

**Școala doctorală în domeniul Științe medicale**

Cu titlu de manuscris

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

**STOIAN Alina**

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

**321.18 ORTOPEDIE ȘI TRAUMATOLOGIE**

**Rezumatul tezei de doctor în științe medicale**

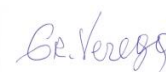
**Chișinău, 2024**

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

**Conducător**

Verega Grigore

dr. hab. șt. med., conferențiar universitar



semnătura

**Conducător prin cotutelă**

Nacu Viorel

dr. hab. șt. med., profesor universitar

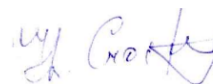


semnătura

**Membrii comisiei de îndrumare:**

Croitor Gheorghe

dr. hab. șt. med., conferențiar universitar



semnătura

Caproș Nicolae

dr. hab. șt. med., profesor universitar



semnătura

Cociug Adrian

dr. șt. med., asistent universitar



semnătura


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

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

**Președinte:**

Topor Boris,

dr. hab. șt. med., profesor universitar



semnătura

**Secretar:**

Pulbere Oleg,

dr. șt. med., conferențiar universitar




semnătura

**Membrii:**

Verega Grigore,

dr. hab. șt. med., conferențiar universitar



semnătura

Nacu Viorel,

dr. hab. șt. med., profesor universitar



semnătura

**Referenți:**

Caproș Nicolae,

dr. hab. șt. med., profesor universitar



semnătura

Buzu Dumitru,

dr. șt. med.



semnătura

Vereștiuc Liliana,

dr. ing. mater., profesor universitar



semnătura

Autor

Stoian Alina



semnătura

© Stoian Alina, 2024

## CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	3
<b>CONȚINUTUL TEZEI</b>	6
1. ROLUL INGINERIEI TISULARE ÎN OBȚINEREA ALOGREFELOR	6
2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE	7
3. REZULTATELE STUDIULUI	10
CONCLUZII GENERALE	15
RECOMANDĂRI PRACTICE	15
<b>BIBLIOGRAFIE</b>	16
<b>LISTA PUBLICAȚIILOR AUTORULUI LA TEMA TEZEI</b>	18
<b>ADNOTARE</b>	22
<b>ANNOTATION</b>	23
<b>АННОТАЦИЯ</b>	24

## INTRODUCERE

### Actualitatea și importanța subiectului studiat

Defectele osoase de diferită origine inițiază la nivelul organismului uman mecanisme naturale de regenerare și de cele mai multe ori suficiente pentru recuperarea golului osos de dimensiuni mici [1]. Procesul de remodelarea osoasă este calificat drept unul din cele mai complexe mecanisme. Celulele osoase având o comunicare complexă între ele, orchestrează în mod perfect procesele de vindecare (consolidare) osoasă, adaptarea mecanică a scheletului și desigur reglează homeostazia calciului [2]. Cu toate acestea, tratamentul defectelor osoase devine o adevărată provocare atunci când vorbim despre defectele osoase masive, în special cele după traumatisme grave, formațiuni tumorale masive, procese infecțioase localizate și agresive sau defectele osoase congenitale. Pentru astfel de diagnostice, metodele tradiționale de tratament sunt la ordinea de zi [3, 4, 5, 6, 7]. Cu toate acestea, pentru defectele osoase ce depășesc lungimea de 4-5 cm, procedurile de grefare osoasă utilizate la moment pot fi insuficiente [8, 9]. Cererea crescută pentru intervențiile de recuperare a defectelor osoase de diferită etiologie, îmbunătățirea posibilităților tehnice, și desigur dezvoltarea pe scară largă a ingineriei tisulare (IT) induce abordarea problemei date la un alt nivel [1, 10, 11]. Materialul ideal pentru construcția osoasă ar trebui să reprezinte un material biocompatibil, biodegradabil, osteoconductor, osteoinductiv și cu proprietăți mecanice favorabile, iar avantajele utilizării matricei extracelulare (MEC) naturale includ în primul rând asemănarea lor în morfologie și structură tridimensională cu cea a țesutului osos nativ [12, 13]. Ingineria medicală în acest moment are un impact uriaș asupra transplantului de organe și țesuturi, promițând dezvoltarea obținerii și utilizarea pe scară largă a MEC de diferită origine care vor oferi posibilitatea înlocuirii oricărui organ sau segment de organ nefuncțional [11]. Scopul ingineriei țesutului osos este de a regenera/repara țesutul cu ajutorul unei grefe (naturale sau sintetice) biocompatibilă și biodegradabilă. Luând în considerare că osul este un țesut foarte bine vascularizat, iar toate etapele sale de regenerare (dezvoltarea, maturarea, remodelarea) depind de o reglare strictă a aportului de sânge, este foarte important elaborarea de strategii care să urmărească vascularizarea rapidă și eficientă a grefei implantate [14, 15]. În Republica Moldova necesitățile de grefe osoase depășesc de 1,4 ori disponibilitatea. Chiar mai mult, conform unui sondaj efectuat pe 161 de medici specialiști, dintre care 75 ortopezi-traumatologi din 16 instituții medicale diferite, se determină o necesitate crescută a grefelor osoase prelucrate prin altă metodă decât cea de congelare [16, 17].

### Scopul studiului

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

### Obiectivele studiului

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

### Metodologia cercetării științifice

Pentru realizarea scopului lucrării, am inițiat un studiu experimental preclinic care a avut la bază 2 elemente majore: cererea crescută față de transplantul osos vs evoluția domeniului de IT. Acest studiu experimental a fost efectuat pe probe biologice preluate de la animale de laborator

(porci) și are la bază mostre de țesut moale și țesut dur (vase sanguine de origine porcină de trei diametre diferite, periost, grefe osoase avasculare, grefe osoase compozite vascularizate). Obiectivele studiului au fost atinse realizând următorii pași: (1) s-a elaborat eseu chirurgical de disecție chirurgicală cu obținerea grefelor osoase pe pedicul vascular; (2) s-a ajustat și testat un protocol descris pentru decelularizarea grefelor osoase mici pe grefe vasculare de calibru mare, mediu, mic, pe grefe osoase avasculare mari (corticale și spongioase), și pe grefe osoase compozite vascularizate; (3) s-a apreciat eficacitatea protocolului de decelularizare prin testele calitative și cantitative; (4) s-a testat biocompatibilitatea MEC vasculare, MEC osoase avasculare și a matricei extracelulare osoase composite vascularitate (MECOv) prin recelularizarea *in vitro* utilizând diferite tipuri de celule.

Dcelularizarea grefelor de țesut moale și dur a fost posibilă utilizând un protocol care a inclus: o soluție izotonică (0.1 % acid etilendiaminotetraacetic, EDTA + soluție tampon salină cu fosfat, PBS), un agent de chelare (0.1 % EDTA + soluție tampon tris aminometan, TRis buffer), un detergent (0.5 % dodecil sulfat de sodiu, SDS) și o soluție enzimatică (300 U/ml deoxiribonucleaza, DNază). Pentru eliminarea celulelor din țesuturi s-a utilizat decelularizarea statică pentru grefele vasculare și cele osoase avasculare, iar grefele osoase compozite vascularizate au fost procesate prin perfuzarea soluțiilor utilizând două căi de perfuzie: (1) perfuzarea prin pediculul vascular și (2) perfuzarea soluțiilor prin diafiza osului. De asemenea, a fost testată eficacitatea decelularizării la creșterea concentrației detergentului (SDS) de la 0.5% la 1%. Pentru aprecierea eficacității protocolului de decelularizare, s-a efectuat analiza calitativă a probelor de țesut moale și dur (colorația histologică Hematoxilină și Eozină, H&E și 4', 6-diamidino-2-fenilindol, DAPI), iar analiza cantitativă a procesului de decelularizare a fost efectuată pe baza cuantificării ADN-ului pentru grefele osoase avasculare și cele vascularizate. Pentru aprecierea schimbărilor microscopice ce au avut loc la nivelul componentei osoase a MECOv s-a efectuat microscopia electronică prin scanare (SEM) a mostrelor de os cortical și spongios nativ vs decelularizat.

Momentul cel mai important al studiului, aprecierea biocompatibilității prin recelularizare *in vitro* a MEC obținute, a fost efectuată prin utilizarea celulelor endoteliale umane venoase ombilicale (HUVEC) pentru grefele vasculare și respectiv utilizarea celulelor mezenchimale stem de origine alogenă, din măduva osoasă (de origine porcină) pentru grefele osoase simple (avasculare) și cele vascularizate.

Analiza probelor histologice și culturilor celulare s-a efectuat utilizând microscopul optic, microscopul fluorescent și stereo microscopul. Datele, au fost colectate și prelucrate cu ajutorul programului Excel din Microsoft Office versiunea 2017. Cu ajutorul aceluiași program, variabilele continue au fost exprimate ca medie  $\pm$  DS. Prelucrarea statistică a fost efectuată cu ajutorul programului SPSS (versiunea 17.0). Compararea și aprecierea diferențelor statistice semnificative între valorile medii ale parametrilor evaluați s-a efectuat cu ajutorul testului parametric independent t-Test. Valoarea p s-a interpretat ca semnificativ statistic pentru  $p \leq 0.05$ .

Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică a Cercetării USMF „Nicolae Testemițanu”, cu emiterea avizului favorabil nr. 71 în data de 21.05.2018. Studiul dat a fost efectuat în cadrul Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare a USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova și Laboratorului de cercetare Leibniz de biotehnologie și organe artificiale (LEBAO), Școla de Medicină din Hannover (MHH), Germania, în perioada anilor 2017-2022.

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

Noutatea științifică a lucrării constă în elaborarea unui protocol universal de decelularizare. Un protocol universal din considerentele că poate fi aplicat pentru decelularizarea de țesut dur și țesut moale. Produsul final la obținerea unui astfel de protocol a fost o MECOv, biocompatibilă *in vitro*, vascularizată de către pediculul său vascular. Elementul de bază al studiului a fost nu doar

eliminarea componentelor imunogene din compartimentul osos, vascular și periostal a grefei, dar și obținerea unei MEC vasculare și osoasă calitativă, adică cel puțin biocompatibilă din punct de vedere morfologic și funcțional. Biocompatibilitatea MEC obținute a fost demonstrată prin recelularizarea *in vitro* a MEC cu diferite tipuri de celule.

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

(1) a fost elaborat eseu chirurgical de obținere a unei alogrefe osoase de os tibial în complex cu sursa proprie vasculară pentru ulterioara decelularizare. În premieră acest model de grefă a fost utilizată ca materie primă pentru obținerea matricei extracelulare naturale; (2) s-a elaborat și testat protocolul universal de decelularizare pentru obținerea MEC osoase compozite vascularizate; (3) s-au analizat modificările microscopice (SEM) ce au loc la nivelul osului cortical și spongios după procesare/decelularizare; (4) s-a reușit obținerea alogrefelor/MECOv, biocompatibile, ceea ce denota funcționalitatea protocolului universal testat; (5) S-a reușit recelularizarea MEC obținute prin însămânțarea diferitor tipuri de celule (HUVEC pentru MEC vascuare și BM-MSK pentru MEC osoase).

### **Valoarea aplicativă a cercetării**

Studiul efectuat, reprezintă un argument pozitiv la întrebarea dacă putem sau nu utiliza un protocol universal de decelularizare în vederea obținerii MEC osoase compozite vascularizate (țesut dus + țesut moale). Astfel, putem considera rezultatele obținute o puternică bază științifică în elaborarea ulterioară a planului de acțiune pentru proiectele de cercetarea în alotransplantul osos vascularizat pe baza studiilor *in vivo*, utilizând MECOv obținută prin IT.

### **Implementarea rezultatelor cercetării**

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

### **Aprobarea rezultatelor științifice**

Rezultatele studiului, au fost prezentate la următoarele manifestări științifice: *MedEspera International Medical Congress for Students and Young Doctors*, Chișinău, Moldova, 3-5 mai, 2018. *Conferința științifică anuală a cadrelor științifico-didactice, doctoranzi, masteranzilor, rezidenților și studenților, USMF „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău, Republica Moldova, 16-18 octombrie 2019. *11<sup>th</sup> BAPRAS Congress, 12<sup>th</sup> National Congress of RSSH and 13<sup>th</sup> National Congress of RSRM*, Cluj-Napoca, România, May 9-11, 2019. *MedEspera International Medical Congress for Students and Young Doctors, Chișinău. Moldova*, 24-26 septembrie, 2020. *Conferința științifică anuală a cadrelor științifico-didactice, doctoranzi, masteranzilor, rezidenților și studenților, USMF „Nicolae Testemițanu”*. Chișinău, Republica Moldova, 20-22 octombrie 2021. *International european conferince on interdisciplinary scientific research. Warsaw, Poland, August 8-9, 2021. 19<sup>th</sup> National Congress of the Romanian Association of Plastic Surgeons, 14<sup>th</sup> National Congress of the Romanian Society of Reconstructive Microsurgery, 13<sup>th</sup> National Congress of the Romanian Society for Surgery of the Hand*. Timișoara, România, April 28-30, 2022. *Conferința științifică națională a ortopezilor și traumatologilor din Republica Moldova, ediția a XVIII-a „Leziunile locomotorului – principii minim invazive de tratament”*. Chișinău, Republica Moldova, 25 iunie 2022. *National Scientific Conference with International Participation „Cells and tissues transplantation. Actualities and perspectives” dedicated to the 10 anniversary of the founding of the Human Tissue and Cells Bank and to the 15<sup>th</sup> anniversary of the founding of the Laboratory of Tissue Engineering and Cells Culture of „Nicolae Testemitanu”*

State University of Medicine and Pharmacy. Chişinău, Republic of Moldova, March 17-18<sup>th</sup> 2023.  
6<sup>th</sup> International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering – ICNBME-2023.  
Chişinău, Republic of Moldova, September 20-23, 2023.

### **Publicații pe tema cercetării**

La tema de cercetare au fost publicate 18 lucrări științifice, inclusiv: articole în reviste internaționale cu IF – 2, articole în culegeri indexate în SCOPUS – 3, articole în reviste național B+ – 1, materiale/teze la conferințe internaționale – 3, materiale/teze la conferințe internaționale organizate în Republica Moldova – 2, materiale/teze la conferințe (conferințe naționale) – 7. În perioada de cercetare au fost obținute 2 certificat de inovator.

### **Structura tezei**

Lucrarea este expusă pe 143 pagini și include: cuprins, lista abrevierilor, 13 tabele, 45 de figuri, introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări practice. Lucrarea se finalizează cu lista de referințe alcătuită din 257 titluri, 2 anexe, CV-ul autorului și declarația autorului privind asumarea răspunderii. **Cuvintele-cheie:** alogrefă osoasă, alogrefă compozită, alogrefă vascularizată, decelularizare, inginerie tisulară, matrice extracelulară, recelularizare, biocompatibilitate.

## **CONȚINUTUL TEZEI**

**1. Capitolul ROLUL INGINERIEI TISULARE ÎN OBTINEREA ALOGREFELOR** reprezintă o vastă analiză a publicațiilor de specialitate în vederea metodelor de obținere a MEC vasculare și osoase. Se trec prin revistă noțiunile de bază pentru o MEC calitativă, precum și problemele cele mai acute întâlnite la transplantarea *in vivo* a MEC naturale.

Ingineria tisulară reprezintă o ramură promițătoare, cu evoluție uimitoare în ultimii ani care are ca scop regenerarea țesuturilor [15, 18, 19, 20]. Prin utilizarea nanotehnologiilor, tehnicilor de bioprintare 3D, multiplelor tipuri de celule (stem) și desigur prin utilizarea MEC, IT are ca scop final crearea grefelor de țesut pentru utilizarea efectivă a terapiei de înlocuire a organelor sau segmentelor nefuncționale, prin suplینire sau regenerare celulară [21, 22, 23, 24]. Decelularizarea organelor, segmentelor de organe și țesuturilor asigură obținerea schelelor tridimensionale aceluare ce pot fi utilizate ulterior ca materie primă în reconstrucție [25, 26]. La moment, problema defectelor masive de os reprezintă unul din pilonii de bază în cauzarea handicapului funcțional [21]. Standardul de aur care reprezintă grefa autologă, reprezintă o combinație perfectă dintre MEC mineralizată, măduvă osoasă și celule osteogenice, formând în așa mod cel mai osteogenic material disponibil, cu proprietăți osteoinductive și osteoconstructive. Totuși, cantitatea disponibilă de astfel de material biologic este limitată [27, 28, 29]. MEC de origine naturală reprezintă o carcasă biologică ideală pentru aderența, creșterea și diferențierea celulelor noi în procesul de remodelarea diferitor tipuri de țesuturi sau organe atât *ex vivo* cât și *in vivo* [30, 31, 32]. În prezent, mai mult tehnici, împreună cu avantajele și dezavantajele sale sunt utilizate pentru obținerea decelularizării țesutului osos [33, 34]. Competența eliminării celulelor dintr-un organ/segment este bazată pe abordări fizice, chimice sau enzimaticе. Procesul de decelularizare are la bază de cele mai multe ori combinarea acestor 3 metode pentru a obține rezultatul final dorit [35, 36]. Dezvoltarea protocoalelor de obținere a MEC corecte, cu ulterioara recelularizare ar permite evoluția la un alt nivel a medicinei regenerative, care în combinație cu progresele tehnice ar permite pentru viitor crearea MEC personalizate.

Eficacitatea decelularizării se referă nu doar la înlăturarea componentelor celulare, dar și la păstrarea MEC. Biocompatibilitatea MEC reprezintă una din caracteristicile de bază a unei matrice aplicabile [37]. Importanța de bază a proceselor de decelularizare este îndepărtarea elementelor imunogene din alogrefe sau xenogrefe cu păstrarea intactă a componentelor MEC, astfel încât să reducem la minim eliberarea moleculelor asociate leziunilor după transplantare. Pot spune cu

certitudine că interacțiunea dintre antigeni și anticorpi în momentul transplanturilor unei MEC deteriorată, insuficient decelularizată, toxică sau sterilizată insuficient, activează în continuare cascada imună și creează un cerc vicios ce se finalizează cu eșecului transplantării. În pofida rezultatelor încurajatoare privind aplicabilitatea MEC, imunogenicitatea lor poate fi o barieră ce necesită abordată. Recunoașterea factorilor care contribuie la imunogenitatea MEC ne va permite să găsim soluții pentru fabricarea de schele cu biocompatibilitate bună *in vivo* care ar putea fi considerate aplicabile pentru transplantarea în viitorul apropiat [38, 39].

## 2. MATERIALE ȘI METODE DE CERCETARE

Lucrarea data, relatează un studiu experimental preclinic, efectuat pe probe biologice prelevate de la animale de laborator (porci). Studiul dat a fost efectuat în cadrul Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova și Laboratorului de cercetare Leibniz de biotehnologie și organe artificiale (LEBAO), Școla de Medicină din Hannover (MHH), Germania, în perioada anilor 2017-2022. Materialul biologic (grefele vaculare, grefele osoase avasculare, grefele osoase compozite vascularizate) a fost colectat de la animale de laborator, porci (femele și masculi) cu o vârstă de aproximativ 3 luni, cu o masă corporală 35-40 kg. Obiectivul de bază a capitolului dat, reprezintă descrierea detaliată a materialului și metodelor care au fost utilizate pe parcursul studiului experimental de obținere a MECOV prin descrierea: (i) eseului chirurgical de obținere a grefelor vasculare, grefelor osoase avasculare (corticale și spongioase) și a grefelor osoase pe pedicul vascular; (ii) protocolului de decelularizare utilizat; (iii) metodelor calitative și cantitative utilizate la testarea eficacității protocolului; (iv) metodei utilizate la testarea biocompatibilității *in vitro* al alogrefelor obținute (vasculare și osoase).

### Eseul chirurgical

Membrului posterior la purcel, în prima oră după eutanasiere a fost ghidată de reperele anatomice descrise în literatura de specialitate [40, 41]. Disecția a fost efectuată pe 8 membre posterioare, de la 8 purcei diferiți. cu respectarea regulilor de asepsie și antisepsie. În urma disecției am colectat grefe vasculare cu diametru diferite, grefe osoase avasculare și grefe osoase vascularizate. Pentru a testa funcționalitatea pediculului vascular al grefei osoase vascularizate și pentru a selecta dimensiunile exacte a componentei osoase, am perfuzat grefa osoasă cu o soluție ce conține albastru de metilen pentru 24 h, cu ajutorului perfuzomatului. Astfel, am obținut în final o grefă de os tibial cu o lungime de aproximativ 5 cm, vascularizată de propriu pedicul vascular, artera nutritivă - ramura arterei poplitee

În vederea eliminării confuziei, întrucât majoritatea datele din literatură utilizează termenul de „vase sanguine cu diametru mic” pentru arteriole, voi utiliza combinația de cuvinte „vas cu diametru mare” pentru artera carotidă, „vas cu diametru mediu” pentru artera femurală și „vas cu diametru mic” pentru artera tibială caudală. Consider această clasificare reală, deoarece în unele surse, clasificarea arterelor după diametru utilizează termenul de „vas de calibru mic” pentru vasele cu un diametru de la 0.3 mm până la 10 μm. Grefele vasculare și osoase colectate pentru studiu sunt prezentate în figura 1.



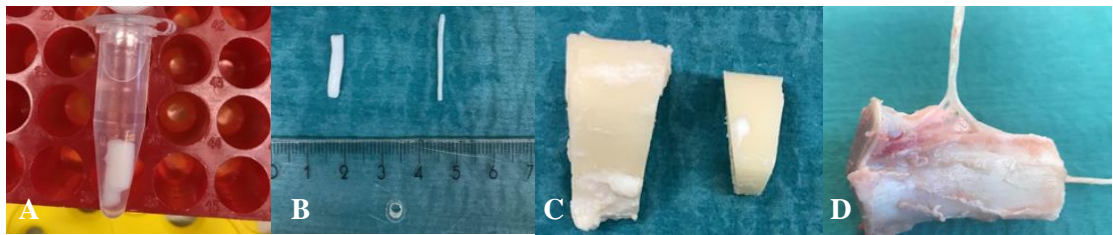


Figura 1. Lotul de grefe utilizate în studiu pentru decelularizare. (A) vas calibru mare, artera carotidă, (B) grefele vasculare calibru mediu și mic, artera femurală superficială și artera tibială caudală, (C) grefele osoase avasculare, (D) grefa osoasa compozită vascularizată.

### Protocolul de decelularizarea

Grefele vasculare și cele osoase au fost prelucrate după următorii pași: 1h - soluție isotonică, care s-a obținut din diluarea a 0.5 ml de 0.5 mM (echivalentul a 0.1 g de 372.24 g/mol) EDTA (acid etilendiaminotetraacetic/Ethylenediamine tetraacetic acid) pentru 100 ml soluție PBS (soluție tampon salină cu fosfat/Phosphate Buffered Saline); 16 h - o soluție ce conține un agent de chelare, care s-a obținut din diluarea a 0.5 ml de 0.5 mM (echivalentul a 0.1g de 372.24 g/mol) EDTA pentru 100 ml TRis buffer 10 mM cu ph 7.5; 1 h - soluție PBS; 24 h - cu o soluție ce conține un detergent anionic obținută prin dizolvarea a 0.5 gr SDS (Dodecil sulfat de sodiu/Sodium dodecyl sulfate) în 100 ml Tris buffer 10 mM cu ph 7.5; 7 h - PBS, cu schimbarea soluției la fiecare 1h; 24 h - o soluție ce conține un detergent non-ionic care s-a obținut prin diluarea a 1 ml Triton X-100 pentru 100 ml Tris buffer 10 mM cu ph 7.5; peste noapte - PBS, cu schimbarea soluției de 7 ori în prima oră; 48 h - DNază 300 U/ml, la 37°C, soluția fiind schimbată la fiecare 24h, DNază 300 U/ml s-a obținut prin diluarea a 1 mg DNază cu activitatea de 5279 U/mg în 17,5 ml PBS și 17.5  $\mu$ l 1 M MgCl<sub>2</sub>.

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

Dcelularizarea statică, utilizând un agitator digital cu mișcări oscilante a fost utilizată pentru grefele vasculare, și un mixer de tip rulou pentru grefele osoase avasculare. Decelularizarea prin perfuzie a fost utilizată pentru prelucrarea grefei osoase compozită vascularizată, soluțiile au fost perfusate prin pediculul vascular vs diafiză utilizând pompa peristaltică cu un circuit închis a soluțiilor și cu o viteză de 15 ml/h. Metodele utilizate fiind prezentate în figura 2.



Figura 2. **Procesul de decelularizare.** (A) decelularizarea statică, (B) decelularizarea dinamică cu perfuzarea soluțiilor prin artera poplitee, (C) decelularizarea dinamică cu perfuzarea soluțiilor prin diafiza osului tibial.

### Aprecierea eficacității decelularizării

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

### Testul de biocompatibilitate

Biocompatibilitatea prin recelularizarea *in vitro* a fost testată pentru MEC vasculară, MEC osoasă avasculară și MECOv. Pentru recelularizare, diferite tipuri de culturi celulare au fost utilizate. Testul de biocompatibilitate a MEC vasculară a fost efectuat cu ajutorul celulelor endoteliale umane ombelicale (HUVEC). Celulele HUVEC utilizate în acest studiu au fost transpuse prin transducție lentivirală cu proteina fluorescentă verde (GFP) pentru vizualizare la microscopul fluorescent, crioconservate și păstrate la  $-80^{\circ}\text{C}$ . Recelularizare MEC osoasă a fost efectuată cu ajutorul celulelor mezenchimale stem alogene din măduva osoasă de origine porcină (BM - MSC). Celulele BM - MSC au fost colorate cu PKH26 pentru vizualizare lor la microscopul fluorescent (figura 3). MEC au fost condiționate pentru 72 h în mediu celular specific la  $37^{\circ}\text{C}$  până la însămânțarea celulelor.

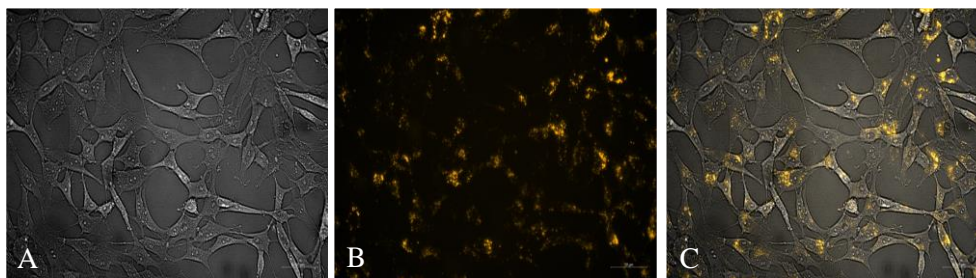


Figura 3. **Celule stem primare (BM MSC). Colorația PKH26.** (A) imaginea celulelor obținute în câmpul luminos. (B) imaginea celulelor obținute în câmpul Cy3 (oferă o culoare aurie celulelor colorate PKH26). (C) Câmpurile suprapuse (luminos + Cy3). Scala. A, B, C: 50  $\mu\text{m}$

### 3. REZULTATE STUDIULUI

#### Rezultatele testului de permeabilitate vasculară pentru grefa osoasă vascularizată

Această metodă de testare a funcționalității pediculului vascular a fost utilizată pentru a evalua perfuzia segmentului osos specific pediculului vascular într-un mediu controlat *in vitro*, ceea ce înseamnă că dimensiunile grefei osoase au fost ajustate în dependență de gradul de colorare în albatru a grefei. A fost păstrată zona colorată cel mai accentuat (figura 4).

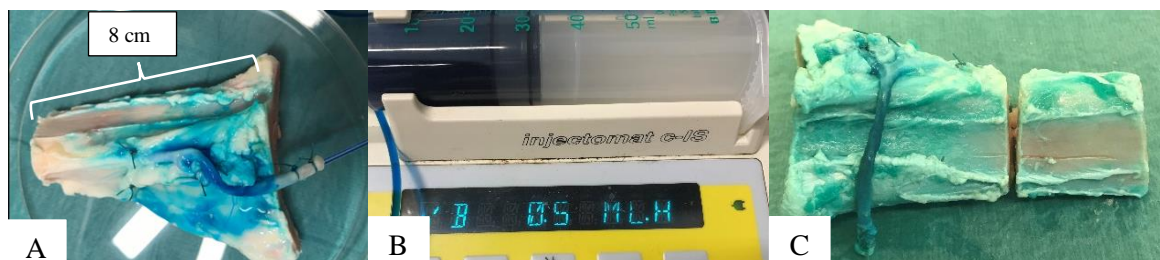


Figura 4. **Rezultatele testului de perfuzie arterială.** (A) prima oră de la perfuzia soluției pe bază de albastru de metilen. (B) parametrii perfuzomatului. (C) ajustarea dimensiunilor componente osoase a grefei la 24 h după perfuzie.

#### Examinarea histologică (H&E și DAPI)

Colorația histologică H&E și DAPI a demonstrat eficacitatea protocolului de decelularizare prin înlăturarea efectivă a nucleilor celulari în grefele vasculare (diametru mare, mediu și mic) și în grefele osoase avasculare corticale și spongioase. De asemenea, colorația DAPI a prezentat lipsa materialului de ADN în toate grefele procesate. Tote acestea în condițiile păstrării integrității MEC vasculare și osoase (figura 5, figura 6, figura 7).

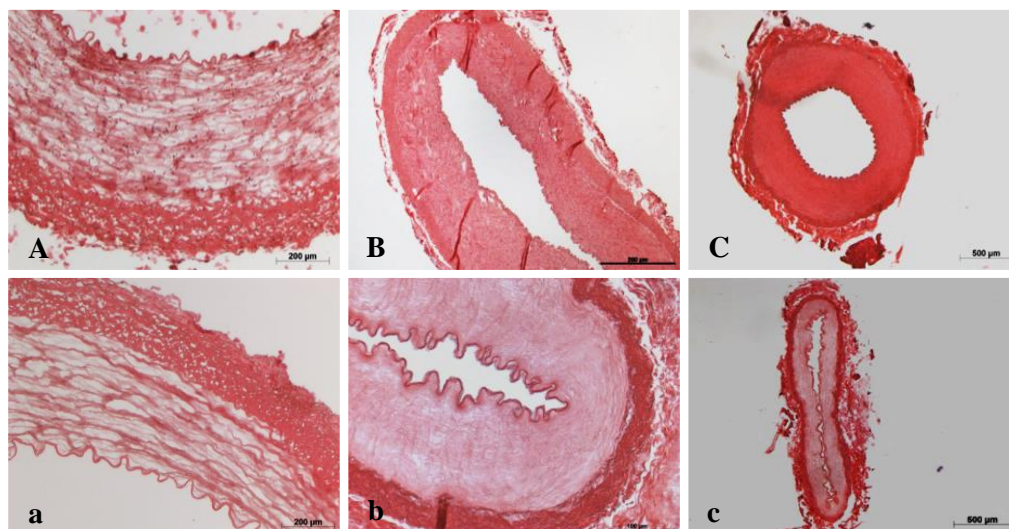


Figura 5. **Grefa vasculară nativă vs decelularizată. Colorația H&E.** (A, B, C) grefele vasculare native. (a, b, c) grefele vasculare decelularizate. (A, a) artera carotidă. (B, b) artera femurală superficială. (C, c) artera tibială caudală. Scala. A, B, a: 200  $\mu\text{m}$ ; b: 100  $\mu\text{m}$ ; C, c: 500  $\mu\text{m}$



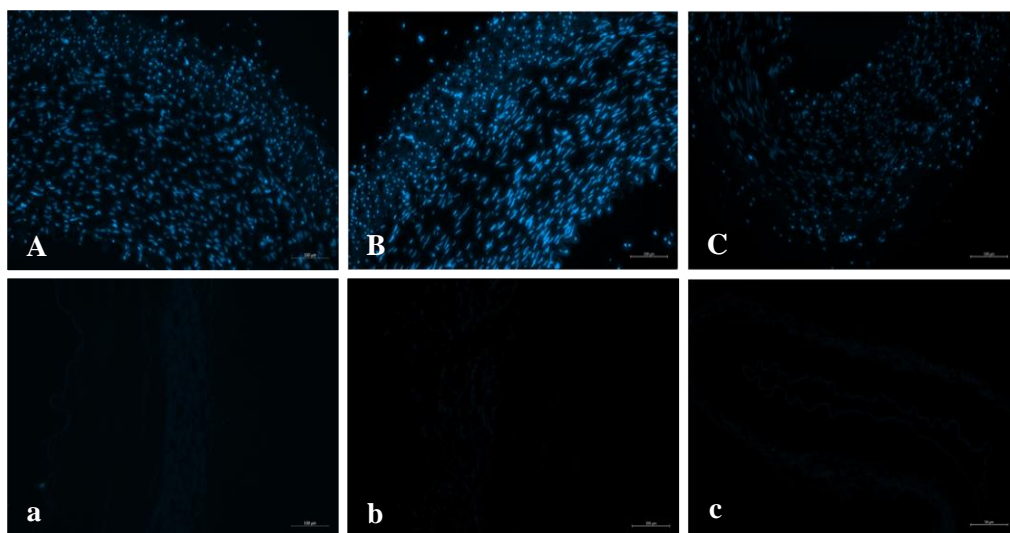


Figura 6. **Grefa osoasă nativă vs decelularizată. Colorația DAPI.** (A, B, C) grefele vasculare native. (a, b, c) grefele vasculare decelularizate. (A, a) artera carotidă. (B, b) artera femurală superficială. (C, c) artera tibială caudală. Scala. A, B, C, a, b, c: 100  $\mu$ m

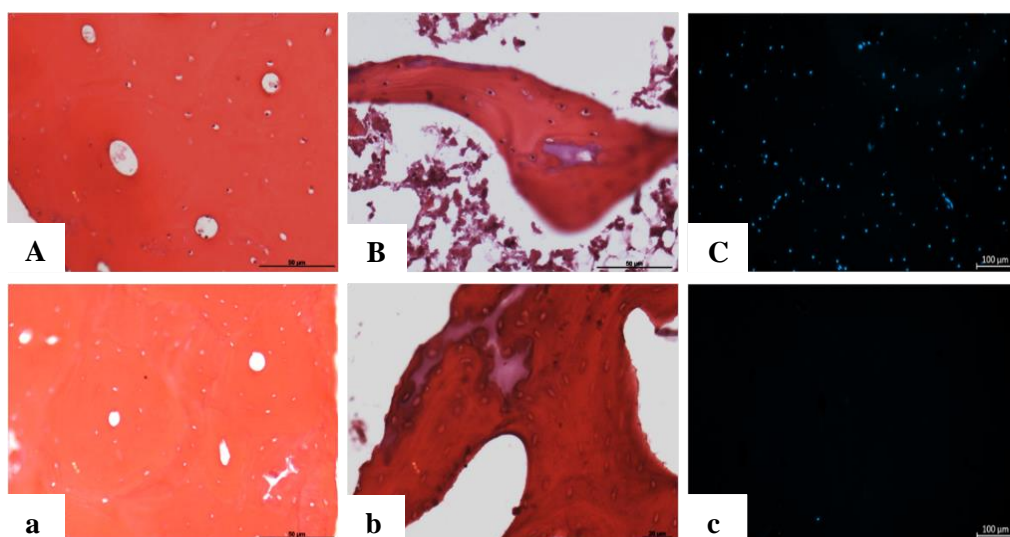


Figura 7. **Grefa osoasă nativă vs decelularizată. Colorația H&E și colorația DAPI.** (A, B, C) grefa nativă. (a, b, c) grefa decelularizată. (A, a) colorația H&E grefa corticală. (B, b) colorația H&E grefa spongioasă. (C, c) colorația DAPI grefa cortico-spongioasă. Scala. A, B, a: 50  $\mu$ m; b: 20  $\mu$ m; C, c: 100  $\mu$ m

### Microscopia prin scanare electronica

Analiza imaginilor obținute la SEM, arată că procesul de decelularizare nu a modificat în mod semnificativ structura MEC osoase corticale, confirmând eficacitatea și conservarea integrității structurale al osului în timpul tratamentului de decelularizare. În ceea ce privește probele osoase spongioase, s-a constatat că acestea sunt mai sensibile la procesarea de decelularizare. Această sensibilitate s-a manifestat prin prezentarea suprafețelor mai rugoase la probele procesate în comparație cu probele native de os spongios. În plus, structura osoasă și-a pierdut uniformitatea conturului pe întreaga suprafață examinată, indicând o modificare a aspectului microstructural al țesutului osos spongios în urma procesului de decelularizare.

Imaginile obținute la SEM pentru osul cortical și spongios navite vs decelularizate, sunt prezentate în figura 8.

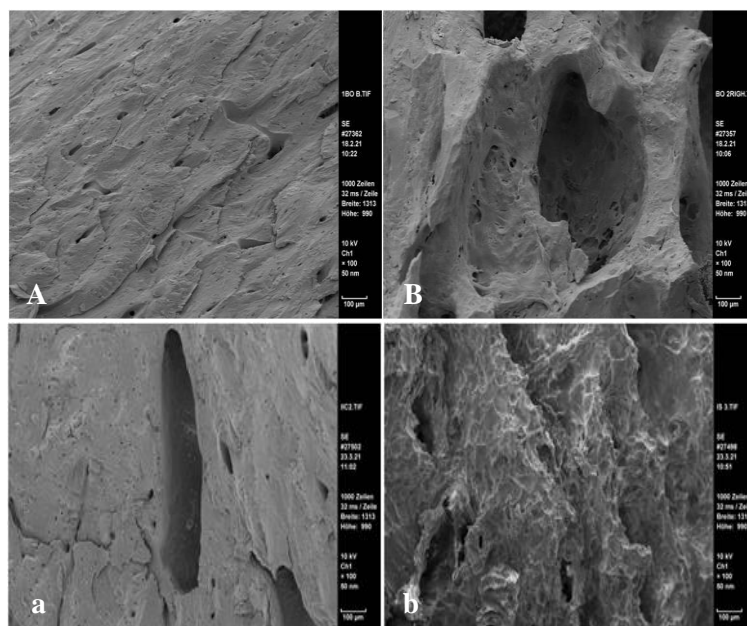


Figura 8. Grefa osoasă corticală și spongioasă nativă vs decelularizată. **SEM.** (A) os cortical nativ, (a) os cortical decelularizat. (B) os spongios natic, (b) os spongios decelularizat.

Scala. A, B, C, D: 100 µm

### Cuantificarea ADN-ului

Analiza statistică a rezultatelor obținute, a demonstrat o scădere neesențială statistic după decelularizare al ADN-ului în toate grefele pentru componenta corticală ( $p > 0.05$ , ÎI 95%) și o scădere semnificativ statistic al ADN-ului pentru componenta spongioasă ( $p < 0.05$ , ÎI 95%). Toate datele obținute la măsurarea ADN-ului sunt prezentate în tabelul 1.

Alte concluzii preliminare după analiza rezultatelor sugerează că comparativ cu osul spongios nativ, osul cortical nativ conține o cantitate mult mai mică de ADN, chiar mai mult, în unele cazuri cantitatea ADN-ului în osul nativ cortical a fost mai mică decât în osul spongios decelularizat. Astfel, pot spune că eliminarea ADN-ului din componenta corticală poate fi considerată mai puțin importantă decât eliminarea ADN-ului din componenta spongiosă.

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

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

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

Tabelul 1. **Cuantificarea ADN-ului pentru grefele osoase.**

Tipul de țesut		Concentrația de ADN ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ), media triplicatelor tehnice		
		Proba I	Proba II	Proba III
<b>Cuantificarea AND-ului pentru grefa cortico-spongioasă avasculară</b>				
os cortico-spongios nativ		3.964	4.547	4.868
os cortico-spongios decelularizat		3.156	3.676	4.01
<b>Cuantificarea AND-ului pentru MECOV decelularizată după perfuzarea prin artera poplitee</b>				
NATIV	cortical	1.015	2.647	3.835
	spongios	9.978	6.654	8.51
DECELULARIZAT	cortical	1.949	3.706	4.122
	spongios	0.862	0.488	0.969
<b>Cuantitatea ADN-ului în MECOV decelularizată după perfuzarea diafizară</b>				
NATIV	cortical	0.912	1.622	1.564
	spongios	4.705	3.931	3.653
DECELULARIZAT	cortical	0.706	1.086	1.097
	spongios	0.949	1.069	1.074
<b>Cuantificarea AND-ului pentru MECOV decelularizată după perfuzarea prin artera poplitee cu o concentrație de 1% SDS</b>				
NATIV	cortical	2.097	2.638	3.729
	spongios	20.132	19.383	20.404
DECELULARIZAT	cortical	0.970	3.899	4.067
	spongios	3.462	4.645	5.695
<b>Cuantificarea AND-ului pentru MECOV decelularizată după perfuze prin artera poplitee și utilizată ulterior pentru recelularizare</b>				
NATIV	cortical	4.950	3.962	4.508
	spongios	9.991	8.386	9.722
DECELULARIZAT	cortical	5.166	4.520	3.211
	spongios	2.134	2.928	2.049

### Testul de biocompatibilitate

Biocompatibilitatea MEC vasculare a fost testată prin însămânțarea pe lumenul vascular a celulelor HUVEC-GFP. Astfel, însămânțarea și monitorizarea celulară a demonstrat că grefa vasculară decelularizată prin protocolul utilizat permite atașarea și multiplicarea celulelor însămânțate. S-a observat o creștere progresivă a numărului de celule pe MEC vasculară timp de 8 zile, perioada pentru care s-a efectuat creșterea celulară (figura 9).

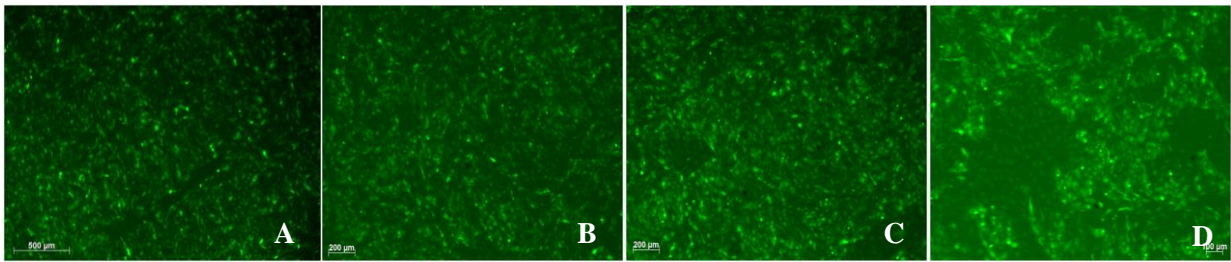


Figura 9. **Recelularizarea MEC vasculare. Precondiționarea – 72h.** Celulele HUVEC-GFP pe lumenul MEC vasculare. (A) celulele HUVEC-GFP ziua la a 2-a. (B) celulele HUVEC-GFP la ziua a 4-a. (C) celulele HUVEC-GFP la ziua a 6-a. (D) celulele HUVEC-GFP la ziua a 8-a.

Scala. A: 500 μm; B, C: 200 μm; D: 100 μm

Biocompatibilitatea *in vitro* a MEC osoase avasculare, a fost testată prin însămânțarea celulelor mezenchimale STEM marcate PKH26. Astfel, s-a observat o creștere progresivă a numărului de celule pe carcasa extracelulară osoasă timp de 8 zile, perioadă pentru care s-a efectuat creșterea celulară (figura 10).

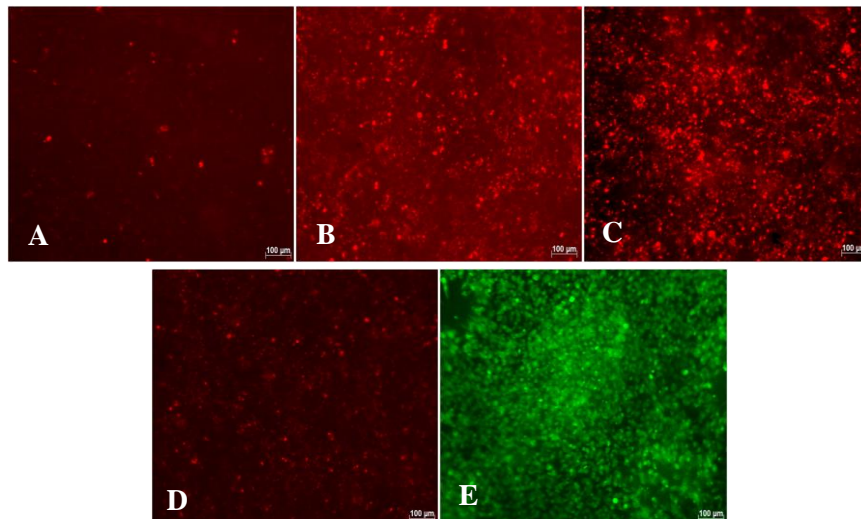


Figura 10. **Recelularizarea MEC osoase avasculare. Vizualizarea MB MSC-PKH26.** (A) celulelor MB MSC la ziua a 2-a, colorația PKH26. (B) celulelor MB MSC la ziua a 4-a, colorația PKH26. (C) celulelor MB MSC la ziua a 6-a, colorația PKH26. (D) celulelor MB MSC la ziua a 8-a, colorația PKH26. (E) celulelor MB MSC la ziua a 8-a, colorația Calcein. Scala. A, B, C, D, E: 100 μm;

Biocompatibilitatea MECOv a fost testată prin însămânțarea celulelor mezenchimale stem din măduva osoasă marcate PKH26. Celulele au fost însămânțate pe suprafața externă a grefei osoase, la nivelul periostului și în interiorul pericului vascular. În ziua a 2-a s-a determinat un număr satisfăcător de celule. Către ziua a 4-a s-a determinat o scădere ușoară a numărului celular de pe suprafața externă a MECOv, cu toate acestea, s-a determinat prezența celulelor viabile în interiorul grefei, chiar dacă celulele nu au fost însămânțate în interior. La fel, în ultima zi a testării (a 5-a zi), am determinat celule viabile la nivelul periostului și pe suprafața externă a pediculului vascular (figura 11).

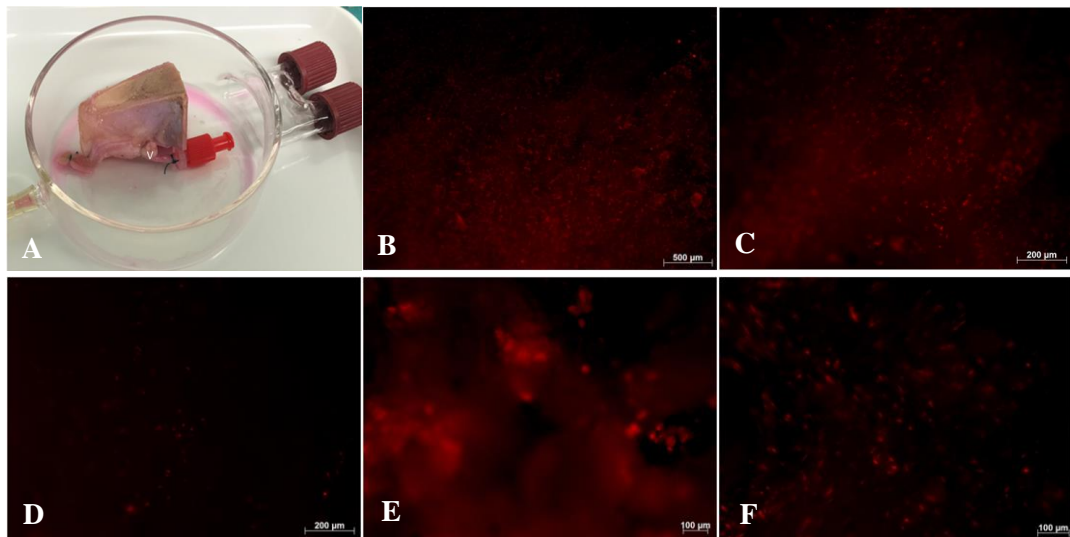


Figura 11. **Recelularizarea MECOv. Celulele MB MSC-PKH26.** (A) MECOv. (B) celulelor MB-MSC de pe suprafața externă a grefei, ziua a 2-a. (C) celulelor MB-MSC de pe suprafața externă a grefei, ziua a 4-a. (D) celulelor MB MSC de pe suprafața externă a grefei, ziua a 5-a. (E) celulelor MB-MSC din interiorul grefei, ziua a 5-a. (F) celulelor MB-MSC de pe tunica vasculară ziua a 5-a. Scala. B: 500 μm; C, D: 200 μm; E, F: 100 μm

### CONCLUZII GENERALE

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

### RECOMANDĂRI PRACTICE

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

1. Utilizarea treimeii proximale a tibiei ca material sigur pentru testarea *in vitro* a metodelor de obținere a matricelor extracelulare osoase vascularizate decelularizare;
2. Utilizarea soluției enzimatice în protocolului de decelularizare pentru eliminarea eficientă al ADN-ului din componența grefei;



3. Utilizarea metodelor de condiționare a matricei extracelulare decelularizate pentru accentuarea proprietăților de bază a acesteia și susținerea viabilității, aderenței și multiplicării celulare;
4. Testarea *in vivo* a biocompatibilității și a gradului de imunogenitate a alogrefei osoase vascularizate obținute prin decelularizare;
5. Aprecierea gradului de integrare *in vivo* prin evaluarea procesului de remodelare a alogrefei osoase vascularizate decelularizate și testarea rezistenței mecanice a acesteia după transplantare utilizând testele funcționale și imagistice.

## BIBLIOGRAFIE

1. Liu J, Zhou P, Long Y, Huang C, Chen D. Repair of bone defects in rat radii with a composite of allogeneic adipose-derived stem cells and heterogeneous deproteinized bone. *Stem Cell Res Ther* [Internet]. 2018 Mar 27;9(1):79. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s13287-018-0817-1>
2. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015 Jul 13;2015:421746. Available from: <http://dx.doi.org/10.1155/2015/421746>
3. Iordăchescu R, **Stoian A**, Gornea T, Ivanov V, Verega G. Corticoperiosteal-skin flap in the treatment of septic pseudarthrosis of the calf. Clinical case. 2020; Available from: <https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/15224>
4. Verega G. Lambourile insulare ale membrului pelvin. Tipografia Centrală, Chișinău; 2008.
5. Andrzejowski P, Masquelet A, Giannoudis PV. Induced Membrane Technique (Masquelet) for Bone Defects in the Distal Tibia, Foot, and Ankle: Systematic Review, Case Presentations, Tips, and Techniques. *Foot Ankle Clin* [Internet]. 2020 Dec;25(4):537–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fcl.2020.08.013>
6. Baldwin P, Li DJ, Auston DA, Mir HS, Yoon RS, Koval KJ. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J Orthop Trauma* [Internet]. 2019 Apr;33(4):203–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1097/BOT.0000000000001420>
7. Iordăchescu R, Verega G, Cotorobai E, Zagadailov D. Complications in treatment of tibial bone defects using Ilizarov procedure [Internet]. [cited 2024 Feb 23]. Available from: <https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/14076>
8. Stahl A, Yang YP. Regenerative Approaches for the Treatment of Large Bone Defects. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2021 Dec;27(6):539–47. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEB.2020.0281>
9. Pavlovschi E, **Stoian A**, Verega G, Nacu V. The Critical Size Bone Defects - In-Vivo Experimental Method of the Treatment with the Decellularized Vascularized Bone Allografts. In: 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering [Internet]. Springer Nature Switzerland; 2024. p. 332–47. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-031-42775-6\\_37](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-031-42775-6_37)
10. Smith CA, Board TN, Rooney P, Eagle MJ, Richardson SM, Hoyland JA. Correction: Human decellularized bone scaffolds from aged donors show improved osteoinductive capacity compared to young donor bone. *PLoS One* [Internet]. 2017 Nov 2;12(11):e0187783. Available from: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0187783>
11. **Stoian A**, Pavlovschi E, Iordăchescu R, Mihaluța V, Macagonova O, Malcova T, et al. Future perspective of vascularized bone allotransplantation. 2020; Available from: <https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/12877>
12. Zhang Y, Wu D, Zhao X, Pakvasa M, Tucker AB, Luo H, et al. Stem Cell-Friendly Scaffold Biomaterials: Applications for Bone Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Front Bioeng Biotechnol* [Internet]. 2020 Dec 14;8:598607. Available from: <http://dx.doi.org/10.3389/fbioe.2020.598607>

13. Kumar N, Kumar V, Purohit S, Gangwar AK, Shrivastava S, Maiti SK, et al. Decellularization of Skin Tissue. *Adv Exp Med Biol* [Internet]. 2021;1345:165–91. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-82735-9\\_15](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-030-82735-9_15)
14. Guo L, Liang Z, Yang L, Du W, Yu T, Tang H, et al. The role of natural polymers in bone tissue engineering. *J Control Release* [Internet]. 2021 Oct 10;338:571–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.08.055>
15. Masson-Meyers DS, Tayebi L. Vascularization strategies in tissue engineering approaches for soft tissue repair. *J Tissue Eng Regen Med* [Internet]. 2021 Sep;15(9):747–62. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/term.3225>
16. Timbalari T. Estimating the clinical needs for tissues and cells in the Republic of Moldova. *The Moldovan Medical Journal* [Internet]. 2020 [cited 2023 Nov 18];63(1):19–25. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/estimating-the-clinical-needs-for-tissues-and-cells-in-the-republic-of-moldova>
17. Codreanu I, Lozan O, Timbalari T. EVALUATION OF THE TRANSPLANT SYSTEM IN THE REPUBLIC OF MOLDOVA. *Management in Health* [Internet]. 2015 [cited 2023 Nov 18]; Available from: <https://www.semanticscholar.org/paper/d670ba4165638ed03d48b76a41003392fb724cc9>
18. Ashammakhi N, GhavamiNejad A, Tutar R, Fricker A, Roy I, Chatzistavrou X, et al. Highlights on Advancing Frontiers in Tissue Engineering. *Tissue Eng Part B Rev* [Internet]. 2022 Jun;28(3):633–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEB.2021.0012>
19. Langer R, Vacanti J. Advances in tissue engineering. *J Pediatr Surg* [Internet]. 2016 Jan;51(1):8–12. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2015.10.022>
20. Stoian A, Pavlovschi E, Caproş N, Verega G, Nacu V. Effectiveness of Tissue Engineering in Obtaining the Extracellular Composite Vascularized Bone Matrix. In: 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering [Internet]. Springer Nature Switzerland; 2024. p. 357–65. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/978-3-031-42775-6\\_39](http://dx.doi.org/10.1007/978-3-031-42775-6_39)
21. Pereira HF, Cengiz IF, Silva FS, Reis RL, Oliveira JM. Scaffolds and coatings for bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med* [Internet]. 2020 Mar 2;31(3):27. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-020-06364-y>
22. Peneda Pacheco D, Suárez Vargas N, Visentin S, Petrini P. From tissue engineering to engineering tissues: the role and application of in vitro models. *Biomater Sci* [Internet]. 2021 Jan 5;9(1):70–83. Available from: <http://dx.doi.org/10.1039/d0bm01097a>
23. Nacu V, Coşciug S, Cobzac V, Tîmbăları T. Medicina regenerativă în restabilirea ţesuturilor scheletice. 2017; Available from: <http://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/9688>
24. Macagonova O, Cociug A, Taralunga CT. The effectiveness of the tissue engineering in the obtaining of the biological materials from the extracellular matrix. *Moldovan Medical* [Internet]. 2023; Available from: [https://ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/193484](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/193484)
25. Pavlovschi E, Stoian A, Verega G, Nacu V. In vivo experimental study of the arterial supply of the rabbit posterior limb. *Moldovan Medical Journal* [Internet]. 2021; Available from: [https://ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/146622](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/146622)
26. Zhang X, Chen X, Hong H, Hu R, Liu J, Liu C. Decellularized extracellular matrix scaffolds: Recent trends and emerging strategies in tissue engineering. *Bioact Mater* [Internet]. 2022 Apr;10:15–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.09.014>
27. Chiara G, Letizia F, Lorenzo F, Edoardo S, Diego S, Stefano S, et al. Nanostructured Biomaterials for Tissue Engineered Bone Tissue Reconstruction. *Int J Mol Sci* [Internet]. 2012 Jan 11 [cited 2020 Dec 3];13(1):737–57. Available from: <https://www.mdpi.com/1422-0067/13/1/737>
28. Yang P, Xing J, Liu J, Luo F, Wu X, Yu B, et al. Individual Tissue-Engineered Bone in Repairing Bone Defects: A 10-Year Follow-Up Study. *Tissue Eng Part A* [Internet]. 2020 Aug;26(15-16):896–904. Available from: <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEA.2019.0287>
29. Xing F, Xiang Z, Rommens PM, Ritz U. 3D Bioprinting for Vascularized Tissue-Engineered

- Bone Fabrication [Internet]. Vol. 13, Materials. 2020. p. 2278. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/ma13102278>
30. Song JJ, Ott HC. Organ engineering based on decellularized matrix scaffolds. Trends Mol Med [Internet]. 2011 Aug;17(8):424–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2011.03.005>
  31. Bourguine PE, Pippenger BE, Todorov A Jr, Tchang L, Martin I. Tissue decellularization by activation of programmed cell death. Biomaterials [Internet]. 2013 Aug;34(26):6099–108. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.04.058>
  32. Liu C, Pei M, Li Q, Zhang Y. Decellularized extracellular matrix mediates tissue construction and regeneration. Front Med [Internet]. 2022 Feb;16(1):56–82. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s11684-021-0900-3>
  33. Guruswamy Damodaran R, Vermette P. Tissue and organ decellularization in regenerative medicine. Biotechnol Prog [Internet]. 2018 Nov;34(6):1494–505. Available from: <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.2699>
  34. Mariana J, Vitalie C, Ivan M, Victor P, Viorel N. Techniques of liver decellularization. The Moldovan Medical Journal [Internet]. 2018 [cited 2024 Feb 23];61(4):21–4. Available from: <https://cyberleninka.ru/article/n/techniques-of-liver-decellularization>
  35. Somuncu ÖS. Decellularization Concept in Regenerative Medicine. Adv Exp Med Biol [Internet]. 2020;1212:71–85. Available from: [http://dx.doi.org/10.1007/5584\\_2019\\_338](http://dx.doi.org/10.1007/5584_2019_338)
  36. Cobzac V, Jian M, Nacu V. Cellularization of small sized grafts from biological material using the gravitational modality principle. J Phys Conf Ser [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2024 Feb 23];1960(1):012004. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1742-6596/1960/1/012004/meta>
  37. Eyre K, Samper E, Haverich A, Hilfiker A, Andrée B. Re-endothelialization of non-detergent decellularized porcine vessels. Artif Organs [Internet]. 2020 Oct 1; Available from: <http://dx.doi.org/10.1111/aor.13836>
  38. Kasravi M, Ahmadi A, Babajani A, Mazloomnejad R, Hatamnejad MR, Shariatzadeh S, et al. Immunogenicity of decellularized extracellular matrix scaffolds: a bottleneck in tissue engineering and regenerative medicine. Biomater Res [Internet]. 2023 Feb 9;27(1):10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1186/s40824-023-00348-z>
  39. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. Biomaterials [Internet]. 2011 Apr;32(12):3233–43. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.057>
  40. Houben RH, Kotsougiani D, Friedrich PF. Outcomes of vascularized bone allotransplantation with surgically induced autogenous angiogenesis in a large animal model: bone healing, remodeling, and material .... Journal of [Internet]. 2020; Available from: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0039-1695052>
  41. Suami H, Schaverien MV. Swine hind limb model for supermicrosurgical lymphaticovenular anastomosis training. J Plast Reconstr Aesthet Surg [Internet]. 2016 May;69(5):723–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjps.2016.01.002>

## LISTA PUBLICAȚIILOR ȘI PARTICIPĂRILOR LA FORUMURI ȘTIINȚIFICE

a dnei Stoian Alina, Catedra de ortopedie și traumatologie, realizate la teza de doctor în științe medicale, cu tema „Prepararea alogrefelor osoase pe pedicul vascular – studiu experimental”,  
321.18 Ortopedie și traumatologie.

### I. Articole în reviste științifice

#### • Articole în reviste științifice internaționale:

1. **Alina Stoian**, Aisha Adil, Felor Biniazan, Siba Haykal. Two Decades of Advances and Limitations in Organ Recellularization. In: *Current Issues in Molecular Biology* 2024, 46(8), 9179-9214; DOI: 10.3390/cimb46080543 (IF: 2.8).

2. Felor Biniazan\*, **Alina Stoian\***, and Siba Haykal. Adipose-Derived Stem Cells: Angiogenic Potential and Utility in Tissue Engineering. In: *International Journal of Molecular Sciences*. 2024 Feb; 25(4): 2356. Published online 2024 Feb 16. PMID: 38397032. DOI: 10.3390/ijms25042356 (IF: 5.6).

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

- ✓ **Articole în reviste științifice categoria B+**

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

- **Articole în lucrările conferințelor științifice:**

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

4. Malcova T., Globa L., Vascan A., Țugui E., **Stoian A.**, Nacu V. Evolution of the efficacy of decellularization treatment in preparing decellularized umbilical cord artery. In: *Tiginyanu I., Sontea V., Railean S. (eds). Springer, Cham, 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2019. IFMBE Proceedings, 2020; vol 77: pp. 589-593. ISBN: 1680-0737 / ISBN: 1433-9277 (electronic). ISBN 978-3-030-31865-9 ISBN 978-3-030-31866-6 (eBook). DOI: 10.1007/978-3-030-31866-6 (SJR: 0.155, SCOPUS).*
5. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Capros N., Verega Gr., Nacu V. Effectiveness of tissue engineering in obtaining of the vascularized composite bone extracellular matrix. Experimental study. In: *Tiginyanu I., Sontea V., Railean S. (eds). Springer, Cham, 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2023; IFMBE Proceedings. 2023; vol 91: pp. 357-365. ISBN 978-3-031-42774-9 / ISBN: 978-3-031-42775-6 (online). DOI: 10.1007/978-3-031-42775-6\_39 (SJR: 0.155, SCOPUS).*
6. Pavlovschi E., **Stoian A.**, Verega Gr., Nacu V. The Critical Size Bone Defects - In-Vivo Experimental Method of the Treatment with the Decellularized Vascularized Bone Allografts. In: *Tiginyanu I., Sontea V., Railean S. (eds). Springer, Cham, 6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2023; IFMBE Proceedings. 2023; vol 91: pp. 332-347. ISBN 978-3-031-42774-9 / ISBN: 978-3-031-42775-6 (online). DOI: 10.1007/978-3-031-42775-6\_37 (SJR: 0.155, SCOPUS).*

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

- **Internaționale, desfășurate în afara Republicii Moldova:**

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

- **Internaționale, desfășurate în Republica Moldova:**

10. Pavlovschi E., **Stoian A.**, Mihaluta V. The vascularized allotransplant– successful alternative for massive bone defects. In: *Abstract book of Med Espera International Medical Congress*

for Students and Young Doctors. Chişinău. Republica Moldova, 2018: pp. 143-144. DOI: [ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/114348](https://doi.org/10.2478/ibn.idsi.md/vizualizare_articol/114348).

11. Pavlovschi E., **Stoian A.** The vascularized bone allotransplantation - in a rabbit model, preliminary report. In: *Abstract Book*. MedEspera: 2020: 8th International Medical Congress for Students and Young Doctors. Chişinău:2020, pp. 115-116. ISBN 978-9975-151-11-5. DOI: [ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/117306](https://doi.org/10.2478/ibn.idsi.md/vizualizare_articol/117306).

- **Naţionale:**

12. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Verega Gr., Birgit A., Hilfiker A., Nacu V. Experimental study in obtaining of a vascularised composite bone extracellular matrix. In: *Abstract Book. Conferinţa Ştiinţifică Anuală. Cells and tissues transplantation. Actualities and Perspectives*. Chişinău: 2023, pp. 40. CZU: 617.7. DOI: [repository.usmf.md/handle/20.500.12710/24272](https://doi.org/10.2478/repository.usmf.md/handle/20.500.12710/24272).
13. Pavlovschi E., **Stoian A.**, Gardikiotis I., Verega Gr., Nacu V., Cernei G. The vascularized bone allotransplantation after decellularization process, in vivo testing. In: *Abstract Book. Conferinţa Ştiinţifică Anuală. Cells and tissues transplantation. Actualities and Perspectives*. Chişinău: 2023, pp. 37. CZU: 616-089.57.085. DOI: [20.500.12710/24267](https://doi.org/10.2478/20.500.12710/24267).
14. Pavlovschi E., **Stoian A.**, Malcova T., Iordăchescu R., Verega Gr. Decelularizarea combinată a allogrefei osoase vascularizate. Etapă de studiu experimental in vivo. In: *Abstract Book. Congresul Consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemiţanu”*, Chişinău: CEP „Medicina”, 2020, p. 519. DOI: [ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/126485](https://doi.org/10.2478/ibn.idsi.md/vizualizare_articol/126485).
15. **Stoian A.**, Nacu V., Pavlovschi E, Macagonova O., Malcova T., Mihaluta V. Perspectiva de viitor a alotransplantului osos vascularizat. In: *Abstract Book. Congresul Consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemiţanu”*. Chişinău: CEP „Medicina”, 2020, p. 525. DOI: [ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/126554](https://doi.org/10.2478/ibn.idsi.md/vizualizare_articol/126554).
16. Pavlovschi E., Verega Gr., **Stoian A.**, Nacu V. Surgery protocol of vascularized bone allotransplant. The next stage of in vivo experimental study. In: *Abstract book. Conferinţa Ştiinţifică Anuală. Cercetarea în biomedicină şi sănătate: calitate, excelenţă şi performanţă. Chişinău: CEP „Medicina”, 2021, p. 333. ISBN 978-9975-82-223-7 (PDF)*. DOI: [ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/144671](https://doi.org/10.2478/ibn.idsi.md/vizualizare_articol/144671).
17. Balan E., Nacu V., Verega Gr., **Stoian A.**, Conservation features of bone allografts with the perspective of their reinclusion in the host organism. In: *Abstract book. Conferinţa Ştiinţifică Anuală. Cercetarea în biomedicină şi sănătate: calitate, excelenţă şi performanţă. Chişinău: CEP „Medicina”, 2021, p. 347. ISBN 978-9975-82-223-7 (PDF)*. DOI: [ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/144782](https://doi.org/10.2478/ibn.idsi.md/vizualizare_articol/144782).
18. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Nacu V., Sladic S., Andree B., Hilfiker A., Principles of decellularization for composite vascularized bone graft. In: *Abstract book. Conferinţa Ştiinţifică Anuală. Cercetarea în biomedicină şi sănătate: calitate, excelenţă şi performanţă. Chişinău: CEP „Medicina”, 2021, p. 337. ISBN 978-9975-82-223-7 (PDF)*. DOI: [ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/144677](https://doi.org/10.2478/ibn.idsi.md/vizualizare_articol/144677).

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

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

### IV. **Participări cu comunicări la forumuri ştiinţifice**

- **Internaționale:**

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

- **Naționale:**

26. Pavlovschi E., **Stoian A.**, Mihaluta V. The vascularized allotransplant – successful alternative for massive bone defects. In: *7th edition of International Medical Congress for Students and Young Doctors*. Chisinau, 3-5 mai, 2018.
27. **Stoian A.** Inițierea studiului experimental de obținere a alogrefelor osoase vascularizate. În: *Conferința Științifică Anuală în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță*. Chișinău, 16-18 octombrie 2019.
28. Pavlovschi E., Verega Gr., **Stoian A.**, Nacu V. Surgery protocol of vascularized bone allotransplant. The next stage of in vivo experimental study. În: *Conferința Științifică Anuală în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță*. Chișinău, 20-22 octombrie 2021.
29. Balan E., Nacu V., Verega Gr., **Stoian A.** Conservation features of bone allografts with the perspective of their reinclusion in the host organism. În: *Conferinței Științifică Anuală în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță*. Chișinău, 20-22 octombrie 2021.
30. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Nacu V., Sladic S., Andree B., Hilfiker A. În: *Conferința Științifică Anuală în Biomedicină și Sănătate: Calitate, Excelență și Performanță*. Chișinău, 20-22 octombrie 2021.
31. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Iordachescu R., Verega Gr., Nacu V. Alogrefa osoasă vascularizată – studiu experimental. În: *A XVIII-a Conferință Științifică a ortopezilor și traumatologilor din Republica Moldova*. Chișinău, 25 iunie 2022.
32. **Stoian A.**, Pavlovschi E., Verega Gr., Nacu V., Andree B., Hilfiker A. Experimental study in obtaining of a vascularized composite bone extracellular matrix. În: *Conferința Științifică Anuală. Cells and tissues transplantaion. Actualities and Perspectives*. Chisinau, 17-18, martie, 2023.

## V. Participări cu postere la foruri științifice / expoziții

### • Internaționale:

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

### • Naționale:

34. **Stoian A.**, Nacu V., Pavlovschi E., Macagonova O., Malcova T., Mihaluța V. Perspectiva de viitor a alotransplantului osos vascularizat. În: *Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fonsarea USMF „Nicolae Testemițanu”*. Ediție online, Chișinău, 21-23 octombrie 2020.

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

## VI. Cursuri educaționale și programe de burse

36. Proiect de stat No. 20.80009.5007.20, *Nanoarhitecturi în bază de GaN și matrici tridimensionale din materiale biologice pentru aplicații în microfluidă și inginerie tisulară*. GA 810652. Chișinău, Ianuarie 2020-Iunie 2023.

37. *Proiect No. 810652 a Uniunii Europene Horizon 2020, NanoMed TWIN*. Hannover, Germania, 01 Octombrie 2020-31 Martie 2021.

38. *Training Course on Intellectual Property Protection and Technology Transfer in the framework of the Horizon2020 project „NanoMedTwin”*. Online. Chisinau, 01 October-19 December 2020.

39. *Bursa de cercetare „Eugen Ionescu”*, 2021-2022. Cercetător științific stagiar, voluntariat. Iași, România, Decembrie 2021-Februarie 2022.

## ADNOTARE

Stoian Alina „**Prepararea alogrefelor osoase pe pedicul vascular — studiu experimental**”. Teza pentru obținerea titlului de doctor în științe medicale, Chișinău, 2024.

**Structura tezei:** lucrarea este expusă pe 143 pagini și include: cuprins, lista abrevierilor, 13 tabele, 45 de figuri, introducere, 4 capitole, concluzii generale și recomandări practice. Lucrarea se finisează cu lista de referințe alcătuită din 257 titluri, 2 anexe, CV-ul autorului și declarația autorului privind asumarea răspunderii. Rezultatele studiului au fost publicate în 18 lucrări științifice.

**Cuvintele-cheie:** alogrefă osoasă, alogrefă compozită, alogrefă vascularizată, decelularizare, inginerie tisulară, matrice extracelulară, recelularizare, biocompatibilitate.

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

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

**Noutatea și originalitatea științifică:** am elaborat și testat un protocol universal de decelularizare pentru grefele osoase compozite (țesut dur + țesut moale). S-a obținut recelularizare *in vitro* a

MEC vasculare, MEC osoase avasculare și a MEC osoase vascularizate utilizând diferite tipuri de celule.

**Problema științifică rezolvată în teză:** am determinat și caracterizat cele mai importante aspecte ale decelularizării țesuturilor moi și dure pe baza aceluiași protocol de decelularizare. Am reușit ulteriora recelularizarea *in vitro* a matricelor extracelulare obținute.

**Semnificația teoretică:** am elaborat un protocol universal de decelularizare pentru grefele osoase compozite (țesut moale + țesut dur), iar rezultatele colectate în urma acetui studiu pot servi o bază științifică utilă pentru ulterioarele studii *in vivo*.

**Valoarea aplicativă a lucrării:** studiul dat reprezintă un pas important în susținerea viitoarelor studii preclinice *in vivo* pentru elaborarea unei noi metode chirurgicale în tratamentul defectelor osoase masive de diferită genă la nivelul aparatului locomotor, prin utilizarea alogrefelor osoase decelularizate vascularizate obținute prin inginerie tisulară.

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

#### ANNOTATION

Stoian Alina „**Preparation of vascularized bone allograft – experimental study**”. The thesis for the degree of PhD in medical sciences, Chișinău, 2024.

**Thesis structure:** the thesis is presented over 143 pages and includes: table of contents, list of abbreviations, 13 tables, 45 figures, introduction, 4 chapters, general conclusions, and practical recommendations. The work concludes with a reference list composed of 257 titles, 2 appendices, the author’s CV, and a declaration of responsibility. The results of the study have been published in 18 scientific papers.

**Keywords:** bone allograft, composite allograft, vascularized allograft, decellularization, tissue engineering, extracellular matrix, recellularization, biocompatibility.

**Study Objective:** to develop a universal decellularization protocol for tissues with varying degrees of mineralization for the purpose of obtaining vascularized composite bone grafts with minimal immunogenic qualities.

**Study objectives:** (1) To develop a surgical technique for obtaining vascularized bone grafts from tibial bone in laboratory animals; (2) To establish a decellularization protocol for bone grafts (tibial bone) while preserving the vascularization pedicle; (3) To test the effectiveness of the bone graft decellularization method using qualitative (H&E, DAPI, SEM) and quantitative (DNA quantification) techniques; (4) To test the biocompatibility of vascularized extracellular bone matrix through *in vitro* recellularization using different cell types.

**Scientific novelty and originality:** a universal decellularization protocol for composite bone grafts (hard tissue + soft tissue) was developed and tested. *In vitro* recellularization of vascular extracellular matrix, avascular bone extracellular matrix, and vascularized extracellular bone matrix was achieved using various cell types.

**Scientific problem addressed in the thesis:** the most important aspects of decellularization of soft and hard tissues were determined and characterized based on the same decellularization protocol. Subsequent *in vitro* recellularization of the obtained extracellular matrices was successfully achieved.

**Theoretical significance of the thesis:** drawing up a universal decellularization protocol for composite bone grafts, and the results collected following this study can be a useful scientific basis for subsequent *in vivo* studies.



**Applicative value of the thesis:** this study represents an important step in supporting future preclinical *in vivo* studies aimed at developing a new surgical method for treating massive bone defects of various origins in the locomotor system, through the use of vascularized decellularized bone allografts obtained via tissue engineering.

**Implementation of scientific results:** the results obtained have been used in another experimental *in vivo* study titled „Treatment of large bone defects using a decellularized vascularized bone allograft incorporated into the recipient's vascular circuit”. Thus, we anticipate implementing a new decellularization protocol for vascularized composite bone grafts within the Tissue Engineering and Cell Cultures Laboratory at SUMF „Nicolae Testemitanu”.

## АННОТАЦИЯ

Стоян Алина „Приготовление костных аллотрансплантатов на сосудистом педикуле – экспериментальное исследование”. Диссертация на соискание степени кандидата медицинских наук, Кишинев, 2024.

**Структура диссертации:** диссертация представлена на 143 страницах и включает: содержание, список сокращений, 13 таблиц, 45 рисунков, введение, 4 главы, общие выводы и практические рекомендации. Диссертация завершается списком литературы, состоящим из 257 наименований, 2 приложениями, резюме автора и заявлением автора о принятии ответственности. Результаты исследования были опубликованы в 18 научных работах.

**Ключевые слова:** костный аллотрансплантат, композитный аллотрансплантат, васкуляризованный аллотрансплантат, деклеткация, тканевая инженерия, внеклеточный матрикс, реклеткация, биосовместимость.

**Цель исследования:** разработка универсального протокола децеллюляризации тканей с различной степенью минерализации с целью получения васкуляризованных композитных костных трансплантатов с минимальными иммуногенными качествами.

**Задачи исследования:** (1) Разработка хирургической техники для получения васкуляризованных костных трансплантатов из тибиальной кости у лабораторных животных; (2) Установление протокола децеллюляризации костных трансплантатов (тибиальная кость) с сохранением источника васкуляризации; (3) Проверка эффективности метода децеллюляризации костных трансплантатов с использованием качественных и количественных методов; (4) Определение биосовместимости внеклеточных матриц костей с васкуляризацией через реклеткацию *in vitro* с использованием различных типов клеток.

**Научная новизна и оригинальность:** разработан и протестирован универсальный протокол децеллюляризации для композитных костных трансплантатов (твердая ткань + мягкая ткань). Достигнута рецеллюляризация *in vitro* сосудистого внеклеточного матрикса, avascular костных матриц и васкуляризованных костных матриц с использованием различных типов клеток.

**Научная проблема, решенная в диссертации:** определены и охарактеризованы наиболее важные аспекты децеллюляризации мягких и твердых тканей на основе одного и того же протокола децеллюляризации. Успешно осуществлена последующая рецеллюляризация *in vitro* полученных внеклеточных матриц.

**Теоретическая значимость:** разработан универсальный протокол децеллюляризации для композитных костных аллотрансплантатов (мягкая ткань + твердая ткань), а собранные результаты данного исследования могут служить полезной научной основой для будущих *in vivo* исследований.

**Прикладная ценность работы:** данное исследование представляет собой важный шаг в поддержке будущих доклинических исследований *in vivo* для разработки нового хирургического метода лечения массивных костных дефектов различного происхождения

в опорно-двигательном аппарате с использованием васкуляризованных децеллюляризации костных аллотрансплантатов, полученных с помощью тканевой инженерии.

**Внедрение научных результатов:** полученные результаты уже использованы в другом *in vivo* исследовании – „Пластика обширных костных дефектов децеллюляризованным васкуляризованным костным аллотрансплантатом, включенным в адаптивный кровоток”. Таким образом, планируются внедрение нового протокола децеллюляризации васкуляризованных композитных костных аллотрансплантатов в рамках Лаборатории тканевой инженерии и клеточных культур Государственного Медицинского и Фармацевтического Университета им. Николае Тестемицану.

**STOIAN ALINA**

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

**321.18 ORTOPEDIE ȘI TRAUMATOLOGIE**

**Rezumatul tezei de doctor în științe medicale**

---

Aprobat spre tipar: 04.09.2024

Format hârtie: 60x84 1/6

Hârtie ofset. Tipar ofset.

Tirajul: 10 ex.

Coli de tipar: 2

Comanda nr. 1070

---

**Tipografia:**

Î.S. Firma Editorial-Poligrafică  
Tipografia Centrală