Coșciug A., Jian M., Nacu V. Appreciation of cartilage permeability within demineralised and decellularized osteochondral allogeneic graft with trypan blue. *Науково-практична конференція з міжнародною участю. Актуальні проблеми травматології та остеосинтезу*. Чернівці, Ucraina, 27 квітня 2017.
47. Nacu V., Țîmbălari T., **Cobzac V.**, Coșciug S., Cociug A. Tissue and cell transplantation in the Republic of Moldova. *Науково-практична конференція з міжнародною участю. Актуальні проблеми травматології та остеосинтезу*. Чернівці, Ucraina, 27 квітня 2017.
48. **Cobzac V.** Preclinical testing of decellularized and demineralized osteochondral allografts on rabbit model. Preliminary report. *Simpozionul „Medicină Regenerativă – știință practică și intrdisciplinaritate”*. Iasi, Romania, 18 octombrie 2017.
49. **Cobzac V.** Preclinical testing of ODDG. Preliminary report. *The 2nd international biomedical congress of Sofia*. Sofia, Bulgaria, 17-19 November 2017.
50. **Cobzac V.**, Jian M., Coșciug S., Nacu V. Comparison of in vitro effect of osteochondral demineralised and demineralised-decellularized grafts on cells used in cartilage regeneration. *EATB 26*. Treviso, Italia, 17- 22 octombrie 2017.
51. **Cobzac V.**, Vereștiuc L., Jian M., Nacu V. Assesment of ionic and anionic surfactants effect on demineralized osteochondral tissue. *The 5th edition of International Conference on Innovative Research, ICIR 2019*. Iași, Romania, 16-18 May 2019.
52. **Cobzac V.** Combined grafts in the treatment of osteochondral defects. *SPEAKER în cadrul conferinței CONFESTESIS, ediția a II-a*. Iași, România, 24-26 octombrie 2019.
53. **Cobzac V.**, Jian M., Mostovei A., Nacu V. Bone augmentation with natural and synthetic materials. *International Chemical Engineering and Material Symposium, SICHEM 2020*. Bucharest, Romania, 17-18 September 2020.
54. **Cobzac V.**, Jian M., Nacu V. The efficiency of device for fixation and cellularization of small sized grafts. *The 7th edition of International Conference on Innovative Research, ICIR 2021*. Iași, Romania, 20-21 May 2021.
55. **Cobzac V.**, Verestiuc L., Jian M., Nacu V. Selection of an appropriate cross-linking method of collagen sponges for articular cartilaginous tissue engineering. *Virtual International Scientific Conference on “Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering – NanoBioMat 2021”*. Bucharest, Romania, 25-26 June 2021.

- ✓ **naționale**

56. **Cobzac V.**, Jian M., Madan V., Croitor Gh., Nacu V. Metoda izolării conrocitelor din cartilajul hialin. *Al VIII-lea congres național de ortopedie și traumatologie cu participare internațională*. Chișinău, 12-14 octombrie 2016.

57. **Cobzac V.**, Jian M., Globa T., Nacu V. The cartilaginous tissue regeneration on weight bearing and non-weight bearing surfaces of the knee. *The 5th International conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME-2021*. Chișinău, 3-5 November 2021.
 58. Jian M., **Cobzac V.**, Popescu V., Verestiuc L. Obtaining of a suitable osteochondral graft for articular cartilage engineering. *The 7th International medical congress for students and young doctors, MedEspera2018*. Chișinău, 3-5 May 2018.
 59. **Cobzac V.**, Vereștiuc L., Jian M., Coșciug S., Nacu V. Matrixuri tridimensionale în ingineria tisulară. *Zilele Universității și Conferința științifică anuală, consacrate aniversării a 90-a de la nașterea ilustrului medic și savant Nicolae Testemițanu*. Chișinău, 16-20 octombrie 2017.
 60. **Cobzac V.** Grefe tridimensionale în restabilirea cartilajului articular. *Zilele Universității și Conferința științifică anuală*. Chișinău, 15-19 octombrie 2018.
 61. **Cobzac V.**, Vereștiuc L., Jian M., Nacu V. Grefe obținute prin inginerie tisulară în tratamentul defectelor de cartilaj articular. *Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova*. Chișinău, 21-23 octombrie 2020.
 62. **Cobzac V.** Regenerarea defectelor de cartilaj articular. *Conferința științifică anuală consacrată aniversării a 77-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova*. Chișinău, 18-21 octombrie 2022.
- **Participări cu postere la foruri științifice:**
 - ✓ **internaționale**
 - 63. Nacu V., **Cobzac V.**, Jian M., Verestiuc L. Decellularized-demineralized osteochondral allografts testing on rabbit model. Preliminary report. *The 5th TERMIS World Congress*. Kyoto, Japan, 5-7 September 2018.
 - **Proiecte de cercetare la tema tezei:**
 - ✓ **naționale**
 - 64. Proiect din cadrul programului de stat „Regenerare prin terapie celulară a țesuturilor și organelor afectate”, perioada 2014-2015, proiectul „Testarea posibilităților de utilizare a celulelor stem pentru refacerea cartilajului hialin al articulațiilor diartrodiale în afecțiunile degenerativ distrofice”, cifrul 14.519.04.01A, cu finanțare de la bugetul de stat - executor proiect.
 - 65. Proiect din cadrul programului de stat „Regenerare prin terapie celulară a țesuturilor și organelor afectate”, perioada 2016-2017, proiectul „Aplicarea clinică a terapiei celulare în refacerea cartilajului hialin al articulațiilor diartrodiale în afecțiunile degenerativ distrofice”, cifrul 16.00354.80.01A, cu finanțare de la bugetul de stat - executor proiect.
 - **Stagii de cercetare peste hotare:**
 - 66. Bursa „Eugen Ionescu” de cercetare doctorală în cadrul Centrului de formare și cercetare în ingineria țesuturilor, organe artificiale și medicină regenerativă a UMF „Grigore T. Popa” din Iași, România, 24 aprilie – 23 iulie 2017.

67. Bursa „Eugen Ionescu” de cercetare doctorală (renouvellement) în cadrul Centrului de formare și cercetare în ingineria țesuturilor, organe artificiale și medicină regenerativă a UMF „Grigore T. Popa” din Iași, România, 19 martie – 19 iunie 2018.
68. Bursa Federației Mondiale a Savanților (FMS), 1 iunie 2019 - 31 mai 2020.
69. Training visit in the Leibniz Research Laboratories for Biotechnology and Artificial Organs (LEBAO) at the Hannover Medical School (MHH), Germany, organised in the framework of the Horizon2020 project “NanoMedTwin”, 1 October 2021 - 31 March 2022.

COBZAC VITALIE

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

341.01. INGINERIE TISULARĂ ȘI CULTURI CELULARE

Rezumatul tezei de doctor în științe medicale

Aprobat spre tipar:	Formatul hârtiei 60x84 1/16
Hârtie ofset. Tipar ofset.	Tiraj ... ex...
Coli de tipar.: ...	Comanda nr.

Denumirea și adresa instituției unde a fost tipărit rezumatul