

RECEPȚIONAT

Agenția Națională pentru Cercetare și Dezvoltare

La data: _____

AVIZAT

Secția AȘM _____

RAPORT ȘTIINȚIFIC FINAL
privind executarea proiectului de cercetări științifice
cercetări aplicative
2018-2019

Proiectul “**Restabilirea defectelor osoase cu grefe tridimensionale aceluare**”

Cifrul Proiectului: 18.80012.80.14A

Direcția Strategică: Sănătate și Biomedicină

termen de executare: 31 decembrie 2019

Conducătorul proiectului	dr.șt.med., conf.univ., Andrei MOSTOVEI	_____ (semnătura)
Directorul organizației	dr.hab.șt.med., prof.univ., Emil CEBAN	_____ (semnătura)
Senat USMF “N. Testemițanu”	dr.hab.șt.med., prof.univ., Emil CEBAN	_____ (semnătura)

L.Ș.

CHIȘINĂU 2019

CUPRINS:

1. Scopul și obiectivele propuse spre realizare în cadrul proiectului (până la 1 pagină).
2. Rezultatele științifice obținute în cadrul proiectului.
3. Cele mai relevante realizări obținute în cadrul proiectului (până la 100 cuvinte).
4. Participarea în programe și proiecte internaționale (ORIZONT 2020, COST...), inclusiv propunerile înaintate/proiecte câștigate în cadrul concursurilor naționale/internaționale cu tangența la tematica proiectului.
5. Colaborări științifice internaționale/naționale.
6. Vizite ale cercetătorilor științifici din străinătate.
7. Teze de doctorat/postdoctorat susținute pe parcursul realizării proiectului.
8. Manifestări științifice organizate la nivel național/internațional.
9. Aprecierea activității științifice promovate la executarea proiectului (premiu, medalii, diplome etc.).
10. Rezumatul raportului cu evidențierea rezultatului, impactului, implementărilor, recomandărilor.
11. Concluzii.
12. Bugetul proiectului, lista executorilor, lista tinerilor cercetători, doctoranzilor (conform anexei nr.1)
13. Lista publicațiilor științifice ce țin de rezultatele obținute în cadrul proiectului (conform anexei nr.2)
14. Participări la manifestări științifice naționale/internaționale (conform anexei nr.3)

Conducătorul proiectului
Dr.șt.med., conf.univ., Andrei MOSTOVEI

(semnătura)

1. Scopul și obiectivele propuse spre realizare în cadrul proiectului (până la 1 pagină)

1. Elaborarea unui protocol eficient de demineralizarea a țesutului osos de origine alogenă și xenogenă.
2. Obținerea grefelor osoase demineralizate din os cortical și os spongios.
3. Elaborarea unei metode specifice de sterilizare a grefelor osoase demineralizate.
4. Testarea *in vitro* a viabilității celulelor la contact cu grefa obținută prin metoda MTT.
5. Elaborarea și perfecționarea continuă a protocolelor de obținerea a colagenului lichid, concentrarea și stocarea pe termen lung.
6. Elaborarea unei sau mai multor metode de creștere a rezistenței spongiilor de colagen la factorii agresivi intracorporeali.
7. Obținerea de spongii de colagen tip I de diferite concentrații și compararea între ele.
8. Elaborarea unui procedeu specific de sterilizare a spongiilor de colagen care ar păstra structura primară a spongiei.
9. Efectuarea testelor de citotoxicitate a spongiilor prin metoda MTT.
10. Scanarea microelectronică a spongiilor de colagen obținute.
11. Elaborarea de protocole a intervenției chirurgicale de transplantare a grefelor osoase demineralizate și spongiilor de colagen.
12. Transplantarea de țesut osos cortical demineralizat alo- sau xenogen într-un defect la nivel de os tubular lung sau craniu la animale de laborator.
13. Transplantarea de țesut osos spongios demineralizat alo- sau xenogen într-un defect la nivel de os tubular lung sau craniu la animale de laborator.
14. Transplantarea de spongii de colagen tip I într-un defect la nivel de os tubular lung sau craniu la animale de laborator.
15. Sacrificarea animalelor la 12 și 24 săptămâni postoperator.
16. Efectuarea examenelor morfologice a defectelor reparate cu țesut osos demineralizat spongios și cortical, de origine alo- și xenogenă, dar și a celor reparate cu spongii de colagen.
17. Efectuarea examenului imagistic (radiografie, tomografie computerizată, RMN) a țesutului osos demineralizat.

2. Rezultatele științifice obținute în cadrul proiectului.

Au fost efectuate demineralizări ale țesutului osos de origine alogenă și xenogenă prin electroliză în acid clorhidric (Fig. 1a, b) și au fost efectuate demineralizări și decelularizări ale țesutului osos (Fig. 2 a, b).



Fig. 1a,b Os demineralizat cu acid clorhidric prin electroliză



Fig. 2 Os demineralizat cu acid clorhidric și decelularizat cu SDS 0,5%

Protocol de demineralizare a țesutului osos

De la abator s-au procurat oase iliace de bovină, care au fost spălate de sînge și deperiostatate. S-au cîntărit mai multe bucăți de os, cu masa de aproximativ 120 și 90 grame.



Figura 3. Os iliac de vită pregătit pentru demineralizare.

La 100 gr de masă osoasă s-a turnat sol HCl de 0,6 M și s-a lăsat la temperatura camerei. Zilnic bucățile de os s-au cântărit și s-a schimbat soluția de HCL.



Figura 4. Demineralizarea țesutului osos, 24, 48 și 96 ore.

După 4 zile de demineralizare bucățile de os au devenit moi ca bureta. Acestea au fost apoi introduse timp de 24 de ore în H₂O₂ de 6% timp de 24 de ore pentru spălare de hemosiderină și degresare.

Apoi pentru o curățire mai profundă bucățile de os demineralizat se centrifugează la 2700 g, iar apoi se țin în alcool de 70% timp de 2 ore și iar se centrifugează.

După degresare bucățile de os demineralizat au devenit de culoare albă ca creta.



Figura 5. Os iliac după demineralizare și degresare.

Sterilizarea și ambalarea osului demineralizat

După degresarea osului, acesta se introduce în 500 ml de soluție pentru decontaminare alcătuită din NaCl 0,9%, 1 gr de vancomicină, 160 mg de gentamicină și 300 mg de lincomicină timp de 4 ore, filtrată prin filtru de 0,22μm. Apoi soluția de decontaminare se înlătură și se spală activ în condiții sterile o dată cu ser fiziologic, după care se adaugă 500 ml ser fiziologic și se lasă peste noapte în frigider la 4°C. Ziua următoare se înlătură serul fiziologic și se măsoară pH-ul acestuia. Pentru neutralizarea pH-ului acid restant se adaugă 250 ml de soluție HANKS fără Ca și fără Mg, se lasă la temperatura camerei cu măsurarea pH-ului fiecare 2-3 ore. Odată obținut un pH de 7,2-7,4 bucățile de os se dehidratează prin centrifugare după care se introduc fiecare separat în pachete de sigilare sterile, se congelează la -84°C după care se liofilizează la o presiune de 0,02 μbar.



Figura 6. Liofilizarea osului demineralizat

După liofilizare cu scop de a determina sterilitatea osului demineralizat liofilizat, s-a efectuat testul la însămînțare bacteriană și fungică în mediile fluide de Tioglicolat și Saburaud dextroză. Flacoanele cu medii s-au incubat în termostat la 37°C pentru 14 zile, după care s-au citi rezultatele.

După 2 săptămîni de cultură nu s-a determinat creștere și multiplicare bacteriană și fungică în mediile de identificare.



Figura 7. Rezultatele testului de însămînțare înainte de incubare și după.

Proprietățile mecanice ale osului demineralizat.

S-a determinat gradul de absorbție dar și expandibilitatea osului demineralizat cu PBS. Pentru aceasta s-au luat 3 bucăți de os spongios și cortical demineralizat, s-au compresionat maximum posibil, s-au pliat și iar s-au compresat, după care s-au întrodus la -84°C și s-au liofilizat la 0,02μbar. Apoi s-au cîntărit și s-au introdus în vase separate. În fiecare vas s-au turnat 20 ml de PBS, după care s-au pus în termostat la 37°C pentru 4 ore. După aceasta s-a aspirat tot PBS-ul din vase și s-a calculat volumul obsorbit de oase. Volumul de lichid absorbit de osul spongios constituie 400 %, iar pentru osul pentru osul cortical 150%. Iar expandibilitatea la starea inițială este aproape definitivă.



Figura 8. Determinarea gradului de umflare și de expandare a osului demineralizat.

Obținerea spongiilor de collagen.

De la bator s-au prelevat tendoane Achile de bovină, care au fost spălate bine de sânge și apoi congelate la -20°C . Apoi, după decongelare acestea se spală repetat și se cântăresc 10 grame de tendon care se mărunțește cu un foarfece bine acuit pînă la bucăți de $1 \times 1 \times 1$ mm. Apoi timp de 3 zile tendoanele se spală în soluție de Na_2HPO_4 de 0,05M la mesticător magnetic. Apoi tendoanele se solubilizează în acid acetic glacial pentru alte 3 zile. Pentru a separa bucățile de tendon solubilizate de cele nesolubilizate s-a folosit plasă din mătase în strat dublu cu porii de $100\mu\text{m}$. Colagenul obținut s-a purificat prin precipitare cu NaCl de 1,5 M de 2 ori. Apoi s-a pus la dializă cu Na_2HPO_4 pentru 3 zile. Colagenul dializat s-a colectat într-un vas care s-a congelat la -84°C . Peste noapte s-a lăsat să se decongeleze la temperatura camerei, apoi sa centrifugat la 3700 g, supernatantul s-a aruncat iar colagenul obținut s-a congelat repetat și decongelat la temperatura camerei, după care iar s-a centrifugat. Colagenul obținut în final avea o concentrație de aproximativ 9 % ceea ce este foarte mare, aceasta reprezentînd bucăți de fibră proteică la consistență similară cu guma de mestecat. Ca Urmare s-au obținut 90 ml de collagen cu concentrația de aproximativ 9%. Aproximativ 50 de ml s-au fost diluate pînă la 1% abținînd aproximativ 486 ml de suspnsie colagenică, iar colagenul restatnt s-a criocongelat.



Figura 9. Procesul de extragere și concentrare a collagenului.

Pregătirea spongiilor din collagen

Suspensia de collagen tip I din tendon Achile de bovină s-a diluat pînă la 1%, 1,5% și 2%. După care s-a centrifugat la 4000rpm 10 min pentru a înlătura bulele. Cu o seringă s-a pus cîte 5 ml soluție collagen în cutii Petri din polistiren cu diametrul de 3 cm. S-a lăsat peste noapte la 4°C. S-a congelat la -20°C după care s-a pus la liofilizare la 0,02μbar. După liofilizare spongiile s-au pus în exicator, după care s-au dus la scanarea electronmicroscopică (SEM). S-a determinat că cu cît concentrația de collagen este mai mică cu atît porii sunt mai mari iar pereții dintre pori sunt mai subțiri. De asemenea, la spongiile obținute din collagen de 1% se vizualizează mai bine prezența interconexiunilor dintre pori.

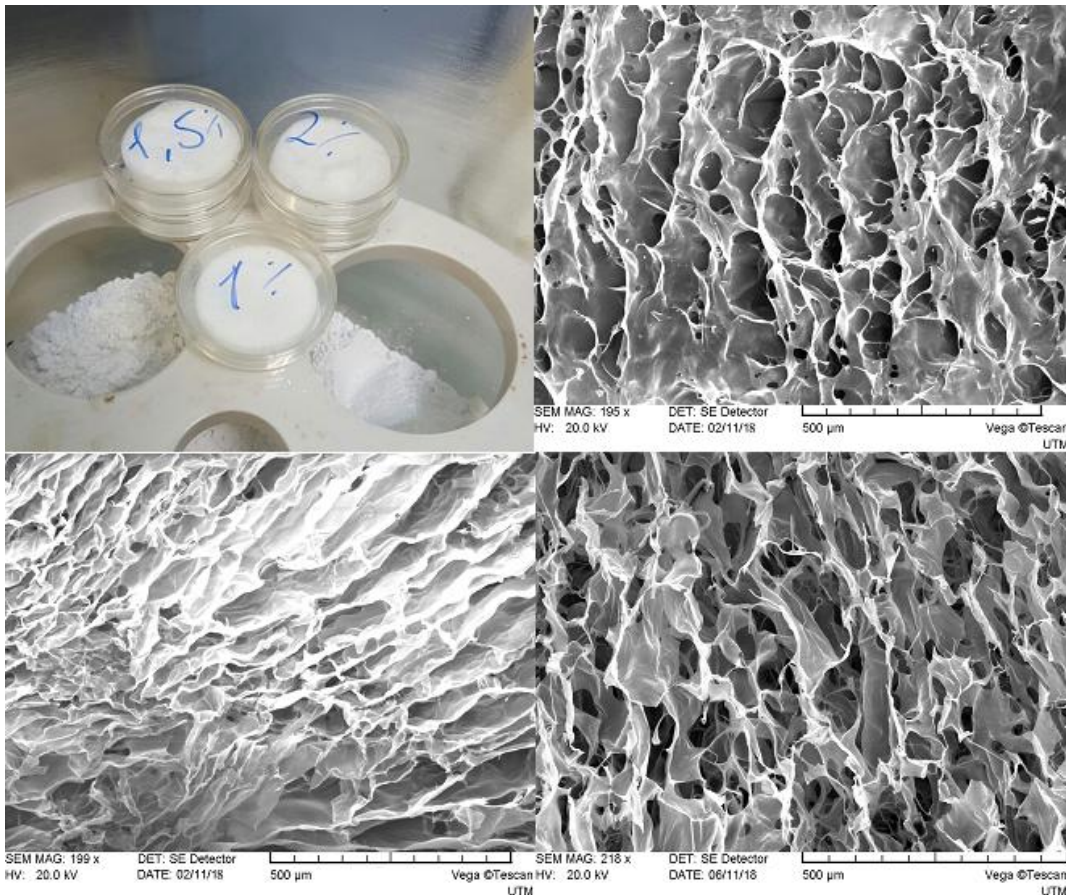


Figura 10. Spongiile de 1%, 1,5 și 2%. Examenul SEM, de la stînga la dreapta spongia de 2%, 1,5% și 1%, scara de 500μm.

Creșterea rezistenței la factorii agresivi prin reticulare

Suspensia de collagen tip I din tendon Achile de bovină s-a diluat pînă la 1%, după care s-a centrifugat la 3000 g timp de 10 min pentru a înlătura bulele. Cu o seringă s-a pus cîte 15 ml soluție collagen în cutii Petri din polistiren cu diametrul de 5,5 cm și s-au pus în frigider peste noapte. Apoi s-au congelat la -20°C și pus la liofilizare. După liofilizare spongiile s-au introdus în exicator.

1. Reticulare dehidrotermală.

Spongia liofilizată s-a pus într-o cutie Petri de sticlă și s-a pus la etuvă pentru 24 ore la 120°C. După care spongia s-a spălat cu un volum mare de apă distilată timp de 24 de ore schimbînd apă fiecare 6 ore.



Figura 11. Reticularea dehidrotermală

2. Reticulare cu tripolifosfat de sodiu

S-a pregătit soluția de TPP 0,25% și s-au turnat 15ml în cutia Petri cu spongia de collagen liofilizată. După 60 de minute spongia s-a spălat cu un volum mare de apă distilată timp de 24 de ore schimbînd

apă fiecare 6 ore. Spongia se ratatina puternic și devenea casantă. Apoi am incercat să o trec inițial prin alcool. Am pus in 15 ml Alcool 96:Apa distilata 1:1 pentru 20 min. Apoi cu o seringă am aspirat tot lichidul ce era posibil de aspirat. Dupa care am adaugat solutie TPP ca concentratia finală în care sa fie reticulată spongia sa fie de 0.25%-15ml. După 60 de minute spongia s-a spălat cu un volum mare de apă distilată timp de 24 de ore schimbând apă fiecare 6 ore.

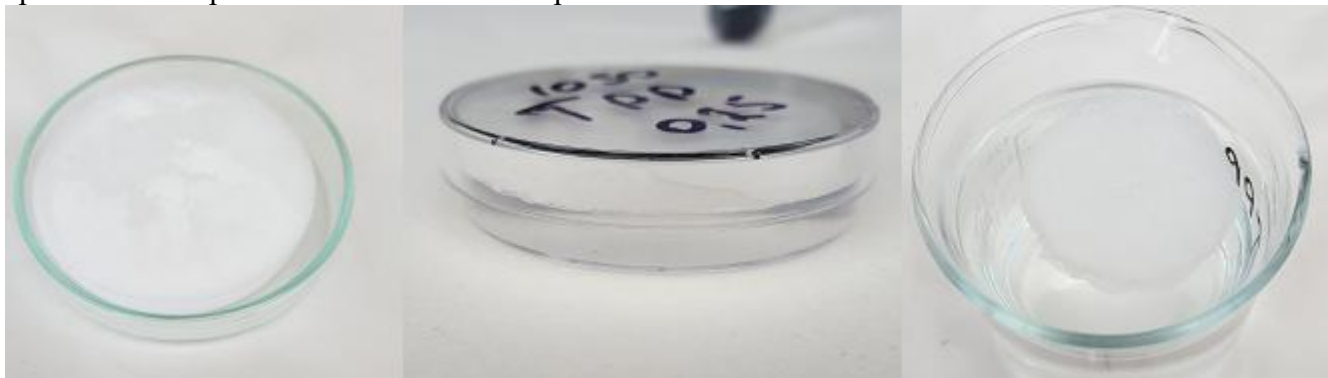


Figura 12. Reticulare cu TPP

3. Reticulare cu riboflavină

S-a pregătit soluție riboflavină de 0,25mM în alcool de 70% după care s-au turnat 15 ml în cutia Petri cu spongia și s-a lăsat pentru 24 de ore la lumina zilei. După care spongia s-a spălat cu un volum mare de apă distilată timp de 24 de ore schimbând apa fiecare 6 ore.

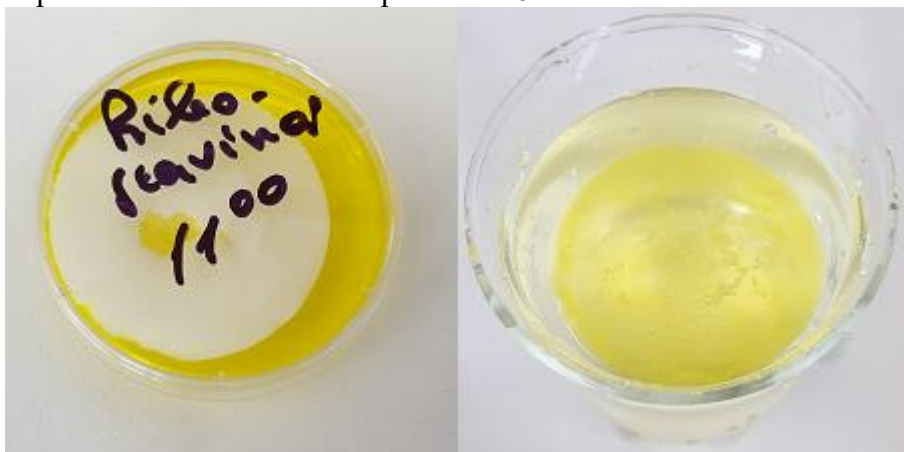


Figura 13. Reticulare cu riboflavină

4. Reticulare cu vapori de glutaraldehidă

Într-un vas de 1 litru s-a introdus într-o cutie Petri 15 ml aldehidă glutarică 25%. În același vas pe un pedistal s-a pus spongia de collagen pentru 24 ore. Vasul a fost acoperit cu parafilm. După care spongia s-a spălat cu un volum mare de apă distilată timp de 24 de ore schimbând apă fiecare 6 ore.



Figura 14. Reticulare cu glutaraldehidă.

5. Reticulare EDC/N-HS

În alcool de 70% s-a adăugat 65mM EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) și 105mM N-HS (N-hydroxysuccinimide) după care s-au adăugat 15 ml soluție în cutia Petri cu spongia de collagen pentru 24 de ore. După care spongia s-a spălat cu un volum mare de apă distilată timp de 24 de ore schimbând apă fiecare 6 ore.

După spălare, toate spongiile au fost congelate la -20°C și apoi liofilizate repetat.



Figura 15. Reticulare cu EDC + N-HS

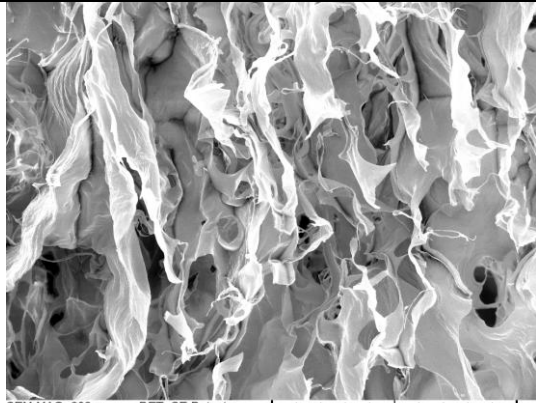


Figura 16. Spongiile reticulate cu: glutaraldehidă, TPP, EDC+N-HS, DHT 120°C și riboflavină

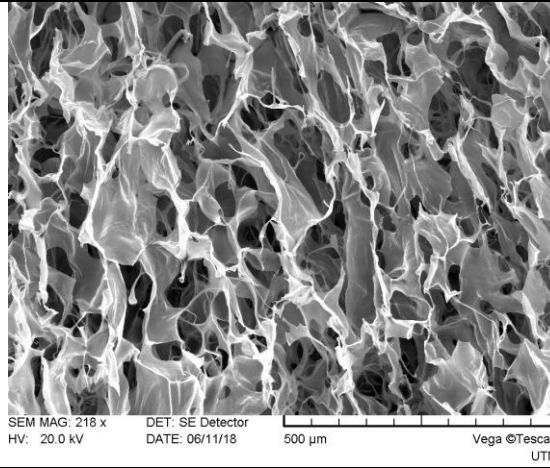
Scanarea electronmicroscopică (SEM)

Pentru a realiza scanarea electronmicroscopică este necesar ca probele să fie bine uscate și să aibă o secțiune netedă.

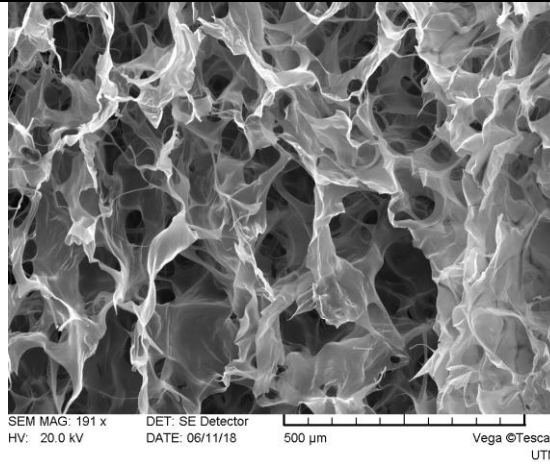
Tabelul 1

Martor	 <p>SEM MAG: 202 x HV: 20.0 kV DET: SE Detector DATE: 06/11/18 500 μm Vega ©Tescan UTM</p>
--------	--

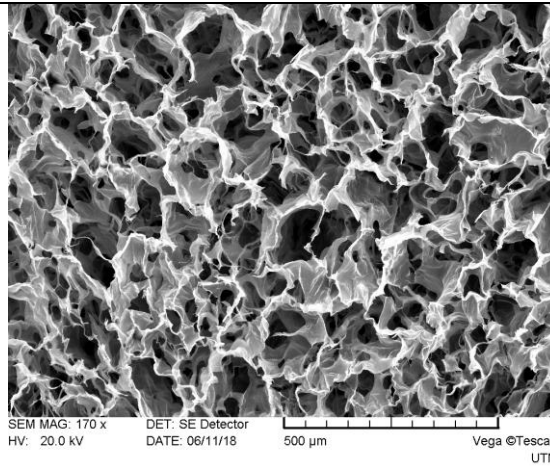
DHT 120°C



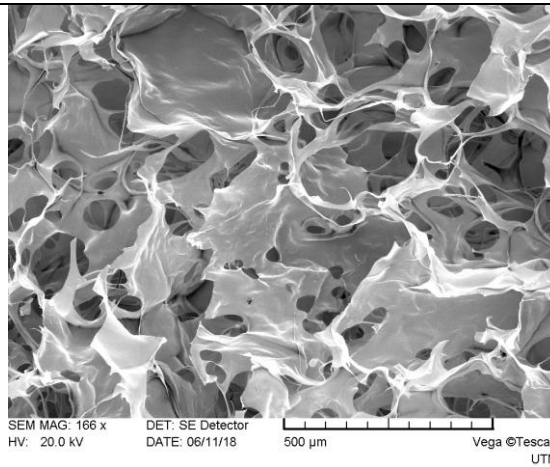
EDC+N-HS

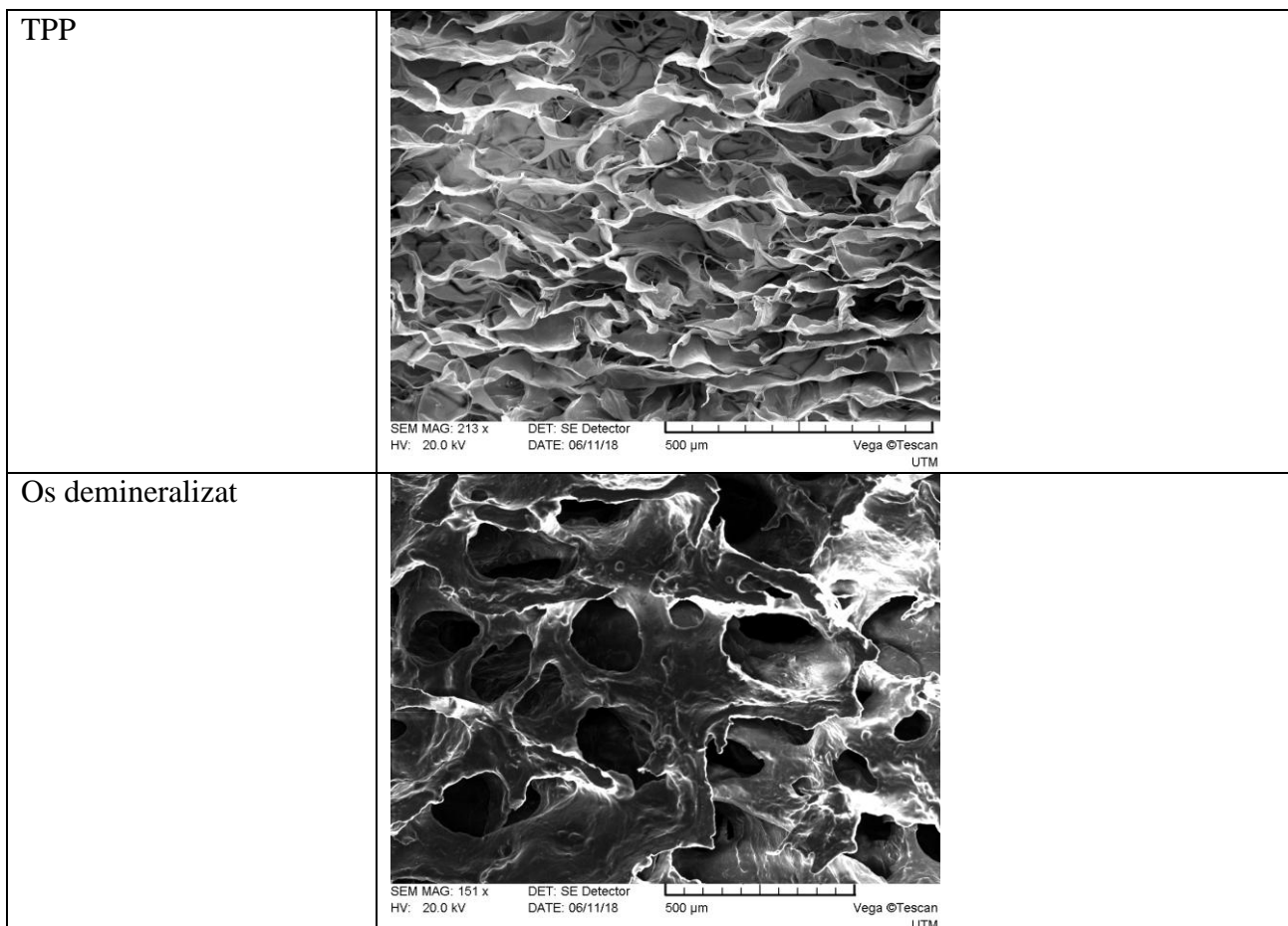


Glutaraldehydă



Riboflavină





SEM arată clar o diferență semnificativă între probele de collagen reticulate cu diverși agenți și osul demineralizat. În toate cazurile cu spongii de collagen porii sunt mai numeroși față de martor, însă dimensiunile acestora variază de la caz la caz. Cei mai mari fiind la reticularea cu riboflavină și EDC+N-HS și cei mai mici la reticularea cu glutaraldehidă. În cazul osului demineralizat porii sunt de dimensiuni medii, de același rînd cu reticularea DHT 120°C și TPP, însă numărul acestora este cu mult mai mic iar pereții dintre aceștea sunt cu mult mai groși. Dimensiunile porilor, numărul acestora dar și grosimea pereților dintre aceștea sunt un factor important în pătrunderea celulelor și remodelarea transplantului.

Efectuarea testului de citotoxicitate cu MTT

1. Pregătirea celulelor

S-a decongelat câte un criotub a câte 5×10^5 CSM și condrocite și s-au pus la flacoane de 75 cm² cu mediu de nutriție corespunzător tipului de celulă, schimbînd mediul de nutriție fiecare 2 zile pînă la o confluența de 80-90%. După tripsinizare celulele s-au resuspendat în mediul de nutriție a câte 10⁴ celule/ml, apoi acestea s-au introdus în placi cu 48 de godee a câte 5×10^3 celule pe godeu. Celulele pregătite se incubează pentru 24 ore după care în godee s-au introdus probele de cercetat.

2. Pregătirea probelor

Cu o lamă s-au tăiat câte 18 bucăți de material biologic de fiecare tip de aproximativ 1x2x3 mm, după care acestea au fost introduse în eprubete de 15 ml, în care s-au sterilizat cu alcool 70% timp de 120 min. Apoi probele s-au spălat de alcool de 2 ori cu apă distilată sterilă după care în eprubetă se toarnă HBSS cu fenol red (Sigma, UK). Eprubetele s-au lăsat la temperatura camerei timp de 24 ore, soluția de HBSS cu fenol s-a schimbat doar în eprubetele în care s-a schimbat culoarea soluției, după care probele s-au ținut în frigider pînă la începutul testului. În ziua a doua, după repartizarea CSM și condrocitelor prin placi de 48 de godee (n=6) s-au adăugat câte 3-4 bucăți de fiecare tip de țesut osteocondral în fiecare placă, numărul de godee martor variaua între 7 și 11.

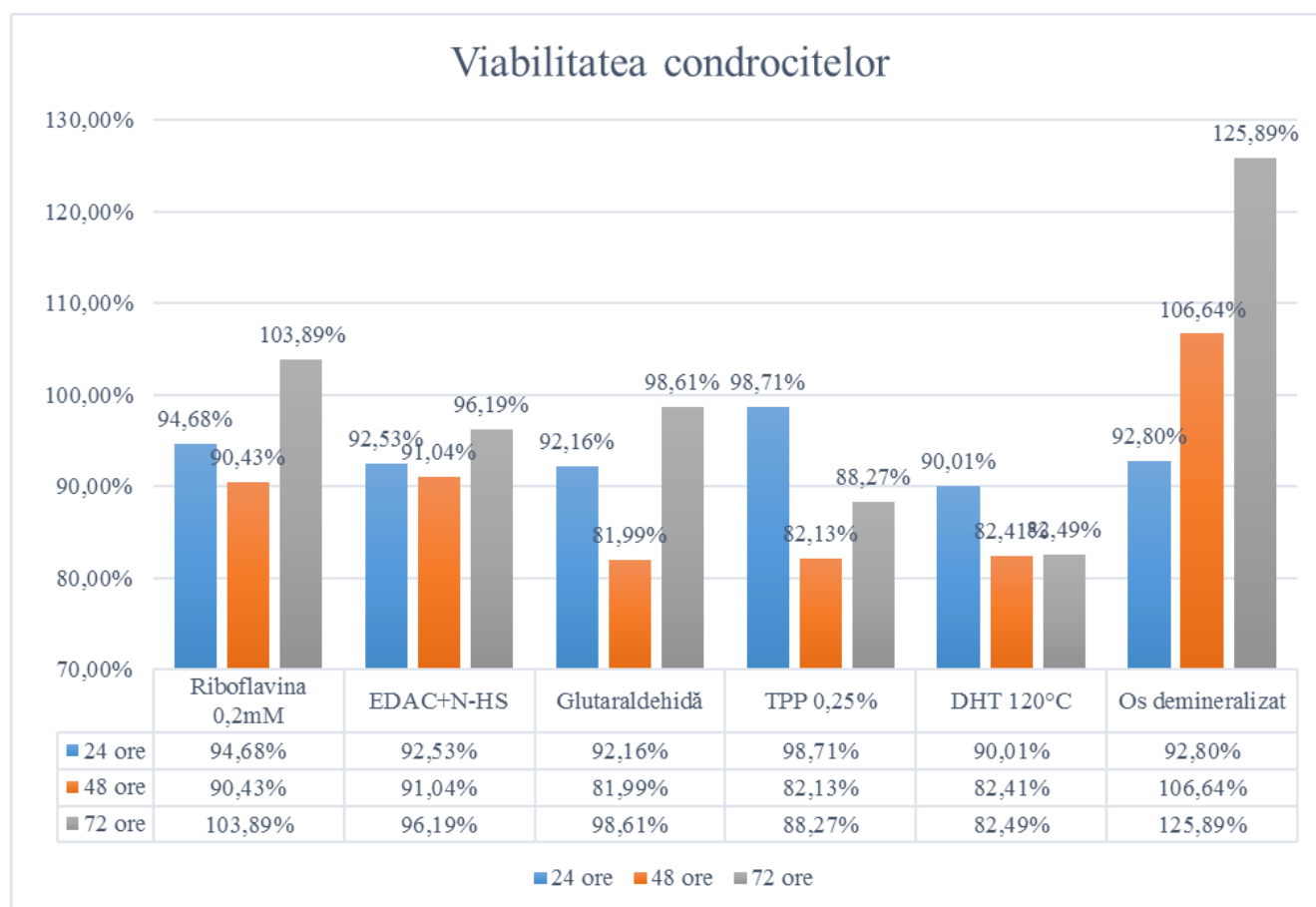
3. Pregătirea soluției MTT de 0,5%

În 30 ml soluție de HBSS fără fenol red (Sigma, UK) la întuneric s-au adăugat 150 mg de pulbere de MTT pentru a obține o concentrație de 0,5% și s-a pus la mesticător magnetic pînă ce pulberea s-a

dizolvat complet. Soluția s-a filtrat prin filtru de seringă de 0,22 μ în mai multe eprubete ce s-au învelit cu folie de staniol și s-au congelat la -20°C. În ziua de efectuării testului se decongează o eprubetă cu MTT de 0,5% din care s-a adăugat un volum necesar în mediu de cultură fără FBS pentru a obține o soluție cu 5% parte MTT, adică pentru a obține 10 ml soluție pentru test, la 9,5 ml mediu de cultură fără ser specific tipului de celulă se adaugă 500 μ l de MTT 0,5%.

4. Efectuarea testului MTT.

După expirarea primelor 24 ore de incubare cu proba, se extrag din incubator 2 plăci, una cu CSM și alta cu condrocite. Din acestea se scot toate probele de țesut osteocondral, după care se aspiră și mediul de nutriție. Apoi în condiții fără lumină în fiecare godeu se adaugă câte 500 μ l de mediu de cultură fără FBS specific tipului de celulă cu 5% MTT de 0,5% preîncălzit. Plăcile s-au învelit cu folie de staniol și s-au incubat, CSM timp de 2 ore iar condrocitele timp de 3 ore. După expirarea timpului de incubare, de asemenea în condiții fără de lumină se înlătură mediul de cultură cu MTT din fiecare godeu și se adaugă câte 500 μ l soluție isopropanol după care se agită la temperatura camerei timp de 10 min la 150 rpm (Biosan ES-20, Lituania). Rezultatele se citesc la spectrofotometru cu lungimea de unda 570 nm.



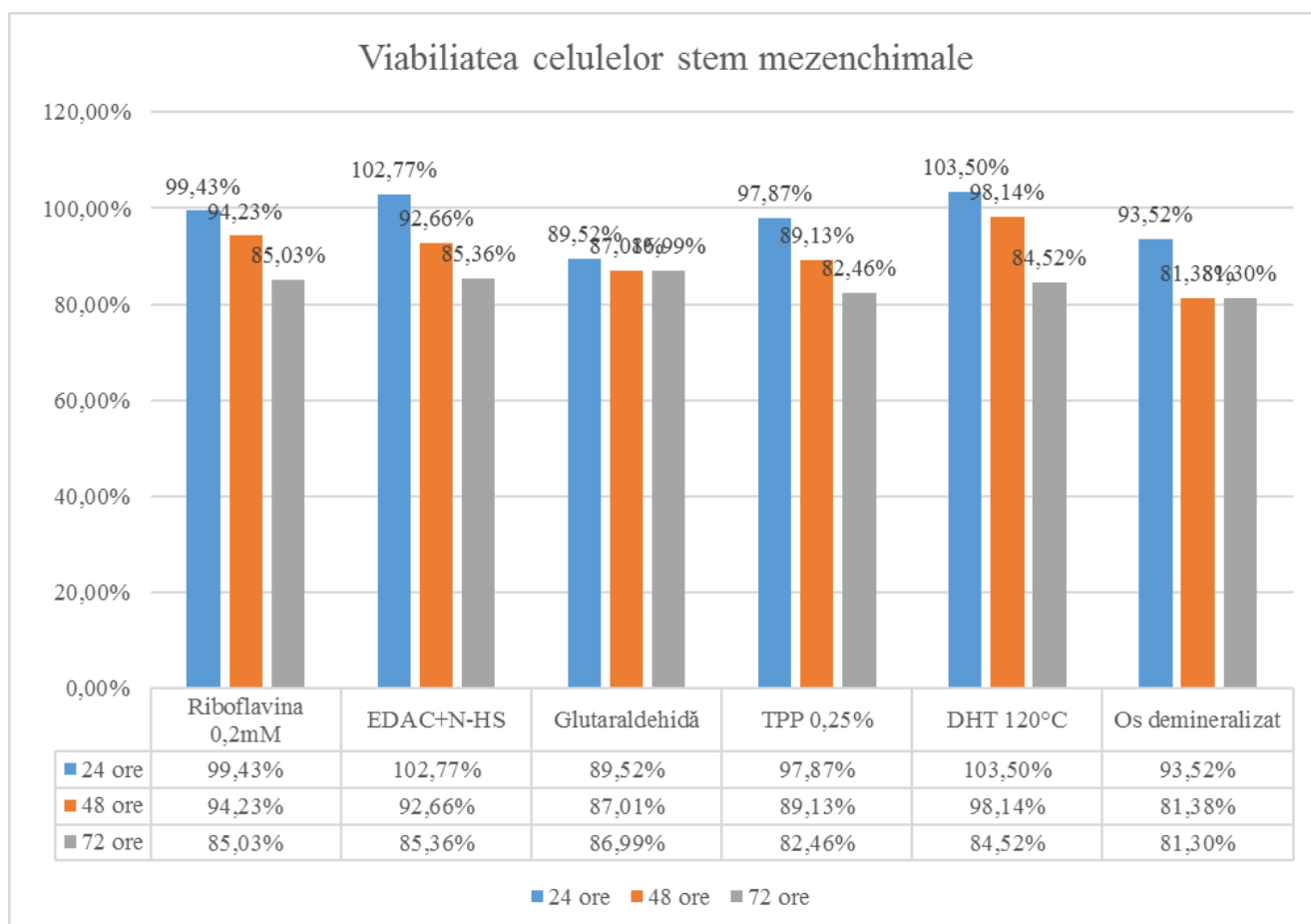


Figura 17. Rezultatele testului de viabilitate celulară cu MTT la utilizarea condrocitelor și celulelor stem mezenchimale

Testul de viabilitate celulară a prezentat rezultate foarte bune la contactul celulelor cu spongiile reticulate după diferite modalități. Posibila prezență a factorilor de creștere în osul demineralizat stimulează proliferarea condrocitelor, fiind mai mult de 100% față de martor.

Efectuarea testului de populare celulară

1. Pregătirea probelor

Cu o lamă s-au tăiat câte 4 bucăți de material biologic la 1 mm grosime, după care acestea au fost introduse în eprubete de 15 ml. Probele au fost sterilizate după procedeul descris anterior. Cu o zi înainte de a popula probele cu celule, acestea se introduc în plăci cu 96 godee. În jumătate de godee cu probe se toarnă mediu de nutriție specific CSM iar în cealaltă jumătate mediu specific condrocitelor, în volum de 200 μ l.

2. Popularea probelor

Peste 24 de ore din fiecare godeu se aspiră mediul de nutriție și se adaugă 200 μ l suspensie celulară cu o concentrație de 5×10^5 celule/ml. Ziua următoare s-a mai adăugat mediu nutritiv până la umplerea godeelor. A treia zi materialele populate cu celule se extrag din placa de 96 godee și se introduc în placa cu 48 godee cu 1 ml mediu de nutriție preîncălzit și se incubează la 37°C, 5%CO₂, cu schimbarea a 500 μ l mediu fiecare 2 zile. La 7 și 14 zile probele s-au introdus în soluție de paraformaldehidă de 4%, după care s-au colorat cu DAPI pentru microscopia fluorescentă și SEM.

3. Pregătirea probelor pentru microscopia fluorescentă și SEM.





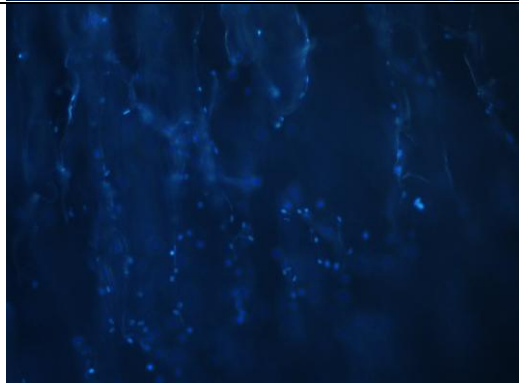

La ziua 7 și 14 de populare, din godee s-a înlăturat mediul de nutriție și s-au spălat de 2 ori cu PBS, după care s-a turnat câte 1 ml de PFA 4% în fiecare godeu. Placa s-a sigilat cu parafilm și s-a lăsat peste noapte la temperatura camerei. Ziua următoare probele s-au spălat cu HBSS cu calciu și magneziu (Sigma, UK) după care s-au pus în frigider peste noapte.




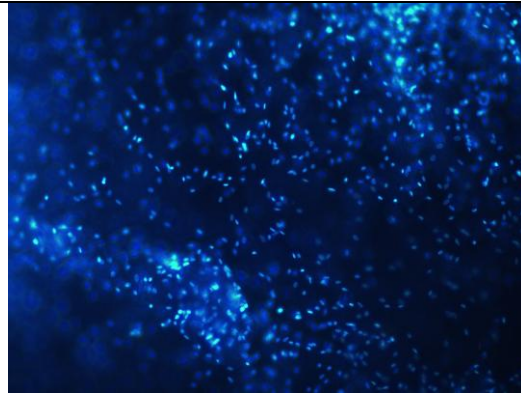
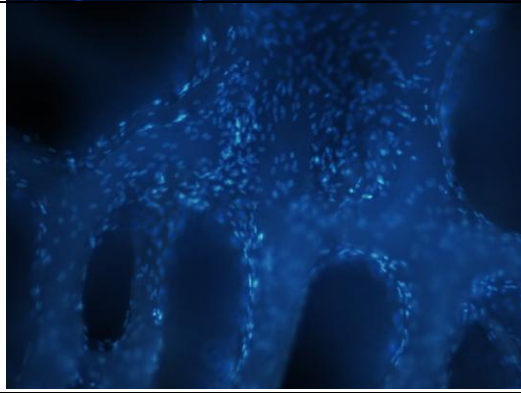
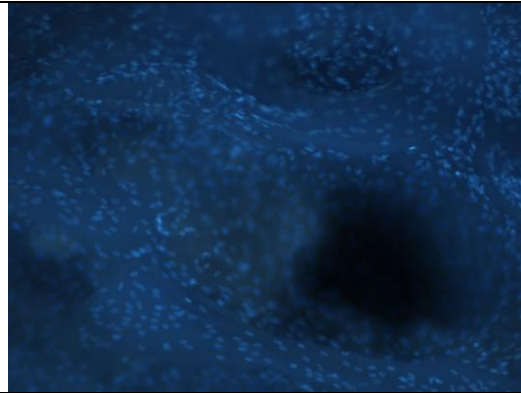

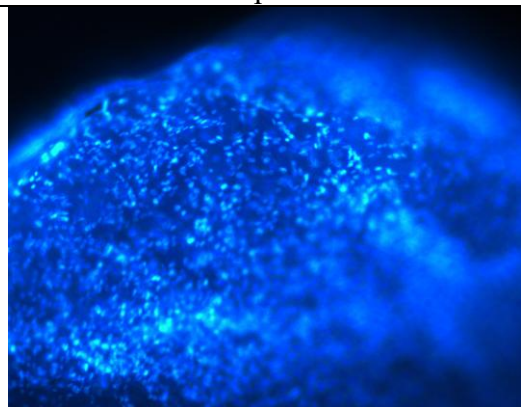
Într-o încăpere întunecată s-a pregătit soluția DAPI de 1mM în DMSO, iar soluția de lucru se face prin dizolvarea a unui 1 μ l DAPI de 1mM în DMSO la 20 ml de PBS. S-a pregătit soluția de permeabilizare


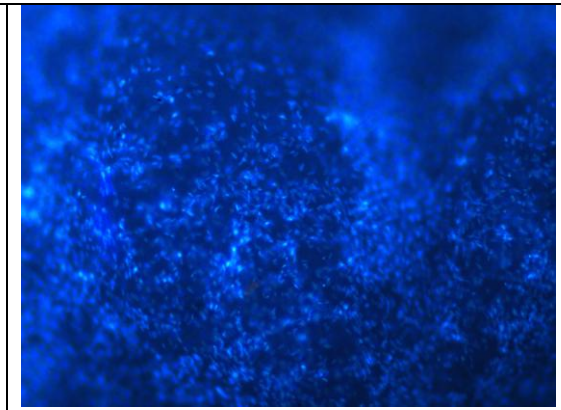





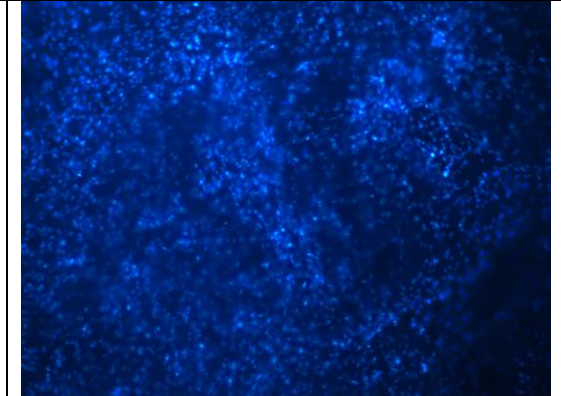
membrana: 40 ml PBS + 2 ml Triton X 100 de 10% + 0,36 gr NaCl + 0,006 MgCl₂. Soluțiile de lucru se păstrău la întuneric în frigider.

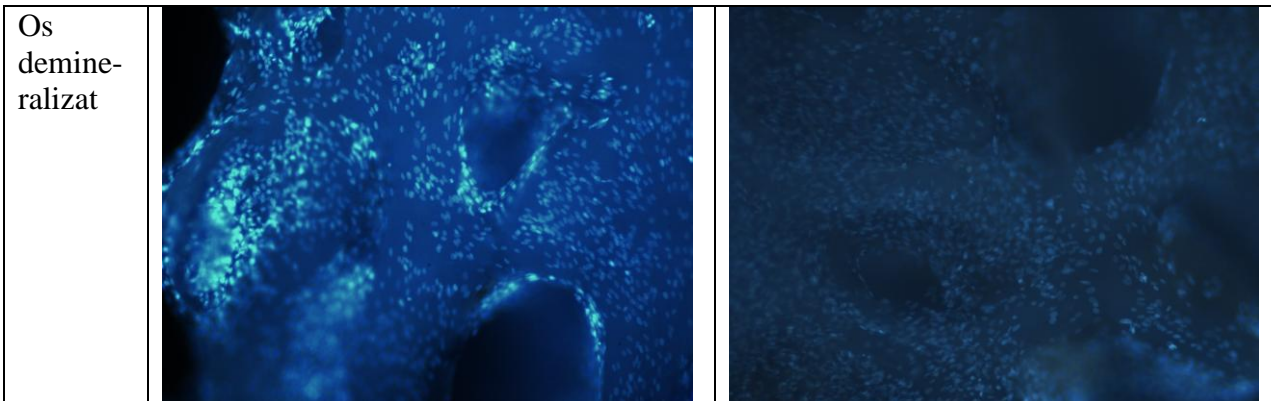
În ziua colorării se înlătură soluția bufer din godee după care se adaugă soluția de permeabilizare membrana pînă acoperă probele și se pune în frigider pentru 30 min, după care soluția de permeabilizare se înlătură iar godeele se spală cu PBS de 3 ori cîte 10 min pe șeicher (Biosan ES-20. Lituania) la 150 rpm. Apoi se adaugă 0,5 ml DAPI în fiecare godeu iar placa se învelește cu folie de staniol și se lasă la temperatura camerei pentru 30 min, după care probele iar se introduc în placile pentru spălare și se repetă procedura de spălare cu PBS 10 min de 3 ori pe șeicher. Apoi se adaugă PBS și se vizualizează la microscopul fluorescent. După examenul microscopic, probele se introduc în PBS și se lasă în frigider.

Tabelul 2.

	Condrocite	
	1 săptămînă	2 săptămîni
DHT 120°C		
EDC+N- HS		
Glutar- aldehidă		

Riboflavina		
TPP		
Os demineralizat		
Celule stem mezenchimale		
	1 săptămână	2 săptămâni
DHT 120°C		

EDC+N-HS		
Glutar-aldehidă		
Ribo-flavină		
TPP		



La efectuarea testului de populare, după colorarea cu DAPI la 1 și 2 săptămâni în marea majoritate a cazurilor s-a determinat o creștere abundentă a celulelor pe suprafața probelor. La 2 săptămâni creșterea este mai abundentă ca la 1 săptămână de cultivare ce demonstrează că suporturile biologice pregătite pot servi în calitate de transplant pentru posibila suplinire a defetelor de țesut osos și cartilagos, cu excepția spongiilor reticulate cu glutaraldehidă. În celelalte cazuri, cu excepția osului demineralizat, atât la utilizarea CSM și condrocite la termen de 2 săptămâni se determină chiar și remodelarea de către celule a materialului biologic. Necăzind la un rezultat excelent la testul de viabilitate cu MTT atât la utilizarea CSM și a condrocitelor la testul de populare cu condrocite vedem o aderare și o proliferare slabă a condrocitelor, s-ar crea impresia ca condrocitele sunt indiferente față de acest tip de agent reticulat.

Deoarece pereții porilor osului demineralizat sunt groși, acest lucru se supune procesului de remodelare de către celule, totuși prezența factorilor de creștere favorizează o creștere și multiplicare masivă a celulelor pe suprafața acestuia.

Pentru efectuarea transplantărilor de la iepuri proaspăt sacrificați s-au prelevat calotele craniene, diafizele femorale și oasele iliace. Acestea au fost demineralizate în HCl de 0,6 M, până devenise moi ca cauciucul. Apoi din fiecare bucată de os s-au tăiat bucăți circulare de os cu diametrul de 8 mm. Bucățile de os s-au degresat peste noapte în H₂O₂ de 6%, după care s-au spălat cu apă distilată timp de 24 ore. Ziua următoare bucățile de os circular s-au introdus în eprubete de 15 ml și au fost sterilizate cu alcool 70% sub acțiunea razelor UVC din hota cu flux laminar de aer. Ziua următoare grefele s-au spălat cu HBSS și lăsate peste noapte în hotă. Ziua următoare grefele s-au spălat repetat, după care s-au desiccat prin centrifugare la 4000 rpm timp de 20 min. Apoi grefele s-au pus la păstrare în ultracongelator la -84°C.



Figura 18. Calotă craniană, os iliac și diafiză femorală de iepure.

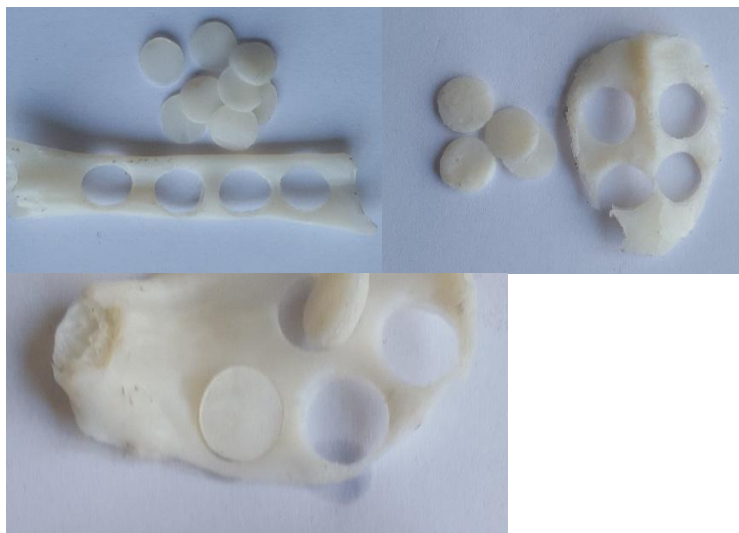


Figura 19. Diafiză femorală, calotă craniană și os iliac demineralizate.

Înainte de transplantare grefele s-au decongelat și încălzit la 37°C.

În ziua operației animalul nu s-a hranit. Animalele s-au cântărit după care s-a efectuat premedicație cu soluție xilazina 1 ml, soluție diazepam 0,5 ml și soluție ketamină 0,3 ml și soluție cefazolină 25 mg/ml. După care cu un trimmer s-a înlăturat blana de pe cap. S-a mai adăugat aceeași cantitate de anesthetic, după care regiunea frontoparietooccipitală s-a prelucrat cu soluție betadină și alcool de 70%. S-a mai injectat local anesthetic lidocaină de 1%-4ml după care s-a efectuat o incizie longitudinală frontoparietooccipitală scurtă pînă la craniu, s-a separat periostul de craniu. S-a identificat suprafața plată a osului parietal, care se situa anterior de pavilioanele urechilor. Cu un burghiu s-au efectuat 2 defecte osoase fără lezarea durei mater la nivelul ambelor oase parietale. După spălare cu ser fiziologic și uscare în defecte s-au introdus grefele de cercetat. S-a suturat plaga pe straturi, s-a prelucrat cu antiseptic, iar peste 4 ore după intervenție s-a mai injectat cefazolină de 25 mg/kg. Antibiotic s-a injectat și ziua următoare după operație, cu scop de analgezare a doua zi după operație iepurilor se injecta cite 0,5 ml de xilazină i/m. În 2 cazuri s-a defectele s-au suplinit cu autoos morcelat din aripa iliacă.

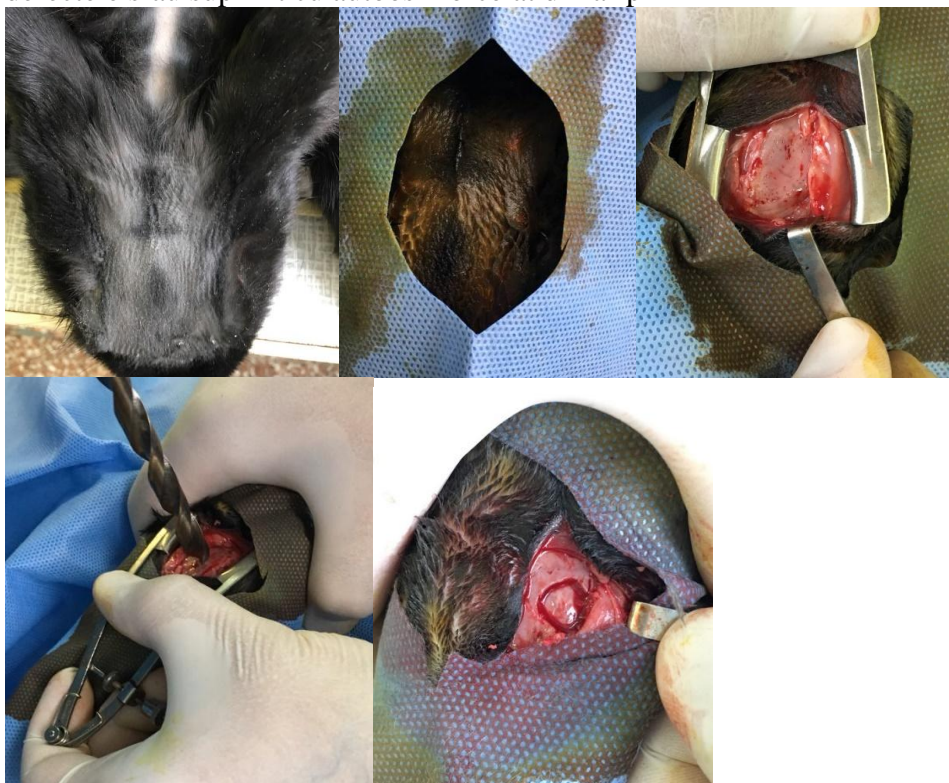


Figura 20. Pregătirea animalului pentru intervenție chirurgicală și crearea defectului de 8 mm pe suprafața plată a osului parietal.

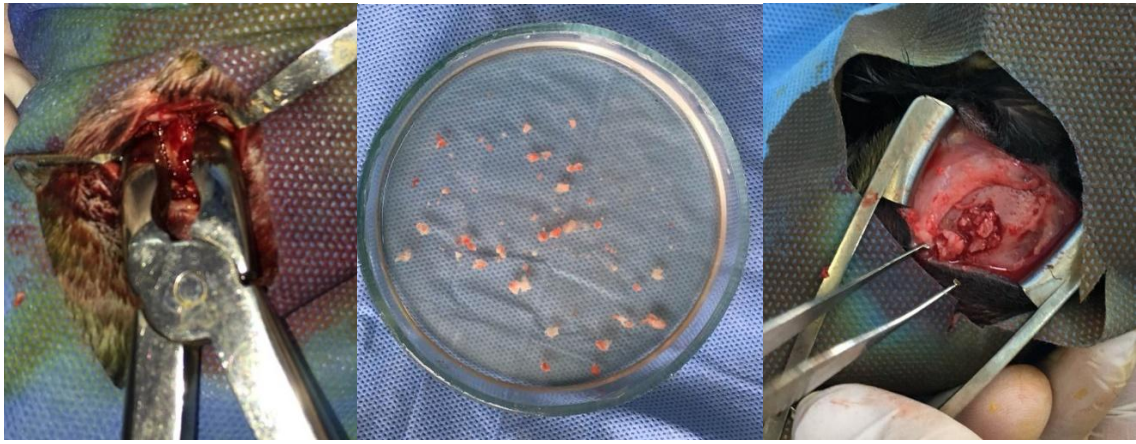


Figura 21. Transplantare autoos din aripa iliacă.



Figura 22. Transplantare os alogen demineralizat – calotă craniană.

S-a extras collagen tip I din tendon achile de bovină, s-a dialuat pînă la concentrația de 1% după care, s-a pus in nutii petri si s-a liofilizat. după liofilizare spongiile de collagen au fost reticulate edac +n-hs și riboflavină pe bază de alcool 70%. după reticulare, spongiile s-au spălat cu apă distilată timp de 24 ore după care iar s-au liofilizat (Fig 22).

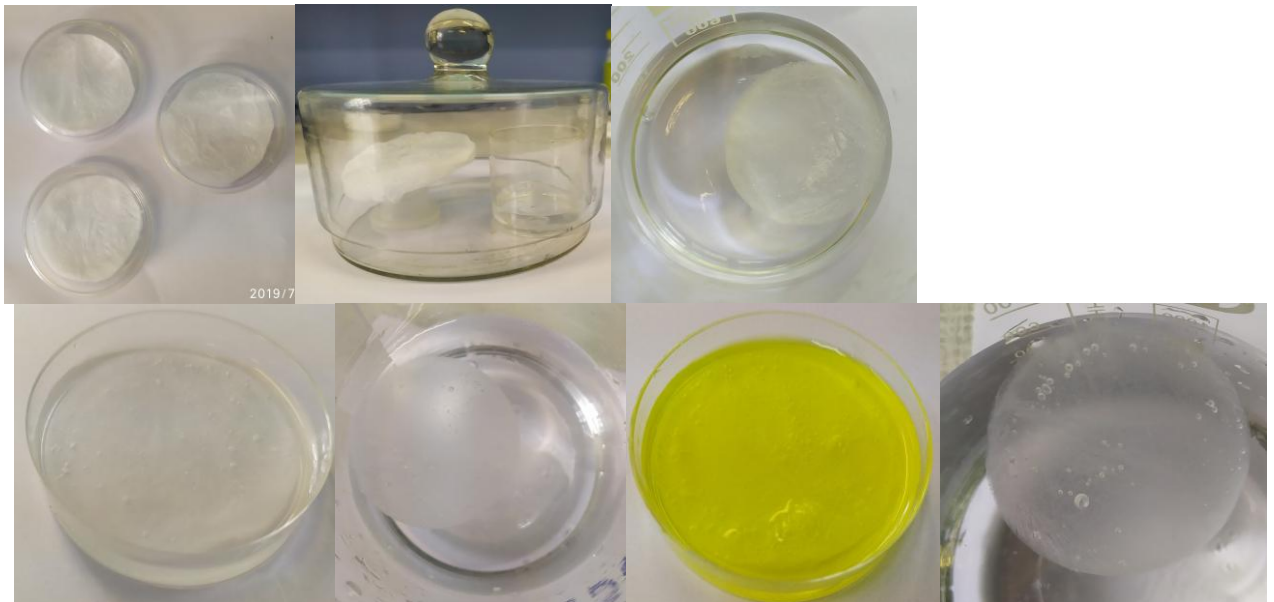


Figura 23. Obținerea, reticularea și spălarea spongiilor de collagen cu vapori de glutaraldehidă de 25%, EDAC +N-HS și riboflavină.

Ca și în cazul transplantării țesutului osos auto și alogen, s-a efectuat anestezia iepurilor, după care prin abord median sau expus oasele parietale. În ambele oase s-au efectuat defecte circulare de 8 mm in diametru după care în acestea s-au implantat discuri de spongi de collagen tip I reticulate cu glutaraldeidă de 25% (Fig. 7), riboflavină și EDAC + N-HS (Fig 23).



Figura 24. Transplantare de spongii de colagen tip I din tendon Achile de bovină, reticulată cu vapori de glutaraldehidă 25%.



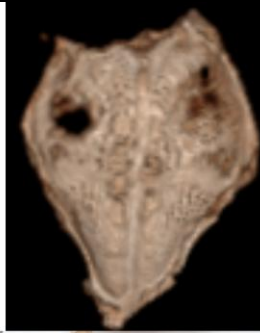
Figura 25. Transplantare de spongii din colagen tip I din tendon Achile de bovină, reticulate cu riboflavină și EDAC +N-HS

Conform datelor literaturii perioada favorabilă după timp și rezultat pentru a scoate animalele din experiment, în cazul iepurilor, este cea de 12 săptămâni. Calvariile iepurilor cu defectele osoase regenerare au fost prelevate și introduse în formaldehidă buferizată de 10% pH=7,4. După care țesutul regenerat a fost examinat macroscopic și documentat.

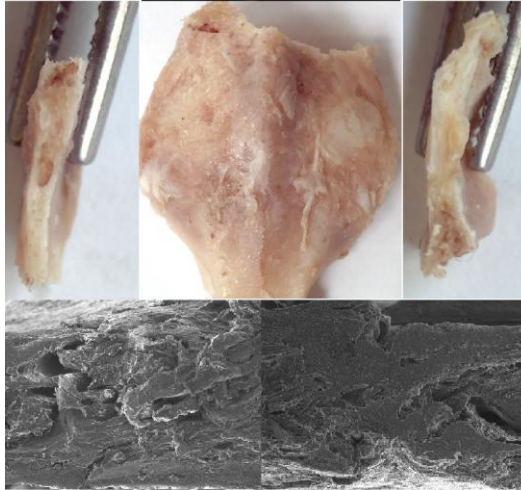
Pentru aprecierea structurală mai rapidă a defecelor regenerare s-a efectuat scanarea electronomicroscopică a țesutului regenerat, S-a efectuat examenul imagistic prin Tomografie Computerizată a țesutului regenerat pentru a analiza gradul de mineralizare a osului nou format. Rezultatele sunt prezentate în tabelul 3.

Tabelul 3. Reprezentarea țesuturilor osoase regenerare la 12 săptămâni de la transplantare: TC pentru aprecierea nivelului de mineralizare a osului nou format; piesele macroscopice aspect de sus și în secțiune laterală; scanarea electronomicroscopică a pieselor în secțiune laterală.

Autoos
morcelat
din ilion



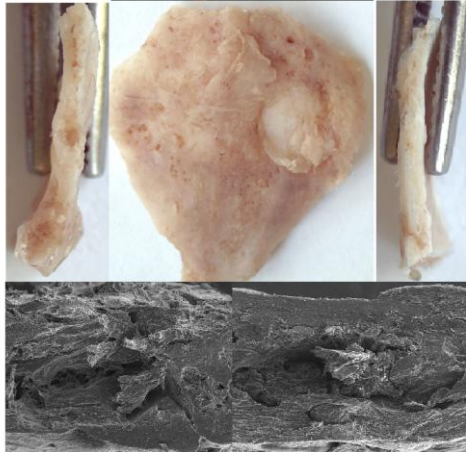
Calotă
craniană
nemorcelată



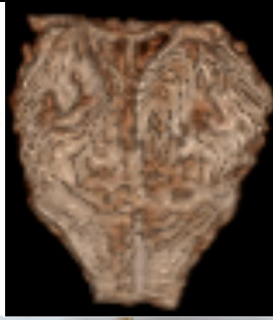
Autoos
morcelat
din ilion



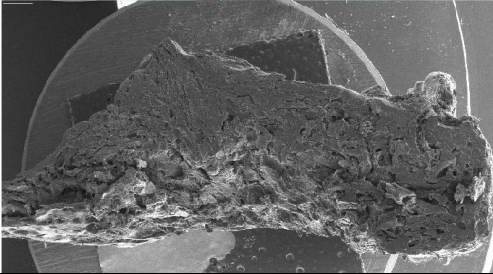
Calotă
craniană
nemorcelată



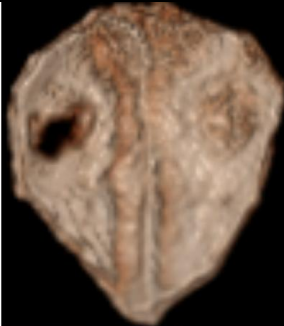
Os morcelat
din bazin



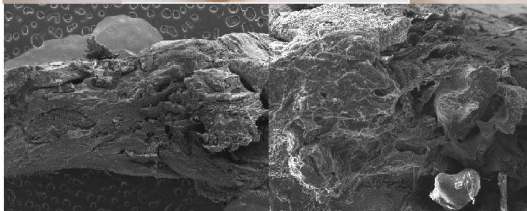
Os morcelat
din bazin



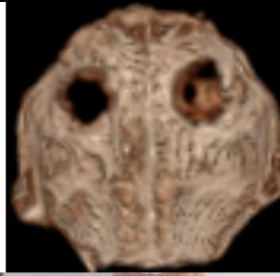
Calotă
craniană
morcelată



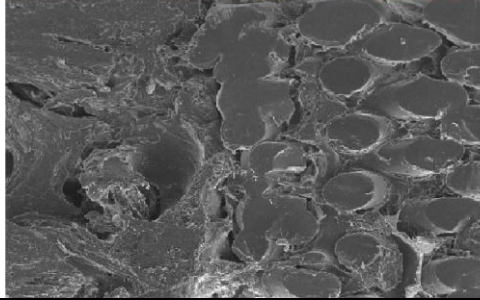
Diafiză
femurală
morcelată



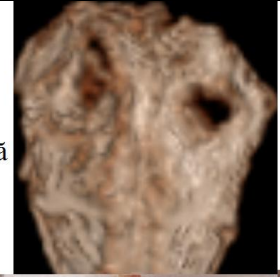
Disc PLA



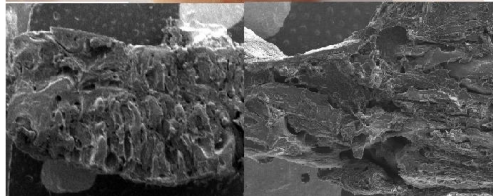
Disc PLA



Calotă
craniană
morcelată





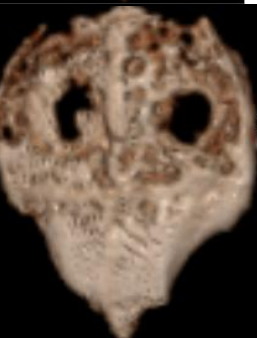

Diafiză
femurală
morcelată



GTA



Riboflavină

Os cortical demineralizat întreg		Spongie cu hidroxiapatită
GTA		EDAC +N-HS
Riboflavină		EDAC+ N-HS
Os iliac demineralizat		Spongie cu hidroxiapatită

4. Cele mai relevante realizări obținute în cadrul proiectului (până la 100 cuvinte).

A fost elaborat protocolul de demineralizare, degresare și sterilizare și conservare a grefelor osoase cu utilizarea soluției de acid clorhidric 0,6 M a câte 90 g de os ileac de origine bovină timp de 4 zile.

Au fost obținute osoase demineralizate corticale și spongioase cu aprecierea gradului de umflare a grefelor rezultate, care constituie 400 % pentru osul spongios și 150% pentru osul cortical.

A fost elaborată metoda de sterilizare a grefelor osoase prin utilizarea alcoolului de 70% și a soluției antibiotic antimicotic, criocongelării și supunerii presiunii negative de 0,02 μbar.

A fost determinată citotoxicitatea grefelor obținute prin metoda directă și indirectă cu celule stem mezenchimale din măduvă osoasă și condrocite. S-a obținut o viabilitate celulară la 24, 48 și 72 de ore de peste 80% la utilizarea celulelor stem mezenchimale și 100% la utilizarea condrocitelor. Prin metoda directă s-a determinat o populare identică, abundentă în utilizarea ambelor tipuri de celule la 7 și 14 zile.

A fost perfecționat protocolul de obținere a colagenului prin utilizarea congelării și utilizarea forțelor de centrifugare la valori mari. S-a reușit concentrarea suspensiei de colagen la valori maxime de 9-10 %. (inovație)

Au fost efectuate croslinkuri ale spongiilor de colagen la utilizarea soluției alcoolice de riboflavină, TPP, EDCD-N- hydroxisuccinimidă și prin utilizarea metodei de hidrotermare la 120 grade și vapori de glutaraldehidă.

Au fost obținute spongiile din colagen tip I cu concentrația de 1%, 1,5% și 2%. La spongiile cu concentrație mai mare porii sunt mai mici și lipsesc interconexiunile între acestea, iar matrixul spongios are pereții mult mai groși față de spongia de 1% ceea ce nu este favorabil pentru invazia celulară, deoarece spongia devine densă.

A fost elaborat procedeul de sterilizare a spongiilor de colagen tip I prin utilizarea alcoolului de 70% și forțelor de centrifugare la valori mari și ultracongelare.

A fost determinată citotoxicitatea spongiilor obținute prin metoda directă și indirectă cu celule stem mezenchimale din măduvă osoasă și condrocite. S-a obținut o viabilitate celulară de peste 80% la utilizarea celulelor stem mezenchimale și iar la utilizarea condrocitelor în cazul reticulării cu riboflavină, EDC+NH-S viabilitatea celulară a fost de 100%.

Au fost efectuate testări *in vivo* a grefelor aceluare tridimensionale obținute.

5. Participarea în programe și proiecte internaționale (ORIZONT 2020, COST...), inclusiv propunerile înaintate/proiecte câștigate în cadrul concursurilor naționale/internaționale cu tangența la tematica proiectului.

Participarea la concursul de conectare a laboratorului la platforma europeană de cercetare cu proiectul “Conectarea laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare la platforma Europeană de cercetare”.

6. Colaborări științifice internaționale/naționale.

Colaborari internaționale cu UMF “Gr.T.Popa”, Universitatea Politehnică București, Medical School of Hannover.

Colaborări naționale cu UTM, Institutul de Fizică Aplicată, Centrul Medicamentului.

7. Vizite ale cercetătorilor științifici din străinătate.

Nr. d/o	Numele, prenumele, gradul și titlul științific, ale savantului	Țara și denumirea organizației în care activează savantul	Scopul vizitei. Descrierea succintă a activităților (realizarea proiectelor comune, stagiu, participări la manifestări științifice)	Termenul vizitei
1.	Dr. Andres Hilfiker	Hannover Medical School, Germany	Realizarea proiectului comun NanoMedTwin	16 septembrie 2019

9. Aprecierea activității științifice promovate la executarea proiectului (premiu, medalii, diplome etc.).

Diplomă la concursul Academiei de Științe a Moldovei pentru tinerii cercetători “Boris Melnic” participant Vitalie Cobzac.

10. Rezumatul raportului cu evidențierea rezultatului, impactului, implementărilor, recomandărilor.

A fost elaborat protocolul de demineralizare, degresare și sterilizare și conservare a grefelor osoase cu utilizarea soluției de acid clorhidric 0,6 M a câte 90 g de os ileac de origine bovină timp de 4 zile.

Au fost obținute grefe osoase demineralizate corticale și spongioase cu aprecierea gradului de umflare a grefelor rezultate.

A fost elaborată metoda de sterilizare a grefelor osoase prin utilizarea alcoolului de 70% și a soluției antibiotic antimicotic, criocongelării și supunerii presiunii negative de 0,05 milibar.

A fost determinată citotoxicitatea grefelor obținute prin metoda directă și indirectă cu celule stem mezenchimale din măduvă osoasă și condrocite.

Au fost efectuate testări *in vivo* ale grefelor aceluare tridimensionale obținute.

Rezultatele științifice obținute au un rol important în economia țării. Anume, utilizarea matricelor tridimensionale aceluare cu scop de a restabili stocul osos ca urmare a pierderii de masă osoasă survenit în urma fracturilor, necrozei osoase, otrofiei osului și înlăturarea tumorilor osoase. Acestea pot fi utilizate în chirurgia oro-maxilo-facială, neurochirurgie, ortopedie și traumatologie, chirurgie plastică și reconstructivă.

Recomandări

Testarea potențialului de regenerare osoasă la utilizarea grefelor osoase demineralizate celularizate, obținerea de pastă osoasă combinată cu celule osoase sau celule stem pentru regenerarea a diverse defecte de os prin procedee minim-invazive. Obținerea și transplantarea de oase tubulare lungi demineralizate populate cu celule osoase sau stem pe model animal.

Utilizarea în practica clinică a grefelor osoase demineralizate morcelate, deoarece acestea și-au răstă eficațitate în testele *in vivo* pe animale.

Limitarea utilizării spongiilor colagenice xenogene în activitatea clinică, inferioritatea acestora fiind demonstrată pe teste *in vivo* pe mode animal.

Utilizarea PLA în defecte mari de țesut osos care nu este supus la forțe mari, forma căruia poate fi obținută prin 3D imprimare.

11. Concluzii

1. Toate tipurile de material biologic obținut prezintă rezultate bune la testul de viabilitate cu MTT la utilizarea CSM și condrocitelor, iar osul demineralizat la utilizarea condrocitelor prezintă rezultate excelente, viabilitate de 125% față de martor aceasta se poate datora prezenței factorilor de creștere celulară.
2. Testul de viabilitate celulară a prezentat rezultate excelente, cu remodelarea grefei la 2 săptămâni, doar că la utilizarea condrocitelor pe spongii reticulate cu glutaraldehidă acestea prezintă indiferență față de spongie. Aceasta nu poate fi datorată dimensiunilor porilor deoarece în cazul utilizării de CSM creșterea și multiplicarea celulară este abundentă. În cazul osului demineralizat din cauza unui număr mic de pori și pereților groși dintre acestea remodelarea are loc foarte încet, însă cantitatea de celule este mult mai mare comparativ cu spongiile.
3. Pentru a elucida toate proprietățile grefelor obținute teste suplimentare sunt necesare, dintre care: viteza de degradare enzimatică, rezistența la compresiunea mecanică dar și gradul de umflare cu lichide.
4. Grefele osoase demineralizate morcelate par să fie cel mai indicate în utilizarea chirurgiei plastice a țesutului osos. La compararea cu standartul de aur, grefele osoase demineralizate morcelate au rezultat în formarea de țesut osos mineralizat mult mai calitativ într-o perioadă mult mai scurtă. Spongiile de colagen, fiind de origine xenogenă au prezentat rezultate mult slabe comparativ cu oasele demineralizate morcelate, totuși rezultatele care le aduc cel mai aproape de standartul de aur le-a spongiile cu hidroxiapatită și cele reticulate cu riboflavină, problema mare a acestora fiind remodelarea pronunțată a spongiilor care duce la pierderea acestora în grosime. PLA de asemenea poate fi utilizat în restabilirea defectelor de țesut osos, doar că numai în oasele ce nu sunt supuse la forțe mecanice pronunțate, necătfind la osteointegrarea bună rezistența acestuia la forțele mecanice poate lăsa mult de dorit.

Volumul total al finanțării (mii lei) (pe ani)

Anul	Planificat	Executat	Cofinanțare
2018	95 mii	95 mii	19 mii
2019	95 mii	95 mii	19 mii

Lista executorilor (funcția în cadrul proiectului, titlul științific, semnătura)

Nr d/o	Numele/Prenumele	Anul nașterii	Titlul științific	Funcția în cadrul proiectului	Semnătura
1	Andrei Mostovei	1984	Dr.șt.med.	Director de proiect	
2	Cobzac Vitalie	1986	Doctorand	Cercetător științific	
3	Jian Mariana	1986		Cercetător științific	
4	Vartic Victoria	1988		Cercetător științific	
5	Coșciug Stanislav	1988	Doctorand	Cercetător științific	
6	Moscalu Dionisie	1998	Student	Preparator	

Lista tinerilor cercetători

Nr d/o	Numele/Prenumele	Anul nașterii	Titlul științific	Funcția în cadrul proiectului
1	Andrei Mostovei	1984	Dr.șt.med.	Director de proiect
2	Cobzac Vitalie	1986	Doctorand	Cercetător științific
3	Jian Mariana	1986		Cercetător științific
4	Vartic Victoria	1988		Cercetător științific
5	Coșciug Stanislav	1988	Doctorand	Cercetător științific
6	Moscalu Dionisie	1998	Student	Preparator

Lista doctoranzilor

Nr d/o	Numele/Prenumele	Anul nașterii	Titlul științific	Funcția în cadrul proiectului
1	Cobzac Vitalie	1986	Doctorand	Cercetător științific
2	Coșciug Stanislav	1988	Doctorand	Cercetător științific

Conducătorul proiectului

Dr.șt.med., conf.univ., Andrei MOSTOVEI

(semnătura)

LISTA
lucrărilor publicate

Teze la foruri științifice internaționale (peste hotare):

1. MOSTOVEI, A.; TOPALO, E.; TOPALO, V.; CHELE, N.; CIOBANU, S.; DABIJA, I. The influence of implants platforms contamination during insertion upon bone loss during healing period. In: The 27th Annual Congress of European Association for Osseointegration, 11-13 October, 2018, Vienna, Austria. Clinical Oral Implants Research. 2018, vol. 29, 17 (suppl.), 409, ISSN 0905-7161.

Comunicări orale la congrese internaționale:

1. COBZAC, V. Combined grafts in the treatment of osteochondral defects. *The 2nd edition of International Conference of Aesthetic - Plastic and Regenerative approaches in Medicine and Surgery (CONFESTESIS-2019)*, 24-26 October 2019, Iasi, Romania, p. 2.

Comunicări orale la congrese naționale:

1. COBZAC, V. Grefe tridimensionale în restabilirea cartilajului articular. Conferința științifică anuală a USMF „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova 15-19 octombrie 2018. p. 37.

Postere la congrese internaționale (peste hotare):

1. COȘCIUG, S.; COBZAC, V.; MOSTOVEI, A.; CHELBAN, R.; NACU, V. Bone grafts demineralization by electrolysis. Abstract book. EATB 2018.

Conducătorul proiectului

Dr.șt.med., conf.univ., Andrei MOSTOVEI

(semnătura)

Participări la manifestări științifice naționale/internaționale

1. Cobzac Vitalie. The 2nd edition of International Conference of Aesthetic - Plastic and Regenerative approaches in Medicine and Surgery (CONFESTESIS-2019), 24-26 October 2019, Iasi, Romania, p. 2. Combined grafts in the treatment of osteochondral defects.
2. Mostovei Andrei. The 27th Annual Congress of European Association for Osseointegration, 11-13 October, 2018, Vienna, Austria. Clinical Oral Implants Research. The influence of implants platforms contamination during insertion upon bone loss during healing period.

Conducătorul proiectului
Dr.șt.med., conf.univ., Andrei MOSTOVEI

(semnătura)