

**Școala doctorală în domeniul Științe medicale**

Cu titlu de manuscris

*CZU: 616.717/.718-089.844-092.9(043.2)*

**PAVLOVSKI Elena**

**PLASTIA DEFECTELOR OSOASE TUBULARE CU ALLOGREFĂ  
INCLUSĂ ÎN CIRCUITUL VASCULAR ADOPTIV  
(studiu experimental)**

**321.18 – ORTOPEDIE ȘI TRAUMATOLOGIE**

**Teză de doctor în științe medicale**

**Chișinău, 2026**

Teza a fost elaborată în cadrul Catedrei Ortopedie și traumatologie, Laboratorului de Inginerie tisulară și Culturi Celulare, Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” a Consorțiului fondator al Școlii doctorale în domeniul Științe medicale.

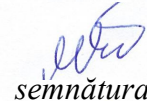
**Conducător științific:**

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

  
semnătura

**Conducător științific prin cotutelă:**

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

  
semnătura

**Membrii comisiei de îndrumare:**

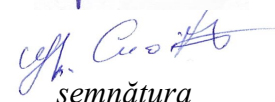
Caproș Nicolae,

dr. hab. șt. med., prof. univ.

  
semnătura


Croitor Gheorghe,

dr. hab. șt. med., prof. univ.

  
semnătura

Cociug Adrian,

dr. șt.med., asist. univ.

  
semnătura

Susținerea va avea loc la 29.04.2026, 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 12.11.2025 (*proces verbal nr. 77*).

**Componența Comisiei de susținere publică a tezei de doctor:**

Jana Bernic,

dr. hab. șt. med., prof. univ., președinte:

semnătura

Verega Grigore,

dr. hab. șt. med., conf. univ., conducător de doctorat

semnătura

Nacu Viorel,

dr. hab. șt. med., prof. univ.,conducător prin cotutelă

semnătura

Caproș Nicolae,

dr. hab. șt. med., prof. univ., referent

semnătura

Buzu Dumitru,

dr. șt. med., SCTO, Chișinău, Republica Moldova, referent

semnătura

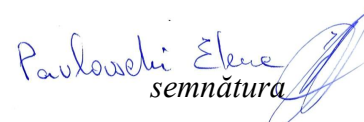
Puha Bogdan Florin,

dr. șt. med., conf. univ. UMF "Gr.T. Popa" Iași, România, referent

semnătura

Autor

Pavlovschi Elena

  
semnătura

© Pavlovschi Elena, 2026.

## CUPRINS

<b>LISTA DE ANEXE.....</b>	<b>4</b>
<b>LISTA ABREVIERILOR.....</b>	<b>5</b>
<b>LISTA DE FIGURI.....</b>	<b>6</b>
<b>LISTA DE TABELE.....</b>	<b>8</b>
<b>INTRODUCERE.....</b>	<b>9</b>
<b>1. DEFECTE OSOASE TUBULARE, TACTICI CONTEMPORANE DE TRATAMENT</b>	
1.1. Defect osos tubular segmentar- concepte actuale.....	15
1.2. Cascada fiziologică a regenerării țesutului osos.....	17
1.3. Tipuri de transplant osos.....	21
1.4. Alogrefa osoasă vascularizată - metodă de tratament experimental.....	27
1.5. Neoangiogeneza chirurgicală - metodă de tratament experimental.....	30
1.6. Dezavantajele metodelor existente și decelularizarea ca metodă de omitere a răspunsului imun gazdă.....	35
1.7. Procesul imun inflamator post-transplant. Etapele de rejet ale grefei.....	36
1.8. Sinteza capitolului 1 și sumarea abordării terapeutice a defectelelor osoase tubulare în datele literaturii de specialitate.....	39
<b>2. METODOLOGIE GENERALĂ DE CERCETARE.....</b>	<b>45</b>
2.1. Caracteristica generală a studiului: etapele și designul studiului.....	45
2.2 Metode de cercetare ale anatomiei vascularizării membrului posterior la NZWR. Recoltarea, conservarea și decelularizarea segmentelor diafizare cu pedicul vascular.....	46
2.2.1 Cercetarea macroscopică a vascularizației membrului posterior la NZWR.....	47
2.2.2 Cercetarea angiografică a vascularizației membrului posterior la animalul de laborator NZWR.....	47
2.2.3 Studiul morfologic al aortei dorsale, arterei iliace interne și al segmentelor osoase - femur la NZWR.....	48
2.2.4 Stabilirea lungimii grefei în corelație cu definiția unui defect osos critic.....	50
2.2.5 Conservarea și decelularizarea grefelor compozite (os+vas).....	51
2.3. Cercetarea posibilităților de anastomozare microchirurgicală și testarea <i>in-vivo</i> a pediculului vascular decelularizat al alogrefelor osoase compozite (os+vas).....	52

2.4 Stabilirea protocolului de anestezie și operator pentru aprecierea fezabilității plastiei defectelor osoase tubulare prin osteosinteza și includerea în circuitul vascular adoptiv al alogrefei osoase vascularizate decelularizate .....	55
2.4.1. Elaborarea și testarea in-vivo a protocolului de anestezie la animal de laborator mediu NZWR.....	55
2.4.2. Elaborarea și testarea <i>in-vivo</i> a protocolului intraoperator.....	57
2.4.3. Etapa postoperatorie .....	61
2.5. Studiarea manifestărilor postoperatorii locale și generale apărute la plasarea alogrefei osoase vascularizate în organismul adoptiv pe loturi de animale .....	61
2.6. Metode matematice de sinteză a rezultatelor cercetării experimentale .....	63
2.7. Limitările studiului experimental preclinic expus .....	64
<b>3. CERETAREA PREMISELOR PLASTIEI DEFECTELOR OSOASE TUBULARE CU ALOGREFE OSOASE VASCULARIZATE DECELULARIZATE .....</b>	<b>65</b>
3.1. Vascularizarea arterială a membrului posterior la animal de laborator mediu (NZWR).....	65
3.2. Lungimii alogrefei în corelație cu noțiunea de defect osos critic .....	67
3.3. Testarea <i>in-vivo</i> a pediculului vascular decelularizat prin metodă mixtă .....	69
3.4. Fezabilitatea plastiei defectelor osoase tubulare cu alogrefe osoase vascularizate decelularizate prin osteosinteza și includerea în circuitul vascular adoptiv la animal de laborator NZWR. ....	73
3.5. Testarea in-vivo a țesutului osos decelularizat prin plasticie cu grefe osoase vascularizate în organismul adoptiv pe loturi de animale de laborator.....	77
<b>DISCUȚII.....</b>	<b>96</b>
<b>CONCLUZII.....</b>	<b>105</b>
<b>RECOMANDĂRI .....</b>	<b>106</b>
<b>BIBLIOGRAFIE .....</b>	<b>108</b>
<b>LISTA PUBLICAȚIILOR LA TEMA TEZEI.....</b>	<b>126</b>
<b>DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII.....</b>	<b>131</b>
<b>ADNOTARE.....</b>	<b>132</b>
<b>SUMMARY .....</b>	<b>135</b>

## LISTA ANEXELOR

<b>ANEXA 1</b> - Analiza datelor literaturii de specialitate efectuată prin intermediul bazelor de date medicale Google Scholar, PubMed (Medline), Hinari cu stocarea a 653 de articole și rezumate în Paperpile-soft. ....	121
<b>ANEXA 2</b> - Cercetarea imagistică prin radiografie simplă în 2 proiecții AP și lateral a membrului posterior al animalului de laborator (NZWR) pe loturi de studii la 14-a zi și la a 28-a zi ostoperator .....	122
<b>ANEXA 3</b> - Acte de implementare a rezultatelor obținute.....	123
<b>ANEXA 4</b> - Certificate de inovație.....	124
<b>ANEXA 5</b> - Diplome și distincții.....	125

## LISTA ABREVIERILOR

DOC	Defecte osoase critice
NZWR	New Zealand white rabbit
CSD	Critical size defect
AuOV	Autogrefe osoase vascularizate
AIOV	Alogrefa osoasă vascularizată
AUF	Agence universitaire de la Francophonie
TA	Tensiune arterială
ECM	Matrice extracelulare
CEMEX	Centrul Avansat de Cercetare, Dezvoltare în Medicină Experimentală
BAV	Bucle arteriovenoase
SIEV	Segment fascial cu vasele superficiale epigastrice inferioare
BMPs-2, 7	Bone morphogenetic proteins
VEGF	Vascular endothelial growth factor
MiHAs	Minor histocompatibility antigens
TGF- $\beta$	Transforming growth factor $\beta$
IGF 1, 2	Insuline like growth factor
PDGF	Platelet-derived growth factor
FGFs	Fibroblast growth factors
BMPs	Bone morphogenetic proteins
VEGF	Vascular endothelial growth factor
HE	Hematoxină eozină
Ca	Calciu seric
P	Fosfor seric
ALP	Fosfataza alcalină
Ps	Puls periferic
Pa O <sub>2</sub>	Presiune parțială a oxigenului în sângele arterial
GaN	Nitrură de galiu
IHH	Indian hedgehog homolog
ARNm	Acid ribonucleic mesager
PBS	Phosphate-Buffered Saline
EDTA	Acidul etilendiaminotetraacetic

## LISTA DE FIGURI

Figura 1.	”Conceptul de diamant” al regenerării osoase.	20
Figura 2.	Alotransplant vascularizat al articulației genunchiului- studiu preclinic.	27
Figura 31.	Alogrefe osoase și articulare vascularizate - studiu clinic.	29
Figura 4.	Revascularizarea microchirurgicală a diafizei femurale la animal de laborator - iepure NZWR.	31
Figura 5.	Alogrefarea vascularizată a articulației genunchiului la animal de laborator.	32
Figura 6.	Alogrefarea vascularizată a articulației genunchiului la animal de laborator.	32
Figura 7.	Alogrefarea vascularizată a osului tibial la animal de laborator cu implantarea intramedulară a pachetului arterio-venos al gazdei-neoangiogeneza chirurgicală.	34
Figura 8.	Repartizarea surselor literaturii de specialitate după criteriile de selecție.	43
Figura 9.	Descrierea schematică a vascularizării arteriale a membrului posterior la animal de laborator NZWR	47
Figura 10.	Examinarea macroscopică a vascularizării membrului posterior	48
Figura 11.	Examinarea angiografică a vascularizării membrului posterior	49
Figura 12.	Examinare histologică a grefei compozite os+vas prin colorație HE	50
Figura 13.	Aspectul macroscopic al grefelor compozit (os+vas)	52
Figura 14.	Aspectul macroscopic al abordului chirurgical în triunghiului femural la animal de laborator - șobolani Wistar	53
Figura 15.	Aspectul macroscopic al abordului chirurgical în triunghiului femural la animal de laborator - șobolani Wistar	54
Figura 16.	Etapa preoperatorie.	56
Figura 17.	Abordul intermuscular lateral al coapsei	58
Figura 18.	Accesului medial al regiunii coapsei la animal de laborator iepure NZWR	60
Figura 19.	Examinare clinică, paraclinică și imagistică postoperatorie a animalelor de laborator pe loturi de studiu.	62
Figura 20.	Histograma cu curba normală și Box-plot cu valorile extreme ale variabilei Lungime femur.	68
Figura 21.	Examinare histologică a segmentelor de arteră decelularizată inclusă microchirurgical în circuitul vascular gazdă, colorație HE.	72
Figura 22.	Reprezentarea grafică a distribuției variabilei Durata intervenției chirurgicale (minute).	74
Figura 23.	Reprezentare grafică prin Boxplot – variabila Durata intervenției chirurgicale (minute).	76
Figura 24.	Reprezentarea grafică pentru distribuțiile variabilelor formulei leucocitare în ziua 14-a și 28-a de evaluare postgrefare pe loturi de studiu.	84
Figura 25.	Reprezentarea grafică a rezultatelor statistice semnificative pentru analiza generală a sângelui cu formula leucocitară ca indicatori ai procesului inflamator.	84
Figura 26.	Analiza biochimică a sângelui cu indicii osoși pe loturile de studiu.	86
Figura 27.	Reprezentarea grafică pentru distribuțiile variabilei - formarea de țesut osos ziua 14-a și 28-a.	89
Figura 28.	Rezultatele statistice semnificative pentru Radiografia membrului ziua 28-a	90

prin utilizarea sistemelor de scor standardizate ale System for *Evaluation of the Fracture Healing of Bone Defects on Radiography*.

Figura 29.	Examinare histologică Lot I- Autogrefă osoasă vascularizată.	93
Figura 30.	Examinare hitologică Lot II - Alogrefă osoasă vascularizată nativă.	93
Figura 31.	Examinare hitologică Lot III - Alogrefă osoasă vascularizată decelularizată	95
Figura 32	Cercetarea histologică a segmentului vascular decelularizat postoperator.	94

## LISTA DE TABELE

Tabelul 1	Criterii de selecție a cercetării surselor literaturii de specialitate.	43
Tabelul 2	<i>System for Evaluation of the Fracture Healing of Bone Defects on Radiography</i> - criteriile pentru aprecierea gradului de consolidare postgrefare a defectelor osoase tubulare.	63
Tabelul 3	Statistici descriptive pentru variabila - Lungime femur NZWR.	67
Tabelul 4	<i>One-Sample t-Test</i> - compararea mediei variabilei cu o valoare de referință - lungimea alogrefei osoase cu pedicul vascularizat.	68
Tabelul 5	Statistici descriptive pentru nouă variabile binare, măsurate în trei momente de timp (10 minute, 30 minute, 50 minute) ale examinării obiective <i>in-vivo</i> ale vasului decelularizat.	70
Tabelul 6	Indicatorii tendinței centrale ale variabilelor prestabilite ale protocolului anestezic și operator.	73
Tabelul 7	Evaluarea indicatorilor tendinței centrale ai variabilei Durata intervenției chirurgicale (minute)	74
Tabelul 8	Stabilirea corelației dintre variabilele Masa animalului, Durata intervenției și protocolul de anestezie abordat după procedura ANOVA unidirecțională.	75
Tabelul 9	Evaluarea impactului etapelor protocolului chirurgical asupra duratei totale ale intervenției prin procedura Anova unidirecțională.	77
Tabelul 10	Statistici descriptive ale variabilelor manifestărilor postoperatorii locale ale membrului operat.	78
Tabelul 11	Statisticile descriptive ale variabilelor funcționalității postoperatorii ale membrului operat.	79
Tabelul 12	Examinarea recuperării pe loturi a funcționalității membrului operat.	80
Tabelul 13	Valorile medii și deviațiile standard pentru parametrii Leucocite, Granulocite, Limfocite și Monocite.	81
Tabelul 14	Rezultatele valorilor tendinței centrale și ale distribuției pentru variabilele formulei leucocitare ca indicatori ai procesului inflamator pe loturile de studiu.	82
Tabelul 15	Analiza tendințelor centrale (media, mediana, modul) și a dispersiei (deviația standard, varianța) pentru valorile analizei biochimice a sângelui.	87
Tabelul 16	Rezultatele valorilor tendinței centrale și ale distribuției pentru variabilele analizei biochimice a sângelui ca indicatori ai procesului osteolitic pe loturile de studiu.	87
Tabelul 17	Rezultatele valorilor tendinței centrale și ale distribuției pentru variabilele de cercetate renhenologică pe loturile de studiu.	89

## INTRODUCERE

Utilizarea transplantului osos este o treaptă de succes în tratamentul unui număr mare de afecțiuni congenitale, degenerative, infecțioase, tumorale, traumatice și posttraumatice ale aparatului osteoarticular [1, 14, 17, 19]. Actualmente, există numeroase metode de transplant osos și substituenți utilizați pentru plastia defectelor, implementate ca metodă de bază, sau fiind combinate: transportul osos (Ilizarov), alotransplantul crioconservat, autotransplantul vascularizat, autogrefe nevascularizate, endoprotezarea și variante sintetice bioinerte sau bioactive [1, 3, 8, 13,78]. Defectele osoase critice (DOC), în mod deosebit cele circulare, localizate la nivelul diafizelor oaselor tubulare ale membrului pelvin, sunt o provocare serioasă pentru chirurgia contemporană reconstructivă a locomotorului [8, 15]. Autogrefa osoasă vascularizată este considerată de unii autori „standardul de aur” pentru proprietățile biologice ale osului transplantat care sunt păstrate integral [2, 4]. Alte studii susțin inexistența pentru moment, a unei soluții ideale în plastia acestor tipuri de defecte ale oaselor tubulare [5, 8, 14, 16].

Regenerarea osoasă este adecvată atunci când vascularizarea focarului de fractură (prin arterele intramedulare, vase periostale și metafizare) este optimă. *Arteria nutritia* joacă un rol major în consolidare pe tot parcursul procesului, inclusiv în consolidarea eventualelor pseudo-artroze [3]. Anastomoza microchirurgicală a pediculului alogrefei permite crearea condițiilor favorabile pentru o revascularizare adecvată soldată cu o consolidare bună, rezistență și rigiditate sporită a segmentului [21, 22]. Astfel, fiind demonstrat că grefele osoase vascularizate sunt net superioare, în special pentru reconstrucția defectelor critice ale oaselor tubulare, deoarece păstrează proprietatea de osteogeneză. Sursa de autogrefe vascularizate este limitată, deci se impune cercetarea alogrefelor vascularizate osoase [8, 9, 10, 16]. Interacțiunea celulelor sanguine imunocompetente cu endoteliul vascular al grefei reprezintă prima etapă din cascada ce induce ischemia. Dereglarea reperfuziei sanguine cu răspunsul imun de rejet al grefei este cauza principală în eșecul post-transplant [6, 7].

Imunosupresia marchează progresul în transplantologia contemporană [10, 12]. Transplantul membrelor, articulațiilor și al țesutului osos nu este similar transplantului de organe parenchimotoase, cum ar fi inima, ficatul etc. În cazul țesutului muscular și osteoarticular necesitatea de medicație imunosupresoare este de 2-3 ori mai mare decât în cazul transplantului de organ și necesită a fi de lungă durată, pentru a permite evitarea complicațiilor sistemice [9, 12]. Pe scară largă, imunosupresia pe termen lung, în cazul transplantului de țesut osos, nu este argumentată pe fon de riscul indus de toxicitatea organică, malignitate sau alte complicații sistemice. Astfel, devine nejustificată în aceste vital necritice situații [20, 21]. Drept compromis, ar fi imunosupresia de scurtă durată [9], sau găsirea căii de a o omite în etapa posttransplant cu țesut osos alogen vascularizat.

Studiile recente *in vivo* demonstrează pe șobolani [5], iepuri NZWR [20] și porcine [16, 17, 21] posibilitatea inducerii terapeutice a neoangiogenezei și a celei chirurgicale similare gazdei în alogrefa vascularizată, pe fond de imunosupresie de scurtă durată (2 săptămâni), cu rezultate bune pe termen lung după caracteristicile mecanice și funcționale ale osului reconstituit [1, 5, 16, 18, 20, 21]. Decelularizarea presupune îndepărtarea celulelor și a antigenelor imunogene asociate din alogrefa osoasă vascularizată prin agenți fizici, chimici și enzimatici, cu menținerea integrității matricei extracelulare (ECM), inclusiv arhitectura peretelui vascular [94]. Un alt avantaj important al acestei tehnici constă în păstrarea integrității canalului vascular, care îl face potrivit pentru repopularea celulară (recelularizare) și pentru asigurarea migrării celulare și proliferare în perioada postoperatorie [58, 59, 60]. Omiterea imunosupresiei, chiar și cea de scurtă durată, prin crearea alogrefei vascularizate osoase fără potențial imunogenic, ar permite emiterea unui algoritm standardizat pentru greșirea eficientă a defectelor osoase largi. Ar fi decelularizarea greșei una dintre soluții? Ar permite pediculul vascularizat decelularizat manipulații microchirurgicale? Ar rezista la fluxul sanguin pentru revascularizare și repopularea greșei cu celulele gazdei și obținerea tuturor proprietăților biologice ale osului? Urmează să studiem și să cercetăm.

Modalitatea de expunere a tezei a fost selectat conform tipului Tradițional Simplă. Fiind trasat următorul scop:

**Scopul:** cercetarea premiselor de plastie a defectelor osoase tubulare cu alogrefe compozite decelularizate incluse în circuitul vascular gazdă prin metodă experimentală *in vivo* pentru aprecierea fezabilității.

**Obiective:**

1.Cercetarea anatomică a vascularizării membrului posterior la animal de laborator (NZWR) și stabilirea segmentului osos tubular lung cu pedicul vascular optim.

2.Elaborarea și testarea procedurii de prelevare și conservare a segmentului osos tubular lung cu pedicul vascular optim pentru decelularizare și includere în circuitul sanguin gazdă.

3.Aprecierea fezabilității metodei de anestezie și operatorie pentru plastia ortotopică *in-vivo* a defectului osos tubular lung cu alogrefă vascularizată compozită decelularizată.

4.Cercetarea și testarea *in-vivo* a vaselor decelularizate prin metodă mixtă (compatibilă pentru greșele osoase integrale compozite: os +vas), pentru studierea rezistenței mecanice la sutura microchirurgicală, TA, undă de puls în circuitul gazdă.

5.Cercetarea prin testarea *in-vivo* a țesutului osos decelularizat prin metodă mixtă (compatibilă pentru greșele osoase integrale compozite - os +vas) și revascularizat prin studierea manifestărilor clinice și paraclinice ale plastiei defectelor osoase tubulare.

**Ipoteza de cercetare** - metoda proprie elaborată de preparare și testare *in-vivo* a alogrefelor compozite decelularizate este fezabilă pentru transplantare (plastia defectelor osoase tubulare) și prezintă o imunoreactivitate redusă.

**Sinteza metodologiei de cercetare și justificarea metodelor de cercetare alese:** Studiul a fost efectuat în perioada 2017-2024, în cadrul studiilor universitare ciclul III, prin doctorat în cadrul Școlii Doctorale în Domeniul Științe Medicale. **Etapele cercetării** au corespuns cu obiectivele enumerate mai sus:

1. Analiza datelor bibliografice efectuate prin intermediul bazelor de date medicale Google Scholar, PubMed (Medline), Hinari database cu cercetarea celor mai relevante și recente articole și publicații, pentru acumularea volumului informațional teoretic (2017-2023), stocarea lor (peste 600 de articole și rezumate) în Paperpile-soft - Anexa 1.

2. Cercetarea anatomiei și a vascularizării membrului posterior la NZWR. Cercetarea modalității de recoltare a segmentelor diafizare de femur cu păstrarea surselor vasculare optime și suficiente ale osului tubular lung (*a. nutricia*) - am efectuat această etapă în cadrul Blocului morfologic și Catedrei Anatomie topografică și chirurgie operatorie a USMF „N. Testemițanu”, 2017-2019.

3. Studiarea procedurii de conservare (la  $-84^{\circ}\text{C}$ ) și de decelularizare a segmentului osos tubular lung cu pedicul vascular optim, cu păstrarea continuității vasculare pentru includerea ulterioară în circuitul vascular adoptiv. Elaborarea protocolului de anestezie și a celui intraoperator pentru osteosinteza ortotopică a alogrefelor femurale vascularizate decelularizate - etapă efectuată în Laboratorul Inginerie Tisulară și Culturi Celulare al USMF „N. Testemițanu”, în cadrul proiectului de cercetare „Nanoarhitecturi în bază de GaN și matrici tridimensionale din materiale biologice pentru aplicații în microfluidică și inginerie tisulară” - 20.80009.5007.20 oferit de Agenția Națională de Cercetare Dezvoltare a Guvernului Republica Moldova, 2020-2022.

4. Cercetarea și testarea *in-vivo* a vaselor decelularizate prin metodă mixtă (compatibilă pentru grefele osoase integrale compozite: os +vas), pentru studierea rezistenței mecanice a vasului decelularizat la sutura microchirurgicală, TA, undă de puls în circuitul vascular gazdă. Etapă ce am efectuat-o în cadrul stagiului de cercetare doctorală în laboratorul de microchirurgie al Centrului Avansat de Cercetare - Dezvoltare în Medicină Experimentală Prof. Ostin C. Mungiu” al Universității de Medicină și Farmacie „Grigore T. Popa” Iași, România, prin intermediul bursei Agenției Universitare Francofone de cercetare doctorală „Eugen Ionescu”, 15.09.2021-15.02.2022.

5. Cercetarea prin testarea *in-vivo* a țesutului osos decelularizat prin metodă mixtă (compatibilă pentru grefele osoase integrale compozite - os +vas) și revascularizat prin studierea

manifestărilor clinice și paraclinice ale organismului gazdă la animale de laborator medii - NZWR, cu elaborarea unui set de recomandări pentru utilizarea alogrefelor osoase compozite decelularizate, în etapa preclinică de tratament a defectelor osoase tubulare - Laboratorul Inginerie Tisulară și Culturi Celulare și Catedra Ortopedie și Traumatologie a USMF „N. Testemițanu”, 2022-2023.

Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu”, fiind examinat la ședința din 21.05.2018, cu emiterea avizului favorabil nr. 75, și în cadrul Comisiei de etică a cercetării nr. 118/18.10.2021 a UMF „G.T.Popa” Iași, România, cu numărul de înregistrare 25807, din 19.10.2021. Autorizarea de proiect nr. 44/04.11.2021 a Direcției Sanitar Veterinară și Siguranța Alimentelor Iași, România.

Studiul chirurgical experimental pilot efectuat oferă informații preliminare valoroase preclinice, cu aprecierea fezabilității. Are limitări legate de eșantion și puterea statistică. Rezultatele trebuie validate ulterior într-un studiu preclinic extins, randomizat și controlat pentru a obține concluzii solide pentru etape clinice de testare a metodei de tratament.

**Inovația și originalitatea științifică a rezultatelor obținute:** Integrarea metodei de conservare și decelularizare a alogrefelor osoase vascularizate cu tehnicile microchirurgicale avansate de revascularizare, prin conectarea grefelor compozit la circuitul vascular al gazdei, permite obținerea unui alotransplant osos ce păstrează integral proprietățile biologice ale osului (osteoconductive, osteoinductive și osteogenice), cu o vascularizare din interior spre exterior, pentru o consolidare osoasă eficientă, cu o imunoreactivitate redusă.

În baza cercetărilor efectuate în cadrul tezei de doctor în științe medicale, au fost dispuse 2 cereri de Inovație cu obținerea certificatelor de inovator în următoarele instituții:- IP USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova

1. **Pavlovschi E.**, Stoian A., Nacu V., Verega Gr., „Alogrefele osoase vascularizate decelularizate ca metodă de tratament a defectelor osoase critice”. Certificat de inovație nr. 6052 din 16 mai 2023.

2. Stoian A., **Pavlovschi E.**, Verega Gr., Nacu V., ”Metodă de decelularizare pentru grefele osoase compozite vascularizate”. Certificat de inovație nr. 6058 din 24 mai 2023.

**Problemă științifică rezolvată:** Omiterea imunopresiei, chiar și cea de scurtă durată, prin crearea alogrefei vascularizate osoase cu potențial imunogenic redus, permite emiterea unui algoritm standardizat preclinic și ulterior clinic pentru plastia ortotopică cu alogrefe osoase vascularizate decelularizate a defectelor segmentare și critice ale osului tubular .

**Valoarea aplicativă a lucrării** - Lucrarea propune un algoritm complet de prelevare, conservare și plastie ortotopică a alogrefei osoase vascularizate decelularizate în condiții *in-vivo*. Analiza detaliată a rezultatelor experimentale *in-vivo*, clinice și paraclinice post-transplant,

obținute în studiul pilot realizat pe animale de laborator (șobolani Winstar, iepuri domestici NZWR), fundamentează validarea modelului experimental propriu. Această abordare deschide perspectiva extinderii către plastia defectelor osoase tubulare cu alogrefe osoase vascularizate decelularizate la animale mari, cu potențial de translatare în clinica umană, fără necesitatea imunosupresiei sau imunomodulației post-transplant.

**Implementarea rezultatelor cercetării:** Impactul practic al prezentului studiu este util la etapa preclinică prin descrierea unei tehnici inovatoare de tratament al defectelor osoase tubulare lungi în cadrul Laboratorului de Inginerie Tisulară și Cultură Celulară, departamentului Ortopedie și traumatologie al Universității de Stat de Medicină și Farmacie Nicolae Testemițanu, Chișinău, Republica Moldova. Rezultatele obținute (protocolul de prelevare, conservare și plastie osoasă ortotopică prin includerea în circuitul sangvin gazdă al alogrefei osoase vascularizate decelularizate) au fost prezentate în cadrul ședințelor Laboratorului de Inginerie tisulară și Culturi Celulare, Catedrei de Ortopedie și traumatologie. Rezultatele obținute au fost implementate și în cadrul proiectelor de cercetare:

1. „Nanoarhitecturi în bază de GaN și matrici tridimensionale din materiale biologice pentru aplicații în microfluidică și inginerie tisulară” - 20.80009.5007.20 oferit de Agenția Națională de Cercetare Dezvoltare a Guvernului Republica Moldova.

2. Proiect Bilateral: Grefoni osoși nanostructurați cu proprietăți predeterminate (2024-2026) (nr. 29ROMD din 20.05.2024) – Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare – Universitatea de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu” (Republica Moldova) și Centrul de Medicină Personalizată – Universitatea Națională de Știință și Tehnologie POLITEHNICA București, România.

Inovațiile la tema tezei care au fost implementate în cadrul procesului științifico-practic al IP USMF „Nicolae Testemițanu” din Republica Moldova:

1.”Alogrefele osoase vascularizate decelularizate ca metodă de tratament a defectelor osoase critice”, act de implementare nr. 82 din 16.05.2023

2.”Metodă de decelularizare pentru grefele osoase compozite vascularizate”, act de implementare nr. 88 din 24.05.2023.

**Materialele tezei au fost prezentate și discutate** în cadrul ședințelor comune ale Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare, Catedrei de Ortopedie și traumatologie - din 10.04.2025, proces verbal nr 9. La fel au fost discutate în cadrul ședinței Seminarului Științific de profil - 321 Medicină Generală, specialitățile: 321.19 Anesteziologie și terapie intensivă, 321.26 Urgențe Medicale, 321.18 Ortopedie și traumatologie, din 15.10.2025, proces verbal nr. 2, al Universității de Stat de Medicină și Farmacie Nicolae Testemițanu, Chișinău, Republica Moldova.

**Publicații pe tema de cercetare:** Materialele tezei au fost reflectate în 5 lucrări științifice publicate pe tema de cercetare, printre care: articole în reviste internaționale indexate în Web of Science – 2, articole în reviste din Registrul Național al revistelor de specialitate – 1, materiale/teze la conferințe internaționale (internațional conferințe) – 3, materiale/teze la conferințe internaționale (organizate în Republica Moldova) – 5, materiale/teze la conferințe (conferințe naționale) – 4. Rezultatele tezei au fost aprobate în cadrul ședințelor departamentului Ortopedie și traumatologie și al Laboratorului Inginerie tisulară și culturi celulare al Universității de Stat de Medicină și Farmacie Nicolae Testemițanu, Chișinău, Republica Moldova.

**Sumarul compartimentelor tezei:** Teza este perfectată conform tipului Tradițional simplă și este expusă pe 136 de pagini și include: Introducere, Capitolele I, II, III, Discuții, Concluzii generale și Recomandări, Bibliografia din 142 de titluri, 5 Anexe. În „*Introducere*” este argumentată actualitatea și necesitatea cercetării științifice, sunt reflectate datele despre managementul actual al defectelor osoase critice și perspective de viitor. Sunt descrise scopul și obiectivele tezei, noutatea științifică a rezultatelor obținute, importanța teoretică, valoarea aplicativă a tezei și aprobarea rezultatelor. În *Capitolul 1 – „Defecte osoase critice - tactici actuale”* sunt descrise detaliat metodele implementate descrise în literatura de specialitate pentru moment în tratamentul defectelor osoase tubulare lungi cât și cercetările efectuate în această direcție prin diverse tehnici și tactici inovatorii. Pentru a putea stabili vectorul cercetării au fost cecetate date din literatura de specialitate din peste 600 surse.

În *Capitolul 2 – „Metodologie generală de cercetare”* sunt descrise detaliat metodele de analiză statistice, cercetare a literaturii de specialitate, metodele de cercetare a anatomiei și vascularizației membrului posterior la NZWR și cele experimentale *in vivo* pe două specii de animale de laborator (șobolani Wistar și iepuri NZWR) aplicate în studiu.

În *Capitolul 3 – „Cercetarea premiselor plastiei defectelor osoase tubulare cu alogrefe osoase vasularizate decelularizate”* – sunt redate rezultatele studiului la fiecare etapă de cercetare cu ilustrarea datelor statistice și a celor radiologice și histologice.

În „*Discuții*” – reprezintă analiza, argumentarea și deliberarea rezultatelor studiului propriu, confruntate cu abordările și datele obținute de alți cercetători și expuse în literatura mondială.

În „*Concluzii generale*” - sunt descrise concluziile rezultatelor obținute la fiecare etapă de cercetare ce corespund cu obiectivele studiului trasate inițial. În „*Recomandări*” - au fost schițate un șie de recomandări pentru următoarele cercetări preclinice și clinice în domeniul plastiei defectelor osoase critice cu alogrefe osoase vascularizate decelularizate. *Bibliografia* este constituită din 142 de titluri, cu respectarea cerințelor înaintate.

**Cuvinte Cheie:** defect osos tubular, experiment *in-vivo*, alogrefe osoase vascularizate, decelularizare, anastomoză microchirurgicală, animale de laborator.

# 1. DEFECTE OSOASE TUBULARE - TACTICI CONTEMPORANE DE TRATAMENT

## 1.1. Defectul osos tubular segmentar - concepte actuale

Defectele osoase tubulare sau cele ale oaselor tubulare lungi sunt adesea critice și cuprind entități complexe, etiologic rezultate dintr-o varietate de condiții patologice. Fiind o condiție extremă în vindecarea osoasă - tratamentul acestora este de lungă durată, dureros și incert. De obicei, este marcat de o serie de consecințe pentru pacient, variind de la psihologice la socioeconomice. Defectele osoase critice, în mod deosebit cele circulare, localizate la nivelul diafizelor membrului pelvin, sunt o provocare serioasă pentru chirurgia contemporană reconstructivă a locomotorului [6, 26, 70]. Etiologic, sunt datorate diversilor factori: traumatisme, osteomielite, intervenții chirurgicale de revizuire și rezecție tumorală sau în tratamentul deformațiilor congenitale. Acestea sunt principalele cauze ale deficienței structurale osoase masive [132].

Noțiunea de *Defect osos critic (masiv)* (DOC) - include defectul osos segmental spongios sau/și cortical, cu o dimensiune critică – *critical size defect* (CSD), acesta fiind prea mare în dimensiune și nu se va vindeca numai prin procese intrinseci fiziologice. Defectele osoase ce nu pot fi spontan regenerate în timpul vieții unui pacient, în general, sunt acceptate ca fiind de  $\geq 1,5$  -2 ori mai mari decât diametrul diafizar al osului lung, circumferențiar  $\geq 50\%$  sau pe o suprafață  $\geq 2 \text{ cm}^2$ , dar cifrele pot varia în funcție de os și pacient [28].

Mărimea lor critică depășește capacitatea intrinsecă de auto-regenerare și, în consecință, vindecarea oaselor tubulare este perturbată și insuficientă [27, 29, 30]. S-a demonstrat că pierderea osoasă extinsă în acest tip de defect afectează în mod direct revascularizarea și diferențierea țesuturilor și, în cele din urmă, duce la fracturi care progresează spre neconsolidare fără intervenții chirurgicale.

Definiția clasică a unui defect osos tubular segmentar de dimensiuni critice este „cel mai mic defect osos dintr-un anumit os și specie de animal care nu se va vindeca spontan în timpul vieții organismului” sau „prezentă mai puțin de 10% din regenerarea osoasă în timpul vieții”. Dimensiunea defectului nu este singurul parametru pentru a caracteriza un defect osos ca fiind critic; s-a constatat că la majoritatea speciilor, o lungime care depășește de 2-2,5 ori diametrul osului afectat poate fi considerată dimensiunea critică [28, 132, 133].

Ne-consolidarea osoasă cauzată de astfel de defecte influențează în mare măsură calitatea vieții pacienților din cauza costurilor și perioadelor prelungite postoperatorii ale tratamentului și, de asemenea, reprezintă o provocare majoră chirurgicală, socio-economică și de cercetare.

Utilizarea transplantului osos este o treaptă de succes în tratamentul defectelor osoase tubulare de dimensiuni necritice, grefa osoasă fiind tratamentul de elecție. Aceste defecte apar

după afecțiuni congenitale, degenerative, infecțioase, tumorale, traumatice și posttraumatice ale aparatului osteoarticular [1, 9, 27, 31, 32, 78].

În prezent, există o varietate de tehnici de grefare osoasă și substituenți utilizați pentru plastia defectelor, implementate fie ca metodă fundamentală, fie în combinații sinergice, incluzând membranele bioactive, proteinele osteogene, tehnici de inginerie tisulară, transportul osos - Ilizarov, alotransplantul osos crioconservat, autotransplantul vascularizat, autogrefele nevascularizate, endoprotezarea, precum și variantele sintetice bioinerte sau bioactive. Cu toate acestea, aceste intervenții devin insuficiente atunci când defectul osos postrezețional sau posttraumatic este de dimensiune critică [1, 3, 8, 13, 23, 70].

Scenariile ortopedice contemporane referitoare la defectele osoase segmentare majore, descrise prin intermediul intervențiilor chirurgicale, împreună cu tehnicile de grefare osoasă, sunt de obicei indispensabile în procesul terapeutic. Deși apariția diverselor substituenți osoși sintetici oferă o gamă variată de opțiuni, rezultatul tratamentului rămâne, în continuare, incomparabil cu abordarea grefei osoase autogene în ceea ce privește calitatea și eficiența timpului de vindecare osoasă [134].

Tratamentul DOC a fost studiat detaliat în ultimii 35 de ani. Autogrefarea osoasă vascularizată, cât și osteogeneza prin tehnica distracției osoase Ilizarov au fost etichetate ca "standard de aur" în cazul acestor defecte. Autogrefarea osoasă nevascularizată și cea vascularizată este considerată de unii autori „standardul de aur” în plastia defectelor osoase mici, pentru proprietățile biologice păstrate integral ale grefei [4, 6]. În chirurgia ortopedică reconstructivă o grefă proaspătă de os spongios autolog bogată hematopoietic prin conținut de măduvă osoasă este în general considerată cel mai eficient transplant osos. Cu toate acestea, aplicarea clinică a unor astfel de grefe este adesea limitată cantitativ. O metodă mai bună ar fi utilizarea altor surse disponibile, cum ar fi materiale de origine sintetică, ori biologică. În ceea ce privește varianta din urmă, progresul înregistrat în ultimii ani în transplantul de os a fost legat în mare parte de disponibilitatea alogrefelor osoase liofilizate în bănci de țesuturi bine organizate. Atunci când se impune un defect osos critic, se acceptă inexistența pentru moment, a unei soluții ideale în plastia osoasă, pe fond de limitare cantitativă a materialului grefat și a morbidității locusului donator [7, 8, 14, 16, 69].

Când se evaluează pierderea osoasă critică, este important să se determine dacă este necesară o intervenție chirurgicală suplimentară după stabilizarea scheletului. Acest lucru ar trebui să se bazeze pe locația leziunii, vascularizarea în acea regiune și dimensiunea defectului. Pentru defecte la scară mare, există două tehnici majore. Alegerea dintre acestea ar trebui să se bazeze pe leziunea țesuturilor moi asociate, factorii pacientului, vascularizația locală și

posibilitatea de infecție reziduală. Tehnici noi au apărut în ultimii 10 ani, oferind noi perspective managementului acestei probleme [68, 70].

Terapiile de inginerie tisulară oferă aplicarea diferitelor tipuri de materiale și schele combinate cu celule. Supuse proceselor de inginerie tisulară permit crearea bio-schelelor care vor îmbunătăți sau înlocui funcțiile biologice ale țesutului osos. Dezavantajul major în aplicarea standard a acestor terapii pentru defectele osoase de dimensiune critică este incapacitatea de a furniza o aprovizionare vasculară durabilă a bio-schelelor create [71]. Astfel, reconstrucția scheletică a defectelor osoase mari este o provocare semnificativă pentru chirurgia reconstructivă. Metodele contemporane care sunt utilizate în aceste tipuri de defecte osoase au un nivel ridicat de morbiditate și complicații, rata de eșec pe termen lung fiind de aproximativ 60% [72]. Regenerarea structurală a leziunilor osoase mari, cu păstrarea funcțională a membrului, reprezintă o dilemă terapeutică de tactică pentru chirurgia reconstructivă a locomotorului, neexistând un tratament standardizat pentru toate tipurile de defecte critice osoase. Tratamentul se bazează pe o multitudine de factori clinici, inclusiv dimensiunea defectului, comorbiditățile pacientului, leziunile țesuturilor moi și starea de vascularizare [5, 8, 14, 16].

## **1.2. Cascada fiziologică a regenerării țesutului osos**

Pentru a defini cerințele impuse de procesele fiziologice în consolidarea osoasă în cazul defectelor osoase tubulare critice, este necesar de a cerceta cascada fiziologică a regenerării osoase, proprietățile biologice ale osului și metodele actuale de tratament.

Regenerarea osoasă reprezintă un proces fiziologic bine orchestrat, cu componente osteoconductive și osteoinductive, factori celulari intrinseci și extrinseci, căi moleculare extracelulare de reglare a procesului de optimizare a funcționalității celulelor osoase și capacitățile de regenerare ca parte de remodelare a osului adult pe tot parcursul vieții [34, 35, 36].

Astfel, odată format, țesutul osos este menținut dinamic prin două procese diferite: modelare și remodelare, care sunt, de asemenea, folosite în recuperarea fracturilor osoase. În procesul de modelare osoasă, osul nou se formează fără resorbție osoasă prealabilă, în timp ce în procesul de remodelare osoasă (formarea osului urmează resorbției osoase). Modelarea osului este viguroasă în timpul creșterii, modificând forma și dimensiunea osului. Ea continuă la vârsta adultă, prin creșterea capacității de a rezista la îndoire și de a se adapta la provocările funcționale mecanice. Remodelarea osoasă este un proces ce derulează tot parcursul vieții, care începe la începutul perioadei fetale și este responsabilă de menținerea funcției osoase prin înlocuirea continuă a osului deteriorat cu țesut osos nou. Se raportează aproximativ 25% din osul trabecular și 3% din osul cortical sunt îndepărtate și înlocuite în fiecare an [132].

În practica clinică, cel mai important moment din activitatea tisulară osoasă este consolidarea fracturilor, cu osificarea encondrală și intramembranoasă. Dacă e să comparăm cu leziunile altor țesuturi, cel osos, în cazul fracturilor, se restabilește cu resursele preexistente, iar țesutul osos nou format este identic cu țesutul vecin sănătos [36]. Dar, situațiile în care vascularizarea este insuficientă, lezarea masivă a periostului, imobilizarea inadecvată, infectarea regiunii lezate, prezența deficitului mineral și de vitamine, maladii metabolice ș.a. - capacitățile intrinseci de regenerare ale țesutului osos devin insuficiente [22, 34]. Regenerarea țesutului osos după lezare (fracturi), după McKibber B., în mod fiziologic decurge sub formă de 6 etape [35]:

**1. Impactul:** O perioada scurtă de timp în care are loc momentul de aplicare a energiei cinetice, în cazul fracturilor cu defect osos vast, fiind de valori ridicate. Imediat după impact, are loc lezarea arterelor intramedulare, vaselor periostale și metafizare, cu formare de hematom, iar mediatorii inflamației încep migrarea spre focar [35, 37]. Celulele osteogene -osteoblastele, fiind originare din țesutul osos vecin, din cele mezenchimale sau din transplantul osos (tipic pentru autotransplant), contribuie la creșterea și formarea noii structuri osoase în paralel cu fenomenele de osteoconducție și osteoinducție.

Altfel zis, capacitatea de autoregenerare prin producerea de țesut osos nou formează proprietățile osteogenice ale grefei [2, 42].

**2. Inducția:** etapă relativ scurtă (din primele minute până la câteva ore) din procesul de consolidare osoasă și implică procesele biologice ce induc regenerarea țesutului osos:

- Osteoinducția: prevede stimularea celulelor osteoprogenitoare pentru diferențierea acestora în osteoblaste, care, la rândul lor, vor da naștere unui nou os prin eliberarea și concentrarea proteinelor morfogenetice și a factorilor de creștere [2, 35, 38]. Există factori proteici prezenți în spațiul extracelular din țesutul osos care reglează activitatea celulară prin acțiunea lor asupra receptorilor celulari, astfel coordonând cu procesele intracelulare. Receptorii influențează o proteină de tip chinazic ce induce transcrierea ARNm care codează proteine specifice cu acțiune intra- și extracelulară, iar rezultatul este controlul asupra procesului de producere și resorbție osoasă [39]. La moment, sunt descriși unii dintre factorii decisivi, fiind izolați și cercetați, unii sintetizați, fapt ce a permis utilizarea acestora în procesul de transplant osos, în special cu substituenți sintetici:

- TGF  $\beta$  (transforming growth factor)
- IGF I, II (insuline like growth factor)
- PDGF (platelet growth factor)
- FGFs (fibroblast growth factors)
- BMPs (bone morphogenetic proteins).

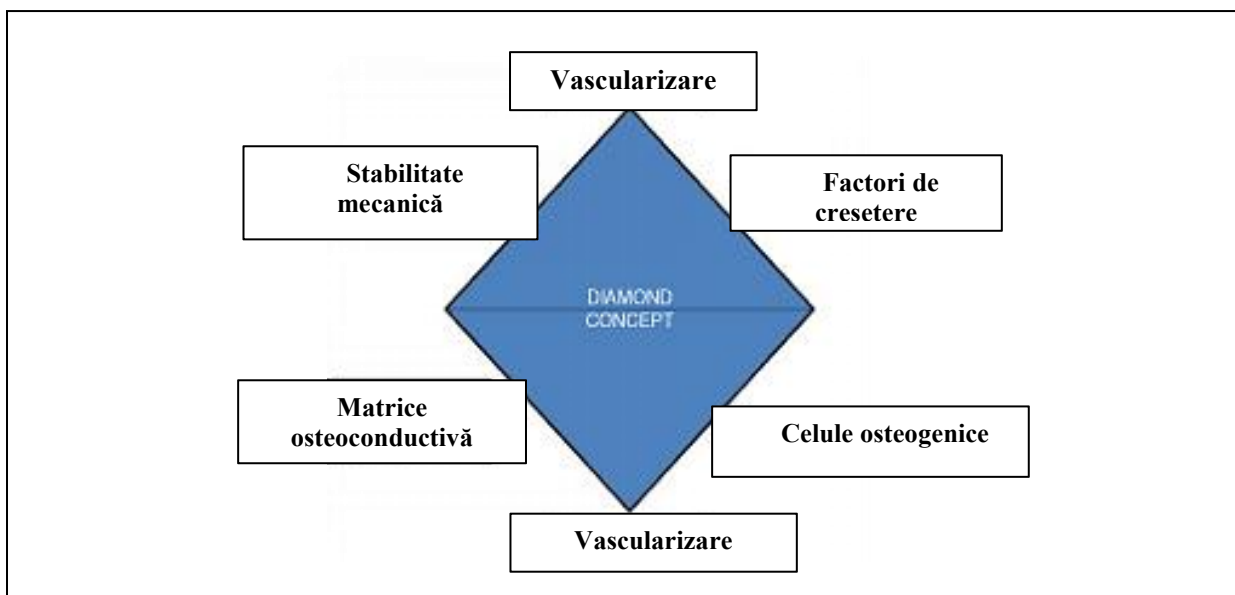
Cercetătorul Urist, în 1965 a demonstrat prezența proteinelor cu masă moleculară mică ce pot fi extrase din matricea osoasă demineralizată și care au o activitate osteogenică enormă. Acestea au fost numite Proteine Morfogenetice Osoase (BMPs), ele aparțin unei familii de proteine numite factori de transformare și creștere  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), aceștia din urmă fiind responsabili de inducerea diferențierii și creșterii celulare. Cele mai active forme, care au o activitate osteoinductivă majoră sunt BMP2 și BMP7. Însă costul ridicat al implicării în practică al acestor 2 proteine restricționează utilizarea lor [34, 38, 40].

**3. Inflamația:** Debutează pe parcursul primelor 3 zile de la impact, cu formarea hematomului și continue până la formarea calusului moale. Răspunsul inflamator se extinde departe de focarul fracturii, caracterizându-se prin edem, vasodilatație și transsudat osos [35]. Energia cinetică mare, în cazul leziunilor osoase vaste, distruge una sau mai multe surse de vascularizare, cu formarea hematomului cu rolul său deosebit în procesul de consolidare osoasă [37]. Celulele mezenchimale din hematom se activează și consecutiv, suferă câteva mitoze soldate cu formarea de monocite și macrofagi, care, la rândul lor, se transformă în două serii de celule. Osteoclastele induc resorbția țesutului osos devitalizat. Osteoblastele formează osteoidul (R. Leriche, A. Policard, 1926), care se transformă în osteocite ce rămân încorporate în țesutul osos [35]. Nivelul PaO<sub>2</sub> din țesuturile vecine influențează procesul de consolidare. Celulele osteoprogenitoare posedă o activitate mai mare, cu o formare de țesut osos primar, în ariile cu PaO<sub>2</sub> ridicată și fără tensiune (ce se obține prin imobilizare stabilă). În regiunile cu o PaO<sub>2</sub> scăzută și o fixare mecanică precară are loc formarea de calos osteocartilaginos, prin punți ce unesc segmentele de fractură. Aceste punți au rolul de a reduce mobilitatea segmentelor fracturii și a spori consolidarea. Această variantă crește riscul de pseudartroze. Fixarea mecanică a fracturilor însă este necesar de a fi stabilă inițial, iar după instalarea consolidării osoase secundare-relativă, altfel apare riscul de pseudartroze fibroase. Trebuie, la fel, de reținut, că fixarea grosolană omite vascularizarea periostală.

Cercetările efectuate asupra celulelor stem mezenchimale și gradul de stabilitate al fracturii indică faptul că în cazul celor fixate nesatisfăcător prevalează Indian hedgehog homolog (IHH), ce regulează fiziologic maturarea condrocitelor în etapa fetală și postnatală de osteogeneză.

Astfel devine argumentat „Conceptul de diamant” al regenerării osoase, care include o prezență obligatorie adecvată a:

- Stabilității mecanice,
- Vascularizației,
- Matricei osteoconductive,
- Factorilor de creștere
- Celulelor osteogenice - figura 1 [34, 35, 37, 38].



**Figura 1. "Conceptul de diamant" al regenerării osoase.**

4. **Calusul moale** reprezintă osteoidul format, cartilajul și fibrele de colagen ce prezintă suportul mecanic pentru ulterioara formare a calusului dur. Noile vase sanguine se dezvoltă în interior, în cazul unei  $PaO_2$  scăzute și a unui pH acid. Calciul pentru osificarea calusului moale parvine pe cale sangvină din sistemul osos și din vecinătatea focarului de fractură.

5. **Calusul dur** - Se instalează, în mod normal, la 3-4 săptămâni de la impact și continue până la unirea fermă a fragmentelor de fractură. Osteoidul este calcificat prin depunerea de cristale de hidroxiapatită și sunt convertite în lamele osoase. Osificarea cartilajului formează suport pentru osteoblaste și premise pentru mineralizarea matricei osoase, altfel zis – **Osteoconducția.**

*Din aceste considerente, orice material de transplant osos trebuie să posede proprietatea de osteoconducție.*

6. **Consolidare și remodelare.** La finele acestei etape, fractura se consideră vindecată, prin osificarea encondrală și formare de țesut osos lamelar nestructurat. Stabilitatea mecanică a osteosintezei este monitorizată de medic și are un impact semnificativ în consolidarea osoasă, care este cheia pentru minimizarea complicațiilor pseudoartrozice, iar substituentul grefat este ales în dependență de factorii induși de pacient și cei chirurgicali [35, 37, 38].

*Remodelarea* este un proces de lungă durată caracterizat prin remodelarea țesutului osos lamelar nestructurat în unul lamelar haversian. Debutază după 6 săptămâni de la impact și poate dura câteva luni sau ani. Are loc nu numai reformarea de țesut osos lamelar haversian, dar și reconstrucția canalului medular și restabilirea dimensiunilor osului [35].

Procesul de restabilire structurală al defectelor osoase tubulare critice devine diferit de cel fiziologic. Mecanismele și resursele intrinseci de regenerare devin insuficiente. Biologia

reparatorie a țesutului osos descrie capacitățile fiziologice ale țesutului osos, extrem de importante în mecanismul de consolidare. Acestea sunt imperative în grefa utilizată pentru plastia osoasă postransplant:

- **Osteoconducția** - capacitatea de a sprijini atașarea osteoblastelor și a celulelor osteoprogenitoare, de a permite migrarea și creșterea interioră în arhitectura tridimensională a grefei a acestor celule.

- **Osteoinducția** - capacitatea de a induce celulele primitive, nediferențiate și pluripotente să se dezvolte în linia celulară formatoare de os - osteoblaste, prin care este indusă osteogeneza.

- **Osteogeneza** - osteodiferențierea și, ulterior, formarea de țesut osos nou de către celulele donatoare derivate ale gazdei, fie din grefele utilizate.

- **Osteointegrarea**- capacitatea de ancorare a unui implant cu formarea de țesut osos în jurul implantului la interfața os-grefă, fără formarea de țesut fibros. Un criteriu important în evaluarea rezultatului vindecării osoase [133, 134].

Necesitatea de a cerceta noi metode reconstructive cu o capacitate plastică sporită este impusă de incapacitatea de reglementa actualmente o reconstrucție osoasă efectivă în cazul defectelor osoase de dimensiuni mari. Istoric aceste defecte fiind soldate cu amputări de segmente și ficționalitate diminuată cu o calitate a vieții marcat scăzută ulterior.

Lezarea țesuturilor moi este factorul major de afectare a consolidării osoase. La moment dereglările de vascularizare ale segmentului osos lezat sunt apreciate drept cauză principală în morbiditatea sporită ulterioară (ischemie, necroze, infecție, pseudartroze, ș.a) [7, 37]. Pentru a spori consolidarea osoasă este necesară o vascularizare și stabilitate mecanică adecvată, asigurate de un țesut osos viu vascularizat sunt momentele cheie ce induc o regenerare primară și o remodelare ulterioară a structurilor osoase [13, 33].

Tradițional utilizate sunt alografele nevascularizate cu un rezultat satisfăcător în cazurile leziunilor osoase necomplexe [42]. Dar, nici o metodă terapeutică și chirurgicală existentă pentru moment nu oferă o soluție ideală în defectele osoase tubulare largi [1, 7, 10, 13, 14, 19, 20].

### **1.3. Tipuri de transplant osos**

Primul țesut transplantat cu succes a fost cel osos [2]. Istoric, monitorizăm tendințele cauzei cercetate. Conform datelor oferite de Bolano și al. în 1880 a fost efectuată prima alogrefare de țesut osos. Ulterior, Lexer raportează 23 de alogrefări osteocartilaginoase pentru perioada 1908-1925 [4]. Conceptul de transplant osos vascularizat a fost raportat primar de Huntigton în 1905, când fibula pe pedicul a fost utilizată pentru restructurarea defectului osos masiv [5].

În 1975 Tylor și al. [42], Ueba și Fujikawa [22], ulterior, în 1988 Capanna R. și al. au efectuat primele autogrefe microchirurgicale ale fibulei cu pedicul vascular liber, pentru

restabilirea defectului osos traumatic și pseudoartrozic masiv, soldat în urma utilizării alogrefării osoase. Capanna R. și al. au hotărât să cerceteze metoda dată pentru a publica primar tehnica reconstructivă în 1993 [43]. Aceasta fiind prima etapă în combinarea tehnicilor de corecție a defectelor osoase critice, dar studiile au continuat.

Metodele actuale sunt încă însoțite adesea de necesitatea terapiei de imunosupresie, susținere, durere și risc înalt de infecție, hemoragie și pierderea funcției segmentului. Dezvoltarea unei noi opțiuni terapeutice - invazive pentru restructurarea osoasă a defectelor osoase tubulare vaste și prevenirea pseudartrozelor rămâne actuală [34, 14, 39, 44]. Grefa osoasă și substituenții țesutului osos sunt indispensabili în chirurgia aparatului locomotor în cazul DOC, din mai multe considerente. Actualmente sunt utilizate metode variate de grefă osoasă precum și de substituenți, în cazurile urgente pentru reconstrucția fracturilor și sau consolidarea celor periarticulare și în stările subacute pentru modelarea sechelelor (pseudartroze, defecte postrezeționale de țesut osos). Cel mai des transplant osos utilizat în lume și în Republica Moldova este - alogrefa osoasă, în defecte posttraumatice, postrezeționale tumorale, infecțioase, pseudoartrozice, ș.a. [37, 45]. Însă nu există o grefă osoasă universală, astfel că orice transplant osos este necesar de a fi ajustat pentru *locuss*-ul dat și mecanic suficient pentru tipul defectului [37].

Cele mai actuale și des utilizate tipuri de grefe și substituenți osoși, în reconstrucția defectelor osoase, sunt [7, 35, 37, 45, 46]:

**1. Substituenți osoși ortobiologici-** elaborați drept o alternativă a metodelor de auto- și alogrefe osoase. Sunt compuse din carcase și constituenți biologici sau sintetici ce sporesc migrarea, proliferarea și diferențierea celulelor osoase pentru regenerare și consolidare. Dar, nu există încă substituent osos heterolog sau sintetic ce ar avea proprietăți mecanice sau biologice superioare sau similare osului [36]. Din acestea fac parte:

- Grefă celulară antologă din măduva osoasă
- Concentratul trombocitar
- Vascular endothelial growth factor -VEGF
- Alogrefe osoasă celulare cu conținut de celule stem mezenchimele
- Platelet-derived growth factor -PDGF
- Proteina morfogenetica osoasă
- Țesuturi fetale sau țesut placentar
- Tehnica Masquelet, format din două etape, și e bazată pe membrane biologice ce sunt introduse după aplicarea de ciment distanțier (etapa I) cu crearea de cameră pentru alografă osoasă (etapa II), ș.a.

**2. Endoprotezare și/sau artroplastia articulațiilor mari (genunchi, șold, umăr) -** constituie o adevărată revoluție în istoricul chirurgiei reconstructive a locomotorului, soluționând obiectivele demult căutate atât de ortopezi, cât și de pacienți. Ameliorarea sau restabilirea mobilității și stabilității articulare, înlăturarea durerilor și îmbunătățirea calității de viață a pacientului au fost scopurile atinse. Actualmente, fiind una dintre intervențiile de elecție în tratamentul maladiilor degenerativ-distrofice avansate și ale traumatismelor majore ale articulațiilor mari (șold, genunchi, umăr). Înregistrând rezultate spectaculoase imediate, cu recuperare socio-profesională în termen scurt, aceasta este foarte solicitată de către pacienți. În țările economic dezvoltate, dintr-o mie de adulți, unul este endoprotezat; frecvența acestei operații crește din an în an, anual în lume implantându-se peste un milion de proteze. Sunt endoprotezări parțiale ale articulației genunchiului; în cazurile avansate, când intervențiile chirurgicale paliative sunt depășite, este indicată endoprotezarea totală. Scopul acestei intervenții este de a elimina durerea și disconfortul din articulația bolnavă, de a îmbunătăți funcția membrului afectat și de a readuce pacientul la un nivel de viață cât mai bun [123]. Aceste intervenții avansate au limitări, sunt dificil de efectuat atunci când avem un aparat extensor lezat (ligamentul patelar, os patelar, tendoanele *m. cvadriceps*), cazurile fiind soldate cu artrodeze și scăderea accentuată a calității vieții [5].

**3. Autogrefa osoasă:** există două tipuri de autogrefe osoase:

- Autogrefă simplă sau nevascularizată: prezintă grefarea țesutului osos autolog din diverse surse (crista iliacă, tuberozitatea tibiei, ș.a.) pentru defecte mici, de până la 6 cm. Defectele osoase vaste necesită un transplant osos vascularizat [7, 12]. Integrarea grefei autogene este similară lanțului histologic urmărit în procesul consolidării unei fracturi simple [2].

- Autogrefă vascularizată: care poate fi liberă și pe pedicul (autogrefe osoase vascularizate - AuOV), însoțite sau nu de țesut moale, se mai numesc grefe compozite. Transplantul țesutului osos autolog pe pedicul vascular oferă o alternativă de succes în tratamentul defectelor posttraumatice sau a celor postrezeccionale. AuOV mențin viabilitatea celulară prin păstrarea circulației sangvine endostale (primare) și periostale. Comparativ cu autogrefa osoasă simplă, AuOV participă activ în regenerarea osoasă, sporind timpul și procentajul de consolidare osoasă, procesul decurgând similar cu cascada fiziologică a regenerării osoase [42, 47].

Cele mai utilizate AuOV sunt [12, 36, 42, 48]:

- Crista iliacă vascularizată cu artera circumflexă iliacă profundă – pentru defecte osoase de aproximativ 4 cm;

- Porțiunea distală a radiusului (cu artera radială), a humerusului (artera radială colaterală posterioară) fiind limitate în dimensiuni, și nerespectând principiul ortotopic, din cauza riscului de fracturi postransplant, sunt utilizate pentru defecte mici ale metacarpului.

- Partea laterală a scapulei cu vasele circumflexe scapulare: reconstrucții de defecte mici ale membrului superior și inferior, dar insuficiente în reconstrucția oaselor tubulare lungi.

- Segmentul corcoto-periostal vascularizat al condilului femural medial cu artera descendentă a genunchiului: oferă o cantitate mică de os cortical și nu poate fi utilizată în reconstrucția defectelor osoase lungi.

Toate aceste surse sunt insuficiente în reconstrucția defectelor osoase lungi. Fibula este superioară în aceste situații. Actualmente, reconstrucția microchirurgicală cu AuOV fibulare libere este un instrument important pentru chirurgia ortopedică. Studiile suplimentare denotă superioritatea grefelor microchirurgical revascularizate comparativ cu auto- și alogrefele osoase simple, prin timp de consolidare micșorat, stabilitate mecanică și rezistență posttransplant sporită [7, 42, 22, 49].

Acest tip de grefe are o tot mai largă utilizare în chirurgia plastică reconstructivă a aparatului osteomuscular din întreaga lume și lambourile perforante. Utilizarea în practica clinică a acestora trebuie privită ca o perfecționare a abilității chirurgilor de a transfera țesuturi vascularizate din unele regiuni anatomice ale corpului în altele. Spectrul lambourilor perforante se bazează pe lucrul de pionierat al unor cercetători și acestea au evoluat ca o variantă preferențială a lambourilor musculocutanate și fascio-cutanate, fiind foarte populare în anii '90 ai secolului XX.

Astfel, P. N. Blondeel și coaut. propun, în anul 2003 o clasificare, în care diferențiază 5 tipuri de lambouri perforante:

- directe, care perforază doar fascia profundă;
- musculare indirecte, ce alimentează predominant țesuturile subcutanate;
- musculare indirecte, care alimentează predominant mușchiul, dar au ramuri secundare care vascularizează țesutul subcutanat;
- perimisiale indirecte, ce își au cursul în cadrul perimisiului între fibrele musculare înainte de a perfora fascia profundă;
- septale indirecte, acestea își au cursul prin septurile intermusculare înainte de a perfora fascia profundă.

Astfel, P.N.Blondeel definește drept lambou perforant un lambou care constă din piele și/sau țesut subcutanat, iar vasele care alimentează acest lambou sunt vase perforante izolate. Aceste perforante pot trece prin sau între țesuturile profunde (în special mușchi). Tehnica ideală de reconstrucție atât pentru defectele simple, cât și pentru cele complexe, trebuie să satisfacă următoarele cerințe: reconstrucția cu țesuturi *like-to-like*; morbiditatea minimă a locului donator; păstrarea trunchiurilor vasculare principale; timp operator și spitalicesc redus [124, 125].

În cazul DOC, cel mai frecvent fiind utilizată fibula (cu vasele peroneale) [49], ce oferă sursă peste 26 cm lungime de grefă. Pentru reconstrucția oaselor antebrațului [42] și a tibiei [43] fiind satisfăcătoare din punct de vedere ortotopic. Însă structural și mecanic ar fi insuficientă pentru reconstrucția femurului diafizar [49]. Este utilizată în reconstrucția capului femural [2,7], dar ca dimensiune și stabilitate mecanică este adecvată pentru ulnă și radius. Sunt studii care prezintă metodologia de succes a utilizării AuOV fibulare pentru reconstrucția antebrațului, fiind o grefă excelentă ca mărime pentru ambele oase - radius și ulnă [7, 42, 49].

Pentru defectele osoase mici, AuOV este considerată „standard de aur”, deoarece posedă capacități osteogenice, osteoconductive și osteoinductive. Dar în contextul defectelor mari de țesut osos ale oaselor tubulare lungi, se impun dezavantajele acesteia, prin limitarea cantitativă, morbiditatea locului donator și implicarea proceselor infecțioase. Unele studii indică sindromul algic moderat-sever al locului donator în >8,8% după prelevarea autogrefei osoase  $\geq 20$ mm, pentru cel puțin un an postoperator [2, 36, 46].

Unele dintre cauzele sindromului algic și ale morbidității locusului donator pot fi: leziunile neuro-vasculare, instabilitățile articulare, hematoamele, infecțiile, herniile ș.a. [22]. Astfel, se impun restricții de recoltare. Spre exemplu, în reconstrucția defectelor osoase mari, grefa fibulară este necesar de a fi cu 6 cm mai lungă, iar osteotomia distală a fibulei este aproape de articulația talocrurală. Pentru a evita instabilitatea și devierea de valg a gleznei, spațiul tibio-fibular se fixează cu un fragment osos intercalat și șurub [43].

Sursele limitate de autogrefe osoase și morbiditatea locusului donator impun cercetarea metodelor de alogrefare osoasă vascularizată [2, 9].

#### **4. Alogrefa osoasă, poate fi prezentată prin:**

##### **- Alogrefe nevascularizate:**

Matrice osoasă demineralizată: alogrefele osoase posedă în general capacități osteoconductive, dar prezintă și osteoinductivitate slabă pe fon de prezență a BMPs păstrate și collagen osos tip I, aproximativ 5% din conținutul grefei (după prelucrare cu acid) [5, 6].

Alogrefe osoase corticospongioase, spongioase, corticale și osteocondrale: sunt recoltate de la cadavre, proprietățile lor biologice variază, dar în general lipsesc componentele celulare, iar osteoinductivitatea este mică. Devitalizarea grefelor are loc prin iradiere și liofilizare la rece, astfel se mențin actuale procesele imune și infecțioase posibile posttransplant, precum și se omit proprietățile osteogenice și inductive ale grefei [36, 46].

Alogrefa osoasă crioconservată: sunt alogrefe preparate la temperaturi joase, ce induce distrugerea țesutului osteoarticular, iar artritele sunt soluționate în mediu la 3 ani cu artroplastii în 54% cazuri [5]. Caracteristica comună a tuturor tipurilor de alogrefe osoase nevascularizate este inerția biologică sau absența celulelor osteogenice, soldată cu o instabilitate mecanică și

consolidare osoasă precară, procese degenerative, infecțioase și fracturi posttransplant (fracturi periprotetice, de stres, pseudartroze, sepsis) [8]. Astfel, biointegrarea unei alogrefe osoase diferă de cea autogenă, în special datorită absenței osteoblastelor, cu o perioadă mai lungă de consolidare comparativ cu grefa autogenă (corticală sau spongioasă) similară ca dimensiune [2, 142].

În 2004, Platz și al. au efectuat un studiu care cerceta rezultatele a trei tehnici de reconstrucție osoasă: AuOV, regenerarea osoasă cu fixator extern și alogrefă osoasă masiv intercalată. Autorii au indicat rezultate cu consolidare adecvată pentru 83%, 94% și 83% respectiv. Concluzând că regenerarea cu fixator extern este varianta electivă pentru defectele osoase mai mici de 5 cm, alogrefa osoasă intercalată indicație pentru defecte de 5-12cm, iar AuOV pentru defecte mai mari de 12 cm.

Un alt studiu, efectuat de R. Capanna în 2006, indică superioritatea, pentru defectele osoase  $\geq 15$  cm, a utilizării simultane a alotransplantului osos masiv cu un AuOV, din mai multe considerente:

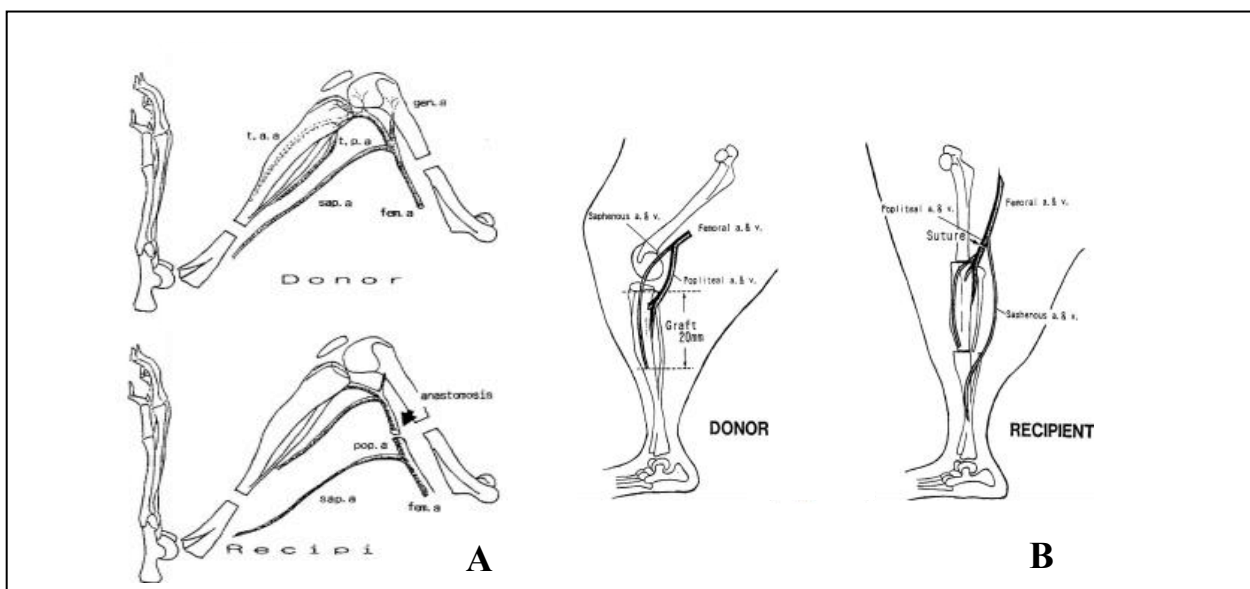
- Suportul mecanic oferit de alogrefă în primii 2 ani pentru AuOV, în caz de eșec al anastomozei vasculare AuOV, care poate deveni mecanic insuficientă.
- AuOV posedă capacitatea de a compensa resorbția osoasă provocată de procesul lent de substituție a țesutului devitalizat al alogrefei, prin hipertrofia osoasă progresivă.
- Alogrefa osoasă prezintă un suport mecanic ideal pentru placa de fixare, fără a afecta integritatea AuOV.

Au fost obținute rezultate pe termen scurt și lung ( $>10$  ani) excelente, cu o rată a succesului de 93,5%, comparabilă cu 80% pentru alogrefarea osoasă și 85% pentru AuOV. Astfel, 73% din pacienți au avut nevoie de doar o intervenție pentru tehnica mixtă, o parte minimă după alogrefare osoasă și de la 37-73% pentru pacienții cu AuOV[43].

Numeroase studii experimentale și clinice indică cedarea alogrefei osoase proaspete și congelate posttransplant la scurt timp [9, 22].

Foarte importantă este utilizarea corectă a grefei, căci alegerea tipului în dependență de defectul ce urmează a fi reconstituit (cavitar sau segmentar) și de gradul de vascularizare al acestuia este cheia unui succes terapeutic [2].

**- Alogrefe vascularizate:** Alogrefa osoasă vascularizată poate fi liberă și pe pedicul (AIOV), posedă potențial de regenerare și plastic osoasă similară unei AuOV (capacități osteogenice, osteoinductive și osteoconductive marcate). Remodelarea postgrefare fiind minimă, răspândindu-se masa osoasă, cu o minimă osteopenie dar și cu o stabilitate și rigiditate sporită, grație posibilităților ortotopice de selectare a grefei [12, 13]. Alogrefarea vascularizată osoasă permite menținerea viabilității osteocitelor corticale și are un suport mecanic satisfăcător [12, 33].



**Figura 2. Alotrantransplant vascularizat al articulației genunchiului - studiu preclinic.**

2 A - alotrantransplantarea ortotopică osoasă vascularizată a articulației genunchiului la șobolani. 2 B Alogrefarea vascularizată intercalară tibio-fibulară la șobolani (Keiichi Muramatsu et al., [51] 1993- Mitsunori Shigetomi și al., [52] ).

În general, este acceptată superioritatea grefelor osoase vascularizate, în special în cazul defectelor osoase tubulare critice, pentru capacitățile înalte osteogenice [9]. Pentru a spori consolidarea osoasă este necesară o vascularizare și stabilitate mecanică adecvată, asigurate de un țesut osos viu vascularizat. Acestea fiind momentele cheie ce induc o regenerare primară și o remodelare ulterioară a structurilor osoase.

Succesul pe termen lung al AIOV este menținerea circulației prin *arteria nutricia* și a viabilității celulare, iar microcirculația adecvată postgrefare este considerată obiectivul major pentru un transplant reușit.

Variate studii indică superioritatea grefelor osoase vascularizate prin proprietăți mecanice și biologice posttransplant superioare comparativ cu cele nevascularizate [13, 22, 33, 36, 37, 50].

#### **1.4. Alogrefa osoasă vascularizată - metodă de tratament experimental**

În 1993, Keiichi Muramatsu și al. descriu alotrantransplantarea vascularizată a articulației genunchiului la șobolani. Grefarea a avut loc ortotopic, schematic reprezentată în figura 2 A.

Scopul cercetării a fost studierea capacității funcționale și mobilității articulare pe parcursul repopulării celulare, precum și adaptarea imunosupresiei adecvate postgrefare. Autorii studiilor au concluzionat pe grupele de studiu:

- Grupul I - 5 isogrefe consolidate în 4 săptămâni și ficționalitate bună la 25 săptămâni, fără imunosupresie.

- Grupul II – 10 alogrefări eșuate pe fond de absență a imunosupresiei.
- Grupul III - 25 de alogrefări pe fond de imunosupresie de scurtă durată cu o consolidare adecvată, și eșuată după stoparea imunosupresiei.

- Grupul IV - 10 alogrefări cu o imunosupresie de 10 mg/kg corp/zi de Ciclosporină A, cu consolidare bună, dar decesul animalelor prin supradozare cu imunosupresoare.

- Grupul V - 15 animale la care postgrefare au fost administrate 5 mg/kg corp de soluție Ciclosporină A pe zi, s-a înregistrat o consolidare adecvată la 25 săptămâni [51].

În 1994 un alt studiu efectuat de către Mitsunori Shigetomi și al., cercetează alogrefarea vascularizată intercalară tibio-fibulară la șobolani (figura 2B). Autorii au comparat imunosupresia de scurtă durată (14 zile) cu cea de lungă durată (21 de săptămâni).

- Grupul control A- 10 șobolani cu complexul major al histocompatibilității RT1<sup>a</sup>-haplotip specific, grefare reciprocă. Servind ca sursă de grefa și pentru grupul B și C.

- Grupul B- cu o imunosupresie de 21 de săptămâni cu Ciclosporina A 10 mg/kg/corp/zi, cu complexul major al histocompatibilității RT1.

- Grupul C - cu o imunosupresie de 2 săptămâni cu Ciclosporina A 10 mg/kg/corp/zi, cu complexul major al histocompatibilității RT1.

Rezultatele au prezentat consolidare adecvată pentru Grupul control, o consolidare precoce și biointegrarea alogrefei similare cu autogrefarea vascularizată a fost înregistrată în Grupul B. În Grupul B, stoparea imunosupresiei până la consolidarea definitivă a grefei induce rejețul acesteia ulterior. La fel, autorii specifică necesitatea determinării indicilor precoci de rejeț al alogrefelor osoase, penetrabilitatea pediculului vascular nefiind un indice, deoarece nu mereu asigură viabilitatea grefei.

Microcirculația este primordială. Scintigrafia osoasă repetată în perioada postoperatorie poate oferi date incipiente despre rejețul grefei. Imunosupresia este imperativă pentru perioada de inducere a toleranței la țesutul osos alogen, cu un dozaj minim și urmată de o perioadă în care dozajul va fi diminuat treptat. Imunosupresia de lungă durată poate provoca efecte adverse neargumentate [8, 9].

În 2008, Goetz A. și al., au cercetat alogrefarea vascularizată de diafiză femurală cu un singur pedicul corespunzător transferului microchirurgical, pe 10 iepuri. Au fost utilizate 5 membre inferioare drepte și 5 stângi cu reconstrucție ortotopică între perechi. Segmentele osoase nefiind deperiostate. Osteotomiile au fost efectuate sub protecția pediculului vascular, cea proximală prin trohanterul mic, iar a doua cu 4 cm distal. Fragmentele osoase au fost fixate cetromedular și serclaj interosos. Postoperator animalele au urmat tratament antidolor și antibioticoterapie. Rezultatele la 16 săptămâni, după eutanasierea animalelor, au fost cercetate prin mai multe metode: radiografic și CT, microangiografic, testare biomecanică,

histomorfometria cantitativă a osteoidului, determinarea densității osoase. Datele au fost prelucrate statistic. Rezultatele au indicat debut de consolidare și păstrarea permeabilității vasculare, dar cu o rigiditate și rezistență mecanică insuficientă, dar au oferit premise pentru cercetări ulterioare [52].

Hofmann GO și al., în 2000, susțin că o imunosupresie de lungă durată ar fi argumentată în clinică în cazul alotransplantării de țesut osos vascularizat pentru reconstrucția defectelor osoase postrezeccionale oncologice, posttraumatice pentru articulația genunchiului cu leziune aparatului extensor, pentru a preveni amputația de membru inferior. Alogrefele osoase și articulare vascularizate au fost preluate de la donator decedat, perfuzate cu soluție UW (University of Wisconsin) și transplantate în ischemie la rece în decurs de 18-25 ore. Autorii indică o serie de 8 cazuri clinice, dintre care 2 eșuate pe fon de infecție. Două cazuri de grefare totală a genunchiului au necesitat artroplastii totale - figura 3, ce au fost preluate de la donator decedat pentru transplant ce au necesitat artroplastii totale de genunchi (Hofmann GO și al., 2000 [10]).

În baza datelor clinice preliminare au fost elaborate un șir de concluzii pentru alotransplantarea vascularizată osoasă și articulară:

- Osteosinteza intra-medulară prezintă rezultate superioare comparativ cu fixarea externă sau prin placă, deoarece facilitează revascularizarea.

- Cyclosporina A nu influențează negativ procesul de consolidare, doza necesitând a fi ajustată, iar pentru a fi prevenită rejecția alogrefei, imunosupresia este inevitabilă pe termen lung, posibil pe viață precum este necesară și terapia anticoagulantă.



**Figura 3. Alogrefe osoase și articulare vascularizate - studiu clinic**

(Hofmann GO și al., 2000 [10]).

- Este necesar de a cerceta timpul și nivelul de ischemie la rece al alografei, precum și soluția pentru conservare cu efect maximal sporit.- Un impediment etic este impus de pregătirea societății în prelevarea membrilor de la persoanele care s-au poziționat ca donatori de organe.

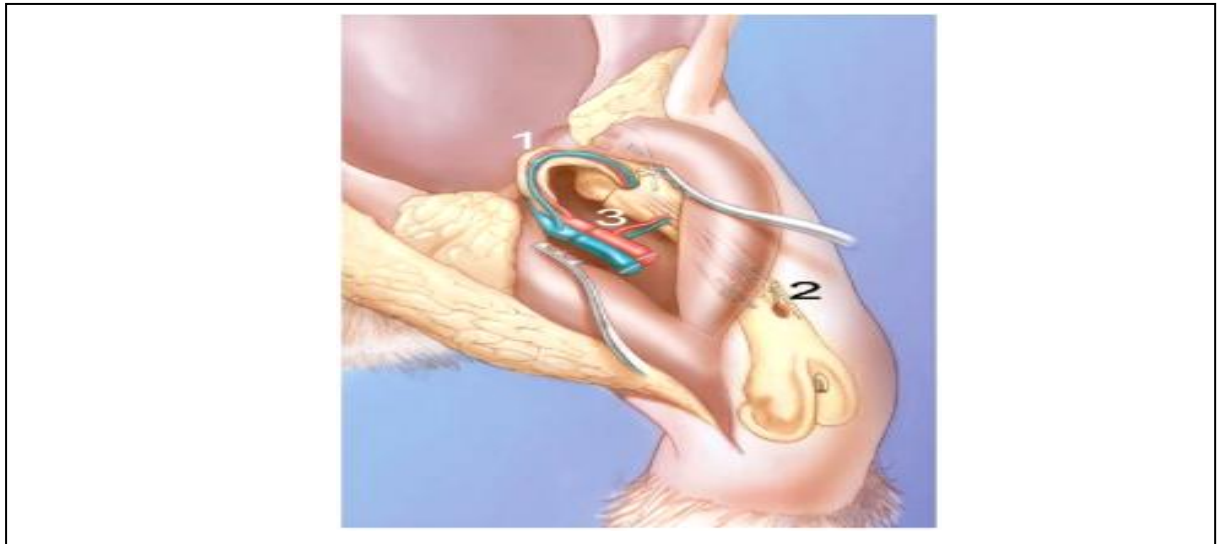
Totuși dilema clinică impusă de AIVO este necesitatea de imuno-modulare și imunosupresie postgrefare. La etapa preclinică pentru moment dispunem de diverse studii ce descriu alogrefarea vascularizată de diafiză sau de articulație integră pe fon de imunosupresie. Grefarea microvasculară a membrilor, articulațiilor, țesutului osos este similară transplantului de organe vitale cum ar fi inima, ficatul, rinichiul, ce necesită imunosupresie de lungă durată. Pentru a omite complicațiile sistemice imunogene, pe fon de riscuri majore de rețet și efecte adverse severe, imunosupresia nu este argumentată vital [8, 9, 13, 52, 51].

### **1.5. Neoangiogeneza chirurgicală - metodă de tratament experimental**

Studiile contemporane cercetează opțiuni alternative de menținere a viabilității postgrefare a unei AIOV prin utilizarea neoangiogenezei chirurgicale. Combinarea alotransplantului vascularizat osos microchirurgical inclus în circuitul gazdă și dezvoltarea rețelelor vasculare tipice gazdei prin neoangiogeneza chirurgicală, pe fond de imunosupresie de scurtă durată (14 zile). Aceasta ar prezenta o metodă inovativă de succes pentru reconstrucția defectelor osoase vaste. Metoda dată, a fost descrisă în literatură pentru segmente sau articulații, la etapă preclinică pe șobolani, iepuri, porcine. Metoda presupune implantarea de țesut bogat vascularizat autogen în segmentele osoase alogene grefate și pe fon de o imunosupresie de scurtă durată, se creează rapid o nouă rețea vasculară tipică gazdei, capabilă și după sistarea medicației imunomodulatoare să asigure grefa cu o vascularizare satisfăcătoare [9, 13, 14, 19, 20, 53, 54, 55].

În 2008, Goetz și al., au avut drept scop de a demonstra capacitatea alografei osoase vascularizate de biointegrare, remodelare și menținere a proprietăților biomecanice pe termen lung ale segmentului grefat fără imunosupresie, prin revascularizarea microchirurgicală a diafizei femurale la iepuri și inducerea neoangiogenezei chirurgicale prin implantarea țesuturilor intens vascularizate în segmentul grefat ortotopic pe grupe de 10 animale - figura 4.

- Grupul 1- autotransplant vascularizat diafizar de femur.
- Grupul 2- alotransplant osos vascularizat, fără pedicul intramedular din segment fasciat cu vasele superficiale epigastrice inferioare (SIEV) și fără imunosupresie.
- Grupul 3- alotransplant osos vascularizat, cu pedicul intramedular din SIEV, dar fără imunosupresie.
- Grupul 4- alotransplant osos vascularizat, cu pedicul intramedular SIEV ligaturat, dar cu imunosupresie.
- Grupul 5- alotransplant osos vascularizat, cu pedicul intramedular SIEV cu imunosupresie.



**Figura 4. Revascularizarea microchirurgicală a diafizei femurale la animal de laborator - neoangiogeneza chirurgicală.**

1- Bucla arterio-venoasa introdusă în canalul medular al osului femural, 2. Osteosinteza ortotopică a alogrefei osoase vascularizate, 3. Pedicul vascular prin artera nutriția spre grefă (Goetz și al., 2008-[53]).

Autorii au concluzionat după 16 săptămâni și prelucrarea statistică a indicilor: radiologici, biomecanici, microangiografici, micro CT scanner, densității osoase și a hidromorfometriei cantitative, următoarele:

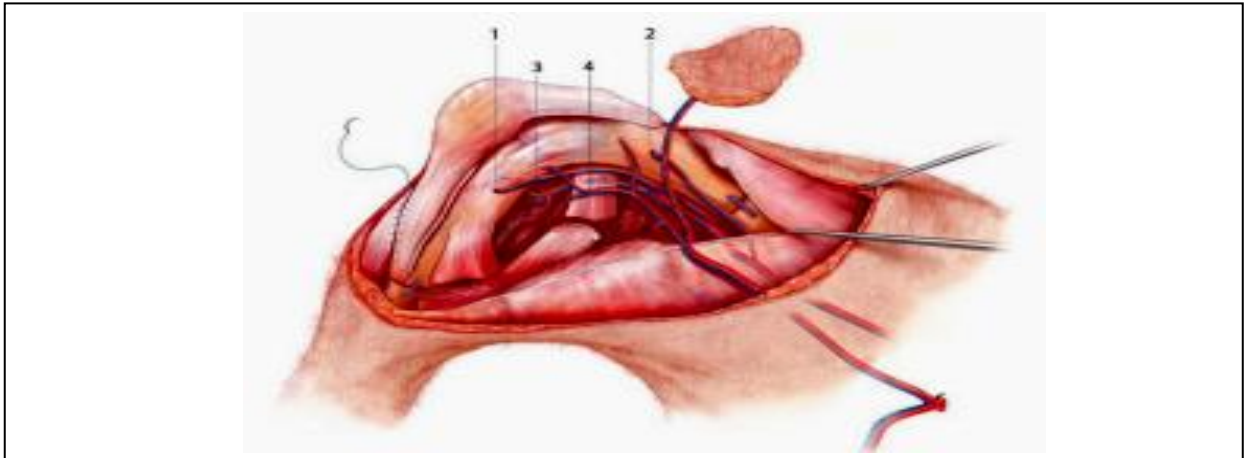
1. Au fost înregistrate rezultate similare pentru grupul 1 și 5. Cei mai buni indici ai consolidării osoase radiologice au fost pentru Grupul 5, deci, consolidarea alogrefei revascularizate cu proces neoangiogenetic tipic gazdei este similar autogrefării osoase pe pedicul.

2. Grupurile 3 și 5 au prezentat o neoangieneză sporită comparativ cu grupul 2 și 4.

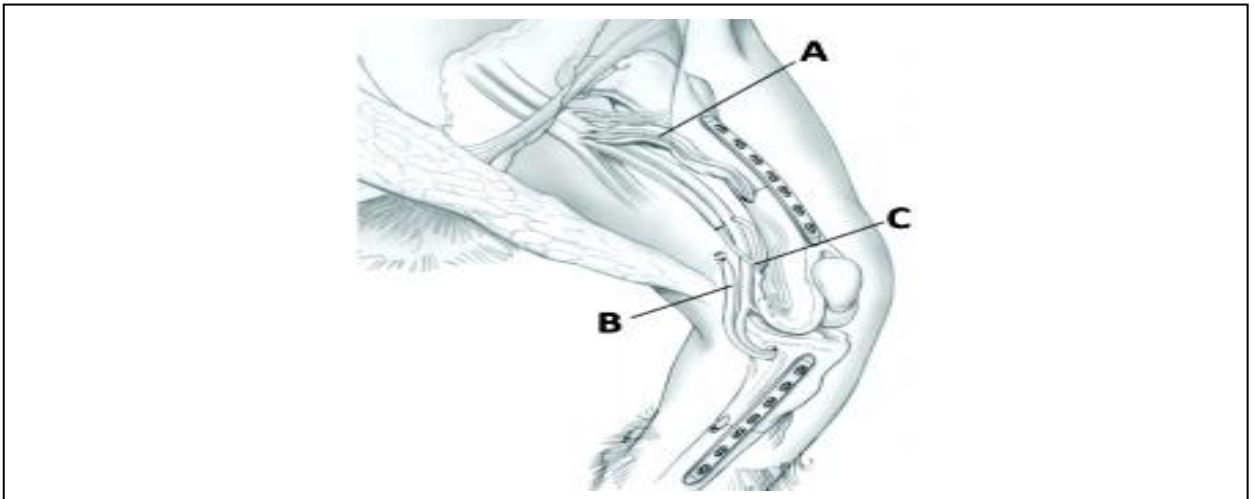
3. Imunosupresie de scurtă durată 14 zile - sol. Tacrolimus 0,08mg/kg corp/zi intramuscular . Aceasta nu a influențat neoangiogeneza, din contra, a permis crearea unei rețele vasculare capabile să mențină perfuzia tisulară și după stoparea imunosupresiei [53].

Un alt studiu a fost efectuat în 2009, Pelzer M. și al., pe șobolani cu alotransplant vascularizat al diafizei femurale. Cu inducerea neoangiogenezei chirurgicale - bucle arteriovenoase safene, sub medicație imunosupresorie de 2 săptămâni cu sol. Tacrolimus. Monitorizarea a fost de 18 săptămâni și s-a cercetat în timp real repopularea celulară a grefei prin metoda cantitativă în timp real PCR și microdisecție cu captare prin laser (*Laser capture microdissection*) - figura 5.

Rezultatele publicate de autori indică capacitatea buclelor arteriovenoase implantate, de a înlocui circulația sangvină femurală a șobolanului, pe fon de imunosupresie de scurtă durată [19].



**Figura 5. Alogrefarea vascularizată a articulației genunchiului la animal de laborator (șobolan).** 1. Bucle arteriovenoase - BAV safene intramedular pentru osul tibial 2. BAV epigastrice intramedular osul femural 3. Pedicul vascular al gambei 4. Pedicul vascular grefat. (Pelzer M. și al., 2009 -[19]).



**Figura 6. Alogrefarea vascularizată a articulației genunchiului la animal de laborator (iepure NZWR).** A. Segment fascial cu vasele din SIEV B. BAV safene introduse intramedular pentru tibie C. anastomoze microchirurgicale termino-terminale pentru artera femurală și termino-laterală pentru vena femurală (Kremer Thomas și al., 2013-[20]).

În 2010 un grup de cercetători, Larsen Miko și al., au aplicat tehnica de neoangiogeneză chirurgicală pentru a grefa articulația genunchiului la șobolani sub imunosupresie de scurtă durată. Imunosupresia zilnică cu sol. Tacrolimus intramuscular cu doza de 1mg/kg/zi. Grefarea a avut loc ortotopic după desangvinizarea alogrefei cu soluție salină heparinizată și răcită până la 4°C, timp ce se prepara locusul recipient.

Rezultatele studiului la 21 zile nu permit concluzii certe, dar permeabilitatea vasculară și funcționalitatea articulară a fost dovedită [5].

Un studiu similar efectuat pe iepuri a fost publicat în 2013, Kremer Thomas și al. Imunosupresia fiind pentru 21 zile, iar cercetările articulației grefate efectuate la 16 săptămâni postgrefare - figura 6 .

Animalele divizate în 3 grupe:

- Grupul 1 și 2 fiind de control cu absența și ligaturarea BAV.
- Grupul 3 grefare cu BAV păstrate

Rezultatele indicate de autori au prezentat posibilitatea creării neoangiogenezei prin implantare de țesut autogen bogat vascularizat în alogrefă. Cu toate acestea contracturile articulare și procesele generative nu au putut fi omise [20].

În 2012 este publicat un alt studiu de către Tiago Mattar și al., în care se cercetează modalitățile de sporire a neoangiogenezei în alogrefa diafizară femurală vascularizată la șobolani, la fel pe fon de imunosupresie de scurtă durată, prin utilizarea BMPs-2 (bone morfogenetic proteins) și/sau *Vascular endothelial growth factor* (VEGF). Tactica fiind implantarea intramedulară simultană a buclelor arteriovenoase safene cu microsferă biodegradabile ce conțineau placebo, BMPs-2, BMPs-2 combinate cu VEGF. Imunosupresia a fost efectuată zilnic cu sol. Tacrolimus i/m 1mg/kg/zi timp de 14 zile.

După 18 săptămâni au fost eutanasiate animalele și concluzionat următoarele:

- Densitatea capilară a fost de 32,14% pentru grupul cu BMPs-2 + VEGF, 18,98% în grupul cu BMPs-2 și doar de 13,35% în grupul control.
- Fluxul sanguin cortical mediu pentru grupul control a fost de 0,12ml/min/100g, grupul cu BMPs-2 de 0,15 ml/min/100g, iar pentru grupul cu BMPs-2 + VEGF de 0,25 ml/min/100g [14].

Studiile preclinice, efectuate pe șobolani și iepuri, au demonstrat metoda inovativă de utilizare a neoangiogenezei chirurgicale, pe fond de imunosupresie de scurtă durată, drept una capabilă să mențină o vascularizare osoasă bună postgrefare. Studiul clinic ar trebui documentat pe modele preclinice similare ca mărime și structură cu țesutul osos uman. Astfel, ultimii ani au fost marcați de cercetarea neoangiogenezei chirurgicale în alogrefa vascularizată, sub imunosupresie de scurtă durată, pe modelul porcine. Selectarea datelor este argumentată din mai multe considerente:

- răspunsul imun al organismului porcine pentru un AIOV este similar celui uman,
- este studiat bine haplotipul de histocompatibilitate leucocite - antigen SLA,
- anatomia scheletului membrelor posterioare porcine permite utilizarea acelor metodologii chirurgicale utilizate în clinică,
- proprietăți biologice de regenerare osoasă similare celor fiziologice umane.

Deci, cercetarea metodei date pe porcine reprezintă o etapă preclinică importantă [13, 20, 44, 55, 74].

În 2016, Dimitra Kotsougiani și al., publică un studiu efectuat pe porcine ce presupune alogrefarea vascularizată a tibiei cu implantarea intramedulară a pachetului arteriovenos al gazdei intramedular. Schematic, tehnica este reprezentată în figura 7. Au fost cercetate 8 animale, divizate în 2 grupe:

- Grupul I BAV ligaturat, imunosupresie de 14 zile cu Tacrolimus și Mycophenolate Mofetil per os cu obținerea concentrației plasmatiche de 5-30ng/ml și 1-3,5 ng/ml respectiv, precum și sol. Metilprednisolon cu doza de menținere 0,1ml.

- Grupul II BAV păstrat și imunosupresie similară pentru 14 zile.

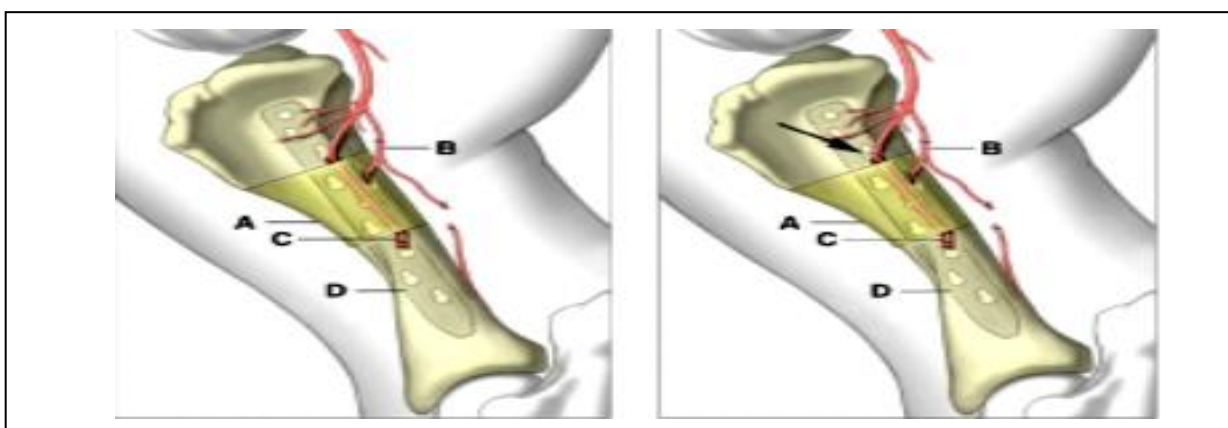
Perioada de supraviețuire a animalelor a fost de 16 săptămâni. Autorii indică următoarele rezultate:

- Toate animalele au prezentat ortostatism și mișcări active în membre din prima zi post-operator, fără particularități patologice sau de perfuzie a membrelor pe tot parcursul studiului.

- Scanarea prin micro-CT a indicat valori statistice veridice pentru dimensiunile grefei, fiind mai mari în grupul II.

-Histomorfometria cantitativă indică valori statistic semnificative pentru volumul osteoid, raportul formațiune de țesut osos/volum osos, mineralizare osoasă/suprafață osoasă ș.a, acestea fiind mai mari pentru gradul II.

- Testul biomecanic de compresie axială nu a indicat valori statistice veridice între grupe [13]. Echipa dată a efectuat studii similare pentru cercetarea vascularizării segmentului tibial la porcine și selectarea pediculului vascular capabil să fie supus anastomozei microchirurgicale și să asigure grefa cu volumul sangvin necesar [54], ulterior crearea protocolului pre-operator, intra- și post-operator al grefării [44].



**Figura 7. Alogrefarea vascularizată a osului tibial la animal de laborator (porcina) cu implantarea intramedulară a pachetului arterio-venos al gazdei - neoangiogenază chirurgicală. A. segmentul tibial vascularizat B. Pedicul vascularizat tibial din artera tibială,**

**C. BAV trasată intramedular pe tot traseul grefei D. osteosinteza ortotopică (Dimitra**

**Kotsougiani și al., 2016, [13]).**

## **1.6 Dezavantajele metodelor existente și decelularizarea ca metodă de omitere a răspunsului imun gazdă**

Autogrefa osoasă simplă sau vascularizată este ”*Standardul de aur*” în plastia defectelor osoase, deoarece posedă capacități osteogenice, osteoconductive și osteoinductive. Dar în contextul defectelor mari de țesut osos se impun dezavantajele acesteia, prin:

- limitarea cantitativă,
- morbiditatea locului donator și implicarea proceselor infecțioase.

Unele studii indică sindromul algic moderat- sever al locului donator în >8,8% după prelevarea autogrefei osoase  $\geq 20\text{mm}$ , pentru cel puțin un an postoperator [2, 36, 46].

Gefa AIOV posedă aceleași proprietăți biologice necesare în consolidarea postgrefare și face posibilă respectarea ortotopicității prin ajustarea exactă a formei și dimensiunilor segmentului sau a osului lezat, combinat cu absența morbidității locului donator și diminuarea tipului operațional, comparativ cu autogrefarea osoasă [8, 45].

Neajunsul major în aplicarea în clinică a acestei metode de plastie a defectelor osoase tubulare este necesitatea de a preveni rejețul alogrefei, provocat de răspunsul imun gazdă, cauzat de efectul citotoxic al T-limfocitelor. Transplantologia, în general, este marcată de procesele imune ce debutează o dată cu interacțiunea celulelor imuno-competente gazdă cu endoteliul microvascular, aceasta fiind prima treaptă a cascadei ce provoacă ischemia, dereglarea reperfuziei și rejețul grefei. Ramificațiile clinice ale transplantului osos la om nu sunt analoge cu situația clinică în cazul transplantului de alte organe. Dacă la om se efectuează transplant osos vascularizat, este necesară o formă relativ sigură și de lungă durată de imunosupresie cu doze mai mari de medicație, comparativ cu organele parenchimotoase [79].

Astfel, dilema impusă de alogrefajarea osoasă vasculară este necesitatea de imunosupresie inițială și imunomodulare pe viață. Riscul complicațiilor sistemice, sepsisului, neoplasmelor și costul sporit sunt unele din argumentele instituirii acestei dileme. Acestea ce nu sunt justificate, cum e în cazul organelor vital indispensabile (inimă, ficat, rinichi). Deci, dezbaterea etică cu privire la necesitatea terapiei imunosupresive pe tot parcursul vieții pentru a preveni respingerea unui AIOV a umbrat succesul transplanturilor de țesuturi osoase compozite alogene. Astfel, s-a dezvoltat o nouă oportunitate provocatoare pentru a combina abordările de inginerie tisulară și medicina regenerativă și, în cele din urmă, de a restabili cadrul, funcția, estetica și supraviețuirea transplanturilor osoase vascularizate [9, 13, 50, 71].

În cazul sistemului muscular și scheletal doza de medicație imunosupresivă este de 2-3 ori mai mare, comparativ cu transplantul de organe parenchimotoase. Riscul indus de toxicitatea organică, malignitatea sau a altor complicații, nu justifică în aceste vital necritice situații [20, 44].

Pe termen lung, medicamentele imunosupresive induc adesea insuficiență renală acută sau cronică (nefrotoxicitate marcată). Ele pot duce, de asemenea, la leziuni osoase, diabet sau

obezitate, leucopenie, hipertensiune arterială și leziuni cardiovasculare. Echilibrul dintre imunosupresia eficientă pe termen lung și limitarea toxicității rămâne dificil de stabilit. Este nevoie de o strategie care să fie permanent adaptată fiecărui pacient [131]. Drept compromis ar fi imunosupresia de scurtă durată [9, 14, 19], sau găsirea căii de a o omite.

Decelularizarea presupune îndepărtarea celulelor și a antigenelor asociate din schela-grefă prin agenți fizici, chimici și enzimatici, cu menținerea integrității matricei extracelulare (ECM), inclusiv arhitectura peretelui vascular [94]. Astfel, transformă grefa într-o matrice extracelulară (ECM) inertă imunologic, dar activă biochimic. Scopul este eliminarea completă a materialului genetic (ADN) și a proteinelor de suprafața celulară care ar putea declanșa respingerea de către sistemul imun gazdă.

Un avantaj important al acestei tehnici constă în păstrarea integrității canalului vascular, care îl face potrivit pentru repopularea celulară (recelularizare) și pentru asigurarea migrării celulare și proliferare din interior spre exteriorul alogrefei [58, 59, 60].

Procesul de decelularizare necesită a fi adaptat astfel încât să îndepărteze complet celulele din țesutul osos și vascular, cu păstrarea integrității ECM. Modificarea proprietăților ECM poate avea un impact negativ asupra stabilității *in vivo* a peretelui vascular [60, 91].

Obținerea unui alotransplant osos vascularizat decelularizat ce ar permite omiterea terapiei imunosupresive se conturează argumentat alături de studiile ce sunt orientate către organele parenchimotoase de importanța vitală (inimă, ficat, rinichi, etc.) [56, 57,80, 104].

### **1.7. Procesul imun inflamator post-transplant. Etapele de rejet al grefei**

Transplantul de organ și/sau țesut reprezintă tratamentul de elecție pentru numeroase patologii legate de deficiențe sau disfuncții ale funcțiilor vitale. Acest tratament se confruntă cu un obstacol major: fenomenul de respingere al grefei. Rejetul este reacția imunologică a organismului gazdă împotriva organului și/sau țesutului transplantat. Inflamația este un răspuns biologic al sistemului imunitar, care poate fi declanșat de o varietate de factori: agenții infecțioși, cât și cei neinfecțioși, precum și leziunile celulare, care activează celulele inflamatorii și declanșează căi de semnalizare inflamatorii [126].

Există mai multe forme de respingere - rejet de transplant, care se caracterizează prin:

- Momentul debutului

- Mecanismele imunologice implicate.

- Tipurile de leziuni produse la nivelul grefei [127].

Există mai multe forme de respingere după momentul de debut posttransplant, prin mecanismele fiziologice implicate și prin tipurile de leziuni formate la nivelul grefei. În toate cazurile, aceste respingeri pun în pericol funcționalitatea grefei.

Astfel, putem distinge:

- Respingere hiperacută: apare în orele următoare după transplant și se manifestă sub forma unui infarct de grefă (obliterarea vaselor). Acest tip de respingere se datorează, în esență, anticorpilor preexistenți la primitor și direcționați împotriva antigenilor transportați de grefă.

- Respingere acută: apare din a 4-a zi post-transplant. Organul sau țesutul transplantat este locul de infiltrare a celulelor imunocompetente - imunitatea celulară a organismului primitorului, cum sunt limfocitele T - celule „ucigașe”, care infiltrează grefa și ajung să o distrugă. Se manifestată prin semne funcționale, clinice și paraclinice (în AGS). Administrarea terapiei imunosupresive face posibilă controlul relativ bun al acestui risc: supraviețuirea grefei la un an este acum în jur de 90%. Totuși, nevoia de reducere a tratamentelor imunosupresoare sau abandonul medicației, chiar și ocazional, poate promova un al doilea fenomen dăunător: imunizarea pacienților împotriva grefei, care presupune sinteza anticorpilor anti-HLA.

- Respingere cronică: aceasta este principala cauză a eșecului transplantului. Respingerea cronică se instalează insidios în timp, ducând la o pierdere a arhitecturii grefei, care devine treptat locul fibrozei ducând la pierderea progresivă a funcțiilor organului sau țesutului transplantat. Mecanismele implicate combină răspunsul imun al primitorului, toxicitatea medicamentului și alte fenomene biologice sau infecțioase care sunt studiate [131, 136].

Deși studiile clinice raportează o incidență scăzută a complicațiilor locale, în medie 48% dintre pacienți rămân cu sistemul imunitar sensibilizat după ce au primit grefe osoase alogene [128].

Deoarece sistemul imun contribuie major la inflamație, celulele imune precum macrofagii, celulele dendritice, mastocitele, neutrofilele și limfocitele joacă un rol important în răspunsurile inflamatorii de rejet [129]. Astfel, celulele imune, prin activarea receptorilor specifici, induc producerea de mediatori inflamatori, cum ar fi citokinele inflamatorii (de ex. factor de necroză tumorală (TNF), interleukină -1 (IL-1) și interleukină -6 (IL-6)) și chemokine. Acești mediatori accelerează rapid progresia inflamației prin modificarea permeabilității endoteliale vasculare, precum și prin recrutarea neutrofilelor și a excesului de plasmă (conținând anticorpi și factori de complement) manifestat clinic prin secreții din plagă. În cele mai multe cazuri, aceste răspunsuri se extind către efecte sistemice prin producția excesivă de citokine inflamatorii, care mediază secreția de proteine de fază acută (adică protecția C-reactivă și factorii de coagulare) de către celulele vii. Aceste proteine, la rândul lor, induc endoteliul cerebral și facilitează producția de prostaglandine, care sunt în primul rând responsabile pentru apariția simptomelor (de exemplu, durere, impotență funcțională și febră) prin efectele lor asupra sistemului nervos central [130].

Rolul celulelor imune, în special al macrofagilor, este la fel de important în a doua și a treia etapă a regenerării tisulare. Ele sunt implicate în activarea celulelor stem sau progenitoare, în

resorbția țesuturilor deteriorate, în remodelarea matricei extracelulare și în promovarea angiogenezei [135].

Cercetările în imunologie prezintă date ce indică faptul că responsabile pentru răspunsul imun al gazdei la alogrefă sunt limfocitele T. Capacitatea celulelor T gazdă de a recunoaște antigenele derivate de la donator, numită alorecunoaștere, inițiază respingerea alogrefei. Odată ce celulele T primitoare sunt activate, ele suferă expansiune clonală, se diferențiază în celule efectoare și migrează în grefă unde promovează distrugerea țesutului grefat. În plus, celulele T CD4 ajută celulele B să producă alo-anticorpi. Această revizuire rezumă literatura actuală privind alo-recunoașterea, co-stimularea, celulele T de memorie, migrarea celulelor T și rolul lor în distrugerea grefei atât acută, cât și cronică [136].

Pentru mecanismele imunologice implicate, stabilim că recunoașterea alo-antigenului poate avea loc prin două căi distincte, ambele se concentrează pe sursa celulelor prezentatoare de antigen (donator versus primitor).

- Calea directă de alorecunoaștere descrie capacitatea celulelor T de a recunoaște „direct” moleculele MHC *non-self* intacte prezente pe suprafața celulelor donatoare.

- Calea indirectă a alo-recunoașterii descrie capacitatea celulelor T de a recunoaște moleculele MHC (Complexul Major de Histocompatibilitate) donatoare care sunt procesate și prezentate ca peptide de către moleculele auto-MHC. Recunoașterea moleculelor MHC donatoare intacte provoacă un răspuns imun puternic anti-grefă, în timp ce peptidele MHC procesate și antigenele de histocompatibilitate minore provoacă un ritm mai lent, un răspuns imun mai puțin intens [127, 136].

Tipurile de leziuni produse la nivelul grefei sunt în corelație cu tipul de răspuns imun al organismului și tipul de alogrefă utilizat. Cu toate acestea, răspunsul imun indus de grefă ar putea duce de la resorbție prin funcția fagocitară a macrofagilor, la un eșec regenerativ, deoarece răspunsul la un substitut osos se poate termina în încapsularea sa fibroasă [137].

Rezorbția osoasă postgrefare poate fi determinată prin markeri osoși cum ar fi:

- Fosfataza alcalină de origine osoasă, enzima isoformă a fosfatazei alcaline, este o glicoproteină tetramerică care se găsește pe suprafața osteoplastului și este eliberată în circulație prin acțiunea enzimei fosfatidil-inozitol-glicanaza. Fosfataza alcalină osoasă este un indicator sensibil și fidel al fiind un marker de formare osoasă (activitate osteoblastică), eliberată în fluxul sanguin reflectă metabolismul global, în monitorizarea post-grefare, indică succesul integrării biologice. Are un timp de înjumătățire lung, nu este afectată de clearance-ul renal și nu prezintă variații diurne. Un nivel ridicat al izoenzimei osoase este întâlnit în perioada de creștere osoasă, în cursul procesului de vindecare al fracturilor, cât și în afecțiuni ale sistemului osos caracterizate prin hiperactivitate osteoblastică și remodelare osoasă. Nivelul ridicat este un semnal pozitiv,

indicând faptul că grefa nu este doar un simplu implant inert, ci un țesut biologic integrat care se repară și se adaptează [138].

- Calciu seric, componentul mineral major al oaselor. Iar 99% din cantitatea de calciu din organism se afla în oase și dinți, care constituie un rezervor imens pentru menținerea nivelului calciului seric. O hipercalcemie osteolitică poate fi datorată posibilă implicare a citokinelor implicate în procesul imun postransplant. În contextul unui transplant de os vascularizat indică o distrugere accelerată a matricei minerale a grefei sub influența sistemului imun gazdă [138, 139].

- Fosforul seric, care este cel mai abundent element mineral din organism după calciu, aflându-se în orice țesut. Fosforul reprezintă 1% din greutatea corpului. Din aceasta cantitate 85% intra în constituția scheletului. Hiperfosfatemia, de obicei, nu are simptome imediate în sine și în caz de osteoliză postransplant poate elimina calciul din oase și din sânge, ceea ce poate provoca hipocalcemie. Monitorizarea fosforului seric este un indicator critic nu doar pentru integritatea structurală a alogrefei, ci și pentru stabilitatea metabolică generală a pacientului transplantat [138].

### **1.8. Sinteza capitolului 1 și sumarea abordării terapeutice a defectelor osoase tubulare în datele literaturii de specialitate**

Actualmente există multiple metode de plastie osoasă, care servesc ca o modalitate de tratament a defectelor osoase tubulare necritice. Autogrefa osoasă - țesutul osos prelevat din locusul donator al pacientului este considerată un „*standard de aur*” în cazul defectelor osoase mici, datorită proprietăților biologice complet păstrate ale grefei. Autogrefele osoase simple sau vascularizate devin insuficiente prin rezervele structurale și fiziologice ale organismului uman limitate în cazul unor defecte osoase tubulare critice survenite în urma traumatismelor, rezecțiilor tumorale, postinfecțioase, defectelor congenitale, ș.a. Datele literaturii de specialitate indică actualmente inexistența unui tratament sau o procedură chirurgicală de plastie standardizată capabilă să rezolve problemele impuse de DOC fără a fi implicată imunosupresia de scurtă sau lungă durată postgrefare [5, 8, 14, 16].

Consolidarea osoasă este un proces fiziologic care are ca rezultat repararea țesutului osos după o fractură, osteotomie, artrodeză sau grefă osoasă. Regenerarea osoasă este adecvată atunci când aportul de sânge este optim [3].

Mărimea lor critică depășește capacitatea intrinsecă de auto-regenerare și, în consecință, vindecarea oaselor este perturbată și insuficientă. Un defect de dimensiune critică descrie pierderea osoasă care nu s-ar vindeca spontan în ciuda stabilizării și necesită o intervenție chirurgicală suplimentară pe lângă fixare. Potențialul de vindecare variază în funcție de localizarea anatomică a defectului și de starea țesutului moale din jur. De exemplu, defectele

care apar în regiunea metafizară foarte vascularizată a oaselor lungi au un potențial de vindecare spontană mult mai mare decât un defect diafizar de os tubular sau periarticular slab vascularizat. Vascularizarea este esențială pentru vindecarea osoasă spontană. Atunci când aceasta este compromisă, intervenția pentru a crește potențialul de vindecare este justificată [68]. Astfel, la un pacient cu un defect osos tubular de dimensiune critică, consolidarea naturală devine compromisă pe baza ischemiei și absența surselor osteoplastice [21, 22].

În acest context, AIOV este o alternativă cu perspectivă. Bariera de utilizare în clinică a acestor tipuri de grefe este impunerea imunosupresiei necesară după transplant. În cazul țesutului muscular și scheletal doza de imunosupresie fiind de câteva ori mai mare decât în cazul organelor parenchimotoase vitale indispensabile (rinichi, ficat, ș.a). Efectele adverse și riscurile unei imunosupresii de lungă durată în cazul DOC devin nejustificate [9, 13, 50].

Decelularizarea presupune îndepărtarea celulelor și a antigenelor asociate din schelă prin agenți fizici, chimici și enzimatici, cu menținerea integrității matricei extracelulare (ECM), inclusiv arhitectura peretelui vascular. Un alt avantaj important al acestei tehnici constă în păstrarea integrității canalului vascular, care îl face potrivit pentru repopularea celulară (recelularizare osteogenă) din interior spre exterior și pentru asigurarea migrării celulare și proliferare [58, 59, 60, 105]. Procesul de decelularizare necesită a fi adaptat astfel încât să îndepărteze complet celulele din țesutul osos și vascular alogene, cu păstrarea integrității ECM. Modificarea proprietăților ECM prin metode agresive de decelularizare un impact negativ asupra stabilității *in vivo* a peretelui vascular [60].

Prin urmare, decelularizarea grefei osoase vascularizate ar fi o abordare inovatoare pentru evitarea răspunsului imun inflamator gazdă. Alogrefa osoasă compozit decelularizată inclusă microchirurgical în circuitul gazdă poate fi soluția, prin capacitățile osteogenice, osteoinductive, osteoconductive și ortotopice pe care le are. Iar proprietățile acestei grefe compozit biocompatibile, care sunt: matricea extracelulară osoasă și matricea extracelulară vasculară, cu păstrarea proprietăților mecanice ale grefei vasculare, dar permit omiterea răspunsului imun al organismului gazdă.

Respingerea sau rejețul grefei este reacția imunologică a organismului gazdă împotriva organului și/sau țesutului transplantat. Inflamația este un răspuns biologic al sistemului imunitar care poate fi declanșat de o varietate de factori: agenții infecțioși, cât și neinfecțioși, precum și leziunile celulare activează celulele inflamatorii și declanșează căi de semnalizare inflamatorii [126].

Există mai multe forme de respingere - rejeț transplant, care se caracterizează prin:

- Momentul debutului

- Mecanismele imunologice implicate.

- Tipurile de leziuni produse la nivelul grefei.

Cercetările în imunologie prezintă date ce indică faptul că responsabile pentru răspunsul imun al gazdei la alogrefă sunt limfocitele T. Capacitatea celulelor T gazdă de a recunoaște antigenele derivate de la donator, numită alorecunoaștere, inițiază respingerea alogrefei. Odată ce celulele T primitoare sunt activate, ele suferă expansiune clonală, se diferențiază în celule efectoare și migrează în grefă unde promovează distrugerea țesutului grefat. Cu toate acestea, răspunsul imun indus de grefă ar putea duce de la resorbție prin funcția fagocitară a macrofagilor la un eșec regenerativ, deoarece răspunsul la un substitut osos se poate termina în încapsularea sa fibroasă [137]. Rezorbția osoasă postgrefare poate fi determinată prin markeri osoși cum ar fi fosfataza alcalină de origine osoasă, calciul și fosforul seric [138].

Din cele expuse mai sus, concludem că chirurgul ortoped trebuie să selecteze tipul grefei sau al substituenților osoși ortobiologici, precum și fixarea mecanică în dependență de cazul clinic prezent, neexistând o variantă universală și compatibilă în cazul tuturor leziunilor mari de țesut osos. Iar abordarea reconstrucției osoase este o artă în știința metabolismului osos [35, 37].

Abordarea terapeutică a defectelor osoase tubulare, în datele literaturii de specialitate, indică aspectul transplantului de os alogen vascularizat ca o opțiune și o potențială soluție „perfectă” în cazul defectelor osoase tubulare critice, numai dacă pot fi evitate riscurile semnificative și nejustificate ale imunosupresiei pe termen scurt și lung [61,62,63]. Din aceste motive, comunitatea științifică și-a concentrat activitatea pe studierea alogrefei osoase vascularizate simple sau combinate - cu factori locali și sistemici care cresc bioactivitatea osoasă. Din studiile preclinice *in-vivo*, considerăm argumentată cercetarea și sistematizarea rezultatelor care implică alogrefa osoasă vascularizată pentru acest tip de defecte osoase.

Scopul acestei revizuirii literaturii l-am trasat pentru evaluarea metodelor existente a regenerării osoase în defecte osoase critice. O evaluare a celor mai relevante modele descrise în literatura de specialitate este adresată pentru a ghida cercetarea în alegerea celui mai potrivit model de experiment, care va fi unul de pionierat. Datele acumulate vor permite determinarea unui vector justificat statistic în metodologia inovativă a propriului studiu experimental preclinic *in-vivo*.

A fost efectuată o căutare electronică desfășurată în conformitate cu ghidurile PRISMA [67], în baza de date Google Scholar, PubMed, Medline și Hinari. Astfel, au fost stocate 653 de articole, lucrări și rezumate care au fost stocate în software-ul Paperpile, baza de date fiind reînnoită periodic 2017-2023 (vezi Anexa 1). Din baza de date au fost selectate 81 de articole conform criteriilor de includere - tabelul 1, pentru aprecierea unei direcții de pionierat a cercetării în cadrul studiului inițiat.

Cercetarea s-a limitat la publicații în limba engleză, rusă, franceză cu informații complete disponibile, fără a avea limită de perioadă, de la cele mai vechi studii până în prezent, cu actualizarea anuală a bazei de date a literaturii de specialitate din 2017 până în 2025 - tabelul 1.

Din baza de date cu surse de literatură stocată în software-ul Paperpile, compusă din peste 650 unități (articole din reviste de specialitate, capitole din manuale, monografii, surse <http://>, materiale conferințe științifice, ș.a) - Anexa 1.

Structurarea surselor din literatura de specialitate a modelelor de tratament *in-vivo* al defectelor osoase critice prezintă dificultate în din cauza utilizării diferitelor specii de animale de laborator (mamifere mari și mici), a diferitelor tipuri structurale de os (plate, spongioase, lungi) și a mai multor protocoale, inclusiv utilizarea diferitelor schele, celule și substanțe bioactive [73].

Cuvintele cheie folosite în procesul de căutare electronică au fost utilizate cu scopul de a elucidă cât mai specific tendințele de cercetare ale tratamentului defectelor osoase critice, atât în practica clinică cât și cea experimentală. Au fost utilizate următoarele cuvinte cheie:

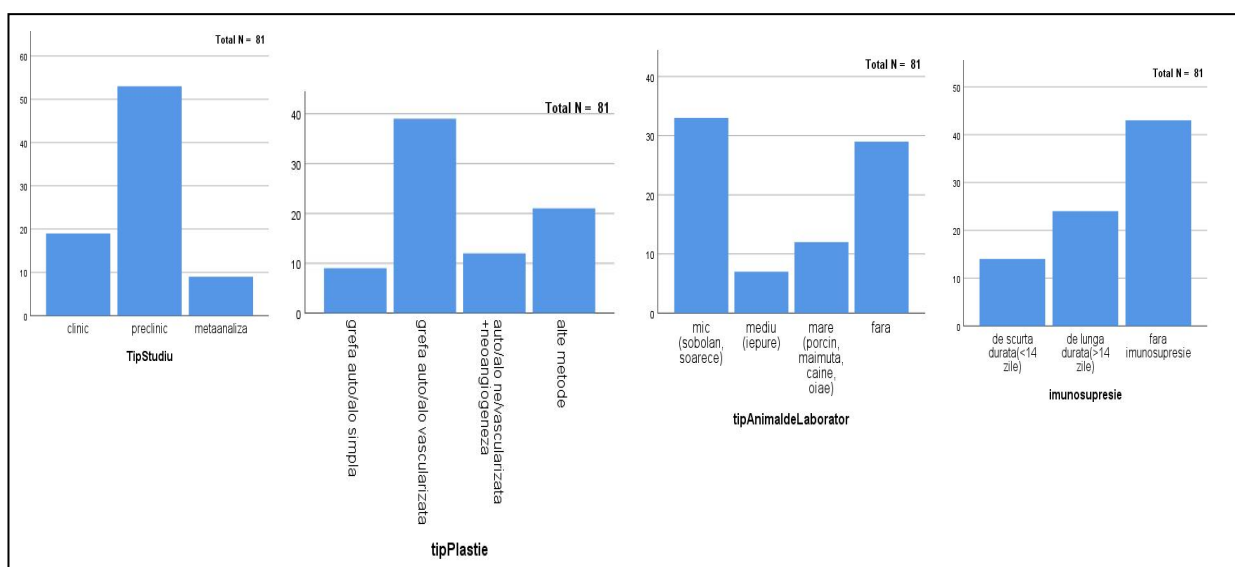
- Alogrefe osoase vascularizate
- Defect osos de dimensiune critică
- Revascularizare chirurgicală a osului
- Substituenți de grefă osoasă
- Imunosupresia după plastie.

Criteriile de selecție a unităților literaturii de specialitate implică cercetări preclinice (*in-vivo*) sau clinice care îndeplinesc sarcinile predefinite și permit examinarea plastiei defectelor osoase tubulare în volum deplin. Astfel, lucrările selectate au fost - tabelul 1:

- Cercetări clinice ale plastiei defectelor osoase critice la un os tubular lung
- Cercetări preclinice ale plastiei defectelor osoase critice la un os tubular lung pe modele mici, medii și mari de animale de laborator
- Plastia defectelor osoase critice la os tubular lung prin diverse metode, inclusiv alogrefe osoase vascularizate.
- Studiile care prezintă date cantitative privind vindecarea osoasă a defectelor critice la os tubular lung sau viabilitatea osoasă după includerea unei grefe vascularizate în circuitul gazdă
- Prezența imunosupresiei de scurtă sau de lungă durată în perioada de după grefare.

**Tabelul 1. Cercetarea surselor literaturii de specialitate după criteriile de selecție.**

Tipul studiului	Clinic	Preclinic	Informație teoretică	-
Tipul plastiei utilizate în cadrul DOC	Autogrefă sau alogrefă simplă	Autogrefă sau Alogrefă osoasă vascularizată	Alogrefă osoasă vascularizată cu neoangiogeneză	Alogrefă osoasă vascularizată decelularizată
Tipul animalului de laborator folosit	mic (șobolan)	mediu (iepure)	mare (porcină, maimuță, câine)	-
Imunosupresia folosită	De scurtă durată (14 zile)	De lungă durată (>14 zile)	Fără imunosupresie	-
Anul publicației	< 1980	1980-1999	2000-2010	2010-2025



**Figura 8. Repartizarea surselor din literatura de specialitate după criteriile de selecție.**

Astfel, am realizat cercetarea pentru determinarea aspectelor dominante în studiile de cercetare preclinică:

1. Tipul de grefă utilizată cel mai des în plastia defectelor osoase critice la os tubular lung
2. Tipul de imunosupresie implementată postoperator.
3. Predominarea tipului de studiu (clinic sau preclinic) în corelație cu perioada cronologică.

Am selectat 81 de studii după criteriile predefinite. Am determinat aspectul care indică vectorul cercetărilor științifice în plastia defectelor osoase tubulare critice, fiind ascendent pentru perioada 2008-2018. Predominarea cercetărilor preclinice *in-vivo* (n=53, 65,43%) cu implicarea animalelor de laborator mici (șobolan, șoarece) (n=27, 33,3%) și utilizarea grefelor osoase vascularizate (auto/alogrefe osoase cu pedicul vascular) fără utilizarea unei imunosupresii posttransplant (n=34, 41,97%) - figura 8.

Astfel, au predominat studiile preclinice pe animale de laborator mici, plastia fiind cu auto/alogrefa osoasă vascularizată cea mai des utilizată. Predominarea studiilor preclinice pe animale de laborator mici, plastia defectelor fiind cu auto/alogrefa osoasă vascularizată fiind cea mai des utilizată.

Nu au fost identificate studii prin utilizarea grefei compozit os+vas decelularizată în plastia acestor tipuri de defecte osoase indică un vector al studiului, dat fiind unul actual și inovator.

*Concluzie: Nu au fost identificate studii prin utilizarea grefei compozit os+vas decelularizată în plastia defectelor osoase tubulare; astfel, vectorul studiului dat este unul actual și inovator.*

Studiul propus spre realizare este unul pilot chirurgical, un experiment efectuat pentru evaluarea fezabilitatea, siguranța și impactul metodei proprii de tehnică chirurgicală. Etapa pilot este esențială pentru cercetarea premiselor și optimizarea tehnicilor, reducerea riscurilor înaintea aplicării la scară largă a unei noi tehnici chirurgicale. Argumentarea metodei are aspect de pionerat în contextul alogrefei osoase vascularizate decelularizate (compozit) incluse microchirurgical în circuitul gazdă. Prin capacitățile osteogenice, osteoinductive, osteoconductive și ortotopice pe care le are, acest tip de grefă poate fi soluția în plastia eficientă a defectelor tubulare segmentare și critice. Proprietățile structurale ale acestei grefe compozit decelularizate prezintă matrice extracelulară osoasă și matrice extracelulară vasculară ce păstrează proprietăților mecanice ale grefei vasculare, cu un potențial redus imunogen. Astfel permite omiterea răspunsului imun al organismului gazdă și restabilirea structurală ortotopică a defectelor osoase tubulare segmentare și critice.

## 2. METODOLOGIE GENERALĂ DE CERCETARE

### 2.1. Caracteristica generală a studiului: etapele și designul studiului

Studiul experimental a fost efectuat în perioada 2017-2024, în cadrul studiilor universitare ciclul III, doctorat, în cadrul Școlii doctorale în domeniul științe medicale al IP USMF „Nicolae Testemițanu”, specialitatea 321.18 Ortopedie și traumatologie, Catedra de ortopedie și traumatologie.

Studiul a fost aprobat de Comitetul de Etică a Cercetării al USMF „Nicolae Testemițanu”, fiind examinat la ședința din 21.05.2018, cu emiterea avizului favorabil nr. 75. În cadrul Comisiei de etică a cercetării nr. 118/18.10.2021 a UMF „G.T.Popa” Iași, România, cu numărul de înregistrare 25807, din 19.10.2021. Autorizarea de proiect nr. 44/04.11.2021 a Direcției Sanitar Veterinară și Siguranța Alimentelor Iași, România.

Structura tezei corespunde cu Ghidul de redactare a tezei de doctorat, redacția 02 din 2025, fiind structurată după tipul Tradițional Simplă.

Acest capitol descrie toate materialele și metodele care au fost utilizate în timpul etapelor de cercetare experimentală a studiului chirurgical pilot, care au corespuns obiectivelor prestabilite pentru atingerea scopului de cercetare propus. Toate etapele și experimentele *in vitro* și *in vivo* au fost efectuate în cadrul Laboratorului Inginerie Tisulară și Culturi Celulare al USMF „N. Testemițanu”, Catedra de Anatomie și anatomie clinică, Catedra de Ortopedie și traumatologie a USMF „N. Testemițanu”, precum și în cadrul CEMEX UMF „G.T.Popa” Iași, România, prin intermediul Bursei de cercetare doctorală a AUF- „Eugen Ionescu”, efectuată în perioada de 15.09.2021-15.02.2022.

Etapile cercetării au corespuns cu obiectivele enumerate mai sus:

1. Analiza datelor literaturii de specialitate efectuată prin intermediul bazelor de date medicale Google Scholar, PubMed (Medline), Hinari database, cu cercetarea și colectarea celor mai relevante și recente articole și publicații, pentru acumularea volumului informațional teoretic și aprecierea vectorului metodologiei contemporane de tratament al defectelor osoase vaste (2017-2023), stocarea a peste 600 articole și rezumate în *Paperpile-soft* - anexa 1.

2. Cercetarea anatomică a vascularizării membrului posterior la NZWR, precum și modalitatea de recoltare a segmentelor diafizare de femur pentru conservare (la  $-82,5^{\circ}\text{C}$ ) și decelularizare cu păstrarea surselor de vascularizare suficiente ale osului tubular lung (*a. nutricia*). Etapă pe care am efectuat-o în cadrul Catedrei de Anatomie și anatomie clinică, Laboratorului de Inginerie tisulară și Culturi Celulare al USMF „N. Testemițanu”, în perioada 2017-2019.

3. Stabilirea posibilităților de anestezie și a protocolului intraoperator pentru osteosinteza ortotopică a defectului osos tubular lung cu alogrefa osoasă vascularizată decelularizată și

inclusiunea acesteia în circuitul vascular adoptiv gazdă la modelul de animal de laborator NZWR- etapă începută în cadrul Laboratorului de Inginerie tisulară și Culturi Celulare al USMF „N. Testemițanu” 2020-2021 și continuată prin intermediul bursei de cercetare doctorală „Eugen Ionescu” a AUF, în cadrul CEMEX din Universitatea de Medicină și Farmacie „G.T.Popa” Iași, România, în perioada 15.09.2021-15.02.2022.

4. Cercetarea posibilităților de anastomoze microchirurgicale și testarea *in vivo* a pediculului vascular decelularizat al alogrefelor osoase compozite (os+vas) prin metodă mixtă, pentru studierea rezistenței mecanice la sutura microchirurgicală, TA, undă de puls - etapă desfășurată în cadrul Bursei de cercetare doctorală AUF „Eugen Ionescu” în cadrul CEMEX Universitatea de Medicină și Farmacie „G.T.Popa” Iași, România, 15.09.2021-15.02.2022.

5. Cercetarea și testarea *in vivo* a țesutului osos decelularizat prin metodă mixtă (compatibilă pentru grefele osoase integrale compozite - os+vas) prin studierea manifestărilor clinice și paraclinice ale plastiei defectelor osoase tubulare - etapă efectuată în cadrul vivariului, catedrei de Ortopedie și Traumatologie și a Laboratorului de Inginerie Tisulară și Culturi Celulare al IP USMF „N. Testemițanu” 01.05.-01.12.2022, cu elaborarea unui set de Recomandări pentru utilizarea alogrefelor compozite decelularizate incluse în circuitul vascular al organismului adoptiv.

6. Finalizarea cercetării și prelucrarea statistică a rezultatelor, pregătirea materialului pentru inovație la tema de cercetare și prezentarea materialului primar spre examinare - 2023-2024.

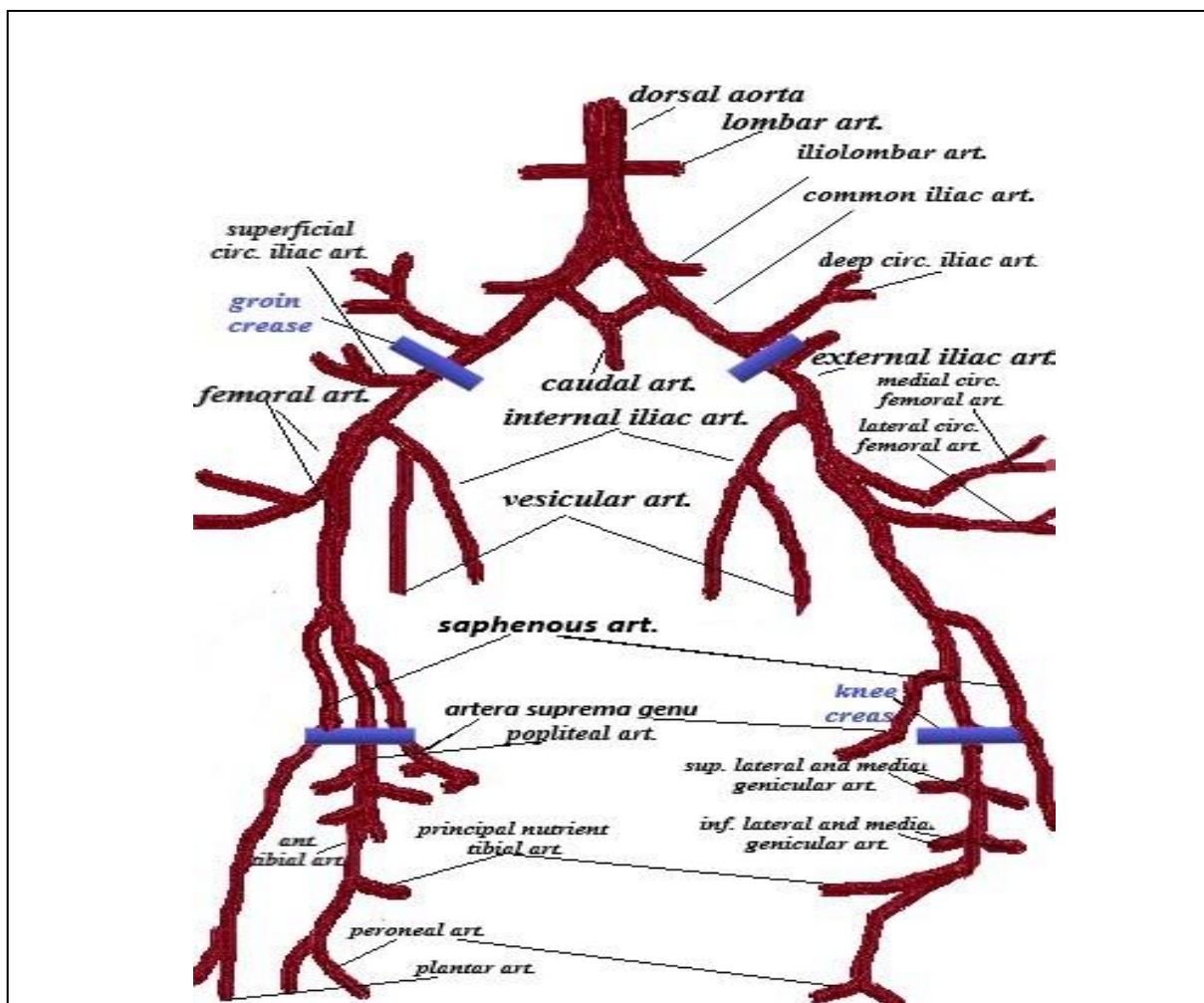
## **2.2. Metode de cercetare ale anatomiei vascularizării membrului posterior la NZWR. Recoltare, conservare și decelularizare a segmentelor diafizare de femur cu pedicul vascular**

Această etapă a cercetării am efectuat-o pe cadavrele modelului de animal de laborator NZWR preluate din abator, care deținea certificatul sanitar-veterinar de eutanasiere - ”ECO-FER-MER” SRL. Studiul anatomic al vascularizării membrului posterior efectuat pe cadavrele a 20 iepuri NZWR adulți.

În cadrul Catedrei de Anatomie și anatomie clinică a IP USMF „N. Testemițanu” a fost cercetat din punct de vedere anatomic și al vascularizației arteriale și venoase membrul posterior la cadavrele a 10 NZWR - figura 9.

După aprecierea segmentului optim de os tubular cu pedicul vascular pentru alogrefă osoasă vascularizată, de la 10 din aceste 20 animale sacrificate în abator au fost prelevate 20 de grefe compozite de os femoralis (os+vas) care au fost stocate prin congelare la temperatura de -82.4°C.

Vârsta medie a animalelor sacrificate a fost de 120 zile. Masa corporală a animalelor de laborator a fost în intervalul de 2,6 - 2,8kg [82].

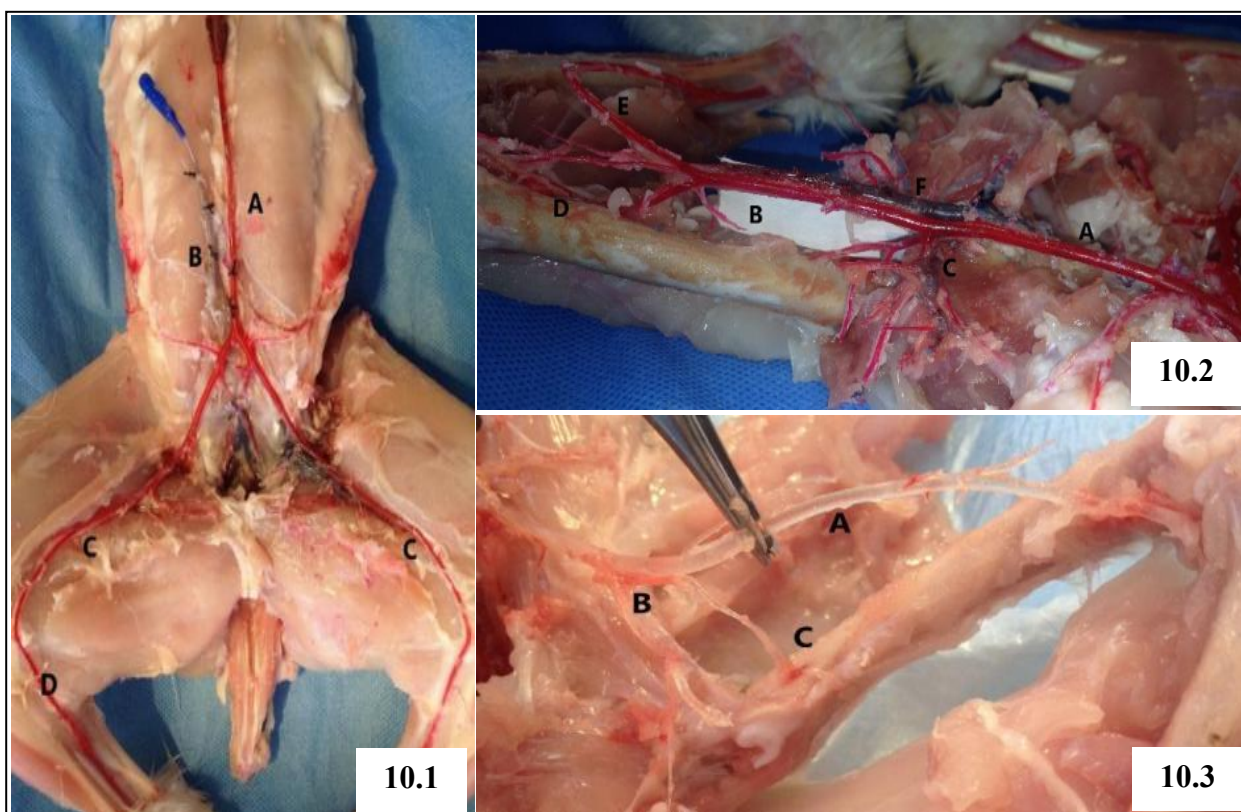


**Figura 9. Descrierea schematică a vascularizării arteriale membru posterior la animal de laborator NZWR.**

**2.2.1. Cercetarea macroscopică a vascularizației membrului posterior la NZWR** a fost efectuat prin injectarea unui polimerizant (Protacryl-M CAS Nr: 101179-3 6-6. Product Nr: AGN-PC-00QFD8) la cadavre de animale de laborator NZWR în aorta abdominală și în vena cavă inferioară cu prepararea și cercetarea particularităților de vascularizare arterială pe traiectul pediculului vascular arterial al membrului posterior pentru determinarea particularităților individuale anatomice - figura 10 [10, 11, 12].

**2.2.2. Cercetarea angiografică a vascularizației membrului posterior la animalul de laborator NZWR**

Cercetarea angiografică a vascularizației membrului posterior la animalul de laborator NZWR a fost efectuată prin introducerea substanței de contrast (Urografin® 30%) în aorta abdominală - figura 11, pentru vizualizarea și cercetarea traiectului arterial la membrul posterior la NZWR. Studiul micro-angiografic al segmentelor osoase vascularizate de os femural a fost efectuat prin cateterizarea arterei iliace interne și introducerea substanței de contrast a sol. Urografin® 30% sub presiune.



### Figura 10. Examinarea macroscopică a vascularizării membrului posterior la NZWR

Figura 10.1. A: Aorta dorsală canulată B: Vena cava inferior canulată C: Artera femurală, D: Artera safenă

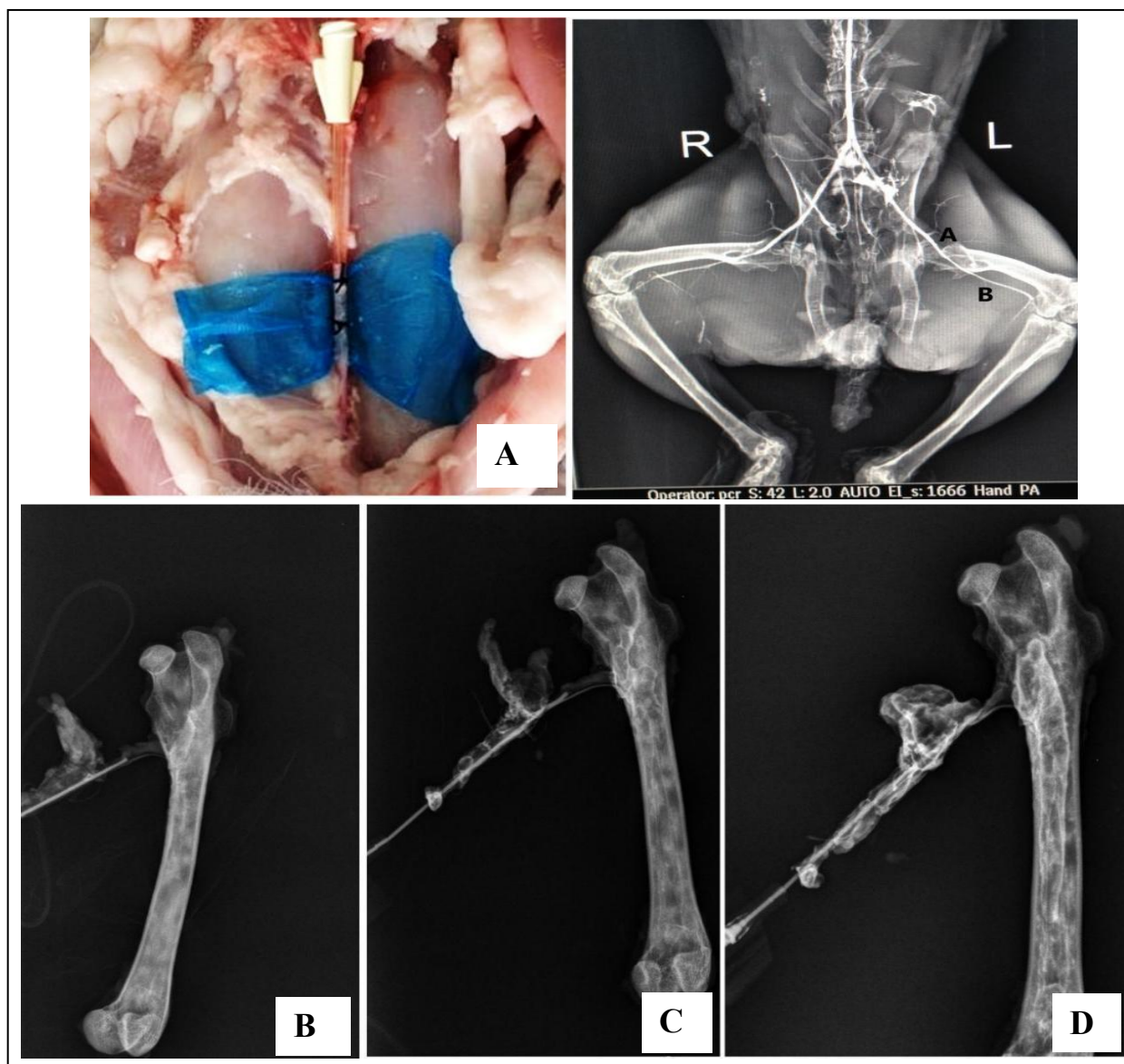
Figura 10.2. A: artera iliacă comună, B: Artera femurală, C: Artera circumflexă laterală femurală, D: Arteria suprema genu E:Artera safenă F: Vena intercondilară femurală.

Figura 10.3. A: Artera femurală B: Artera circumflexă laterală femurală C: Artera nutritivă principală a osului femural al NZWR.

Examenul radiologic standard s-a efectuat la 1 min, 3 min și 5 minute după începerea introducerii substanței de contrast pentru aprecierea ariei de vascularizare a osului femural prin pediculul format de *artera iliacă internă*-*Artera circumflexă laterală femurală*- *Arteria nutritiva*, pentru vizualizarea corelației anatomice cu osul femural.

### 2.2.3 Studiul morfologic al aortei dorsale, arterei iliace interne și al segmentelor osoase tubulare - femur, la animal de laborator NZWR

Această etapă de cercetare, studiul morfohistologic, a fost pe segmente de artera și os prelevate de la cadavrele de animale de laborator NZWR. A fost efectuată cercetarea histologică la următoarele nivele: aorta dorsală, artera iliacă internă, os femural regiunea proximal (*artera nutritiva*).



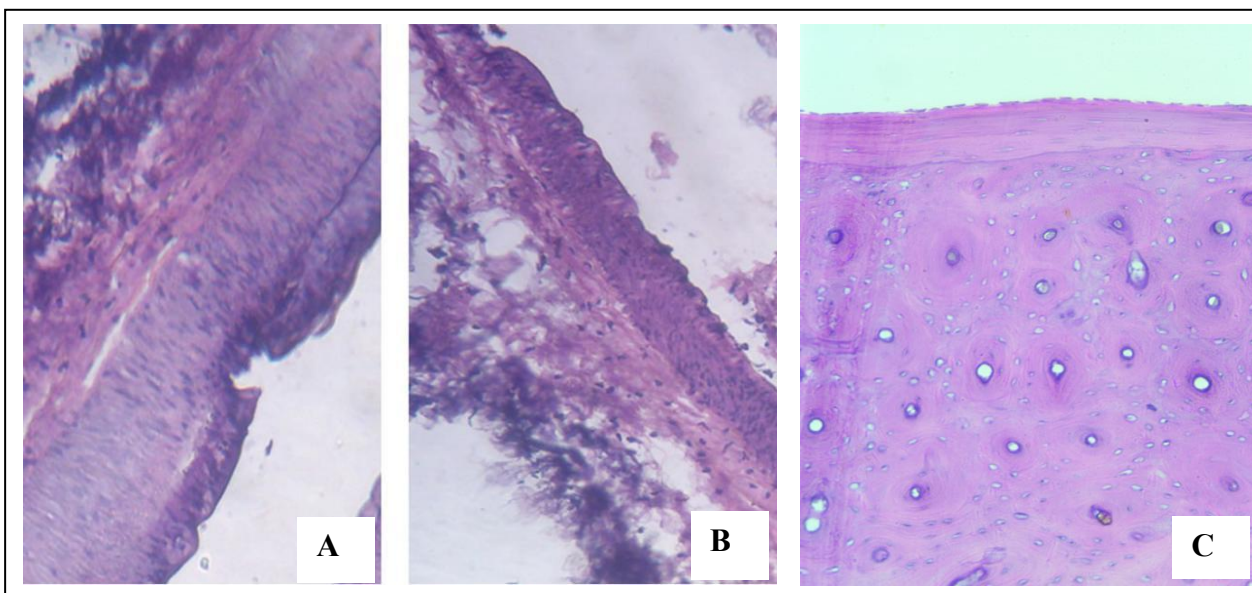
**Figura 11. Examinarea angiografică a vascularizării membru posterior NZWR**

A - vizualizarea corelației anatomice cu osul femural a aportului arterial.

B. Examenul radiologic la 1 min după injectare. C. Examenul radiologic la 3 min.

D. Examenul radiologic la 5 min prin principala arteră nutritivă a femurului de iepure, care pornește din artera femurală circumflexă laterală.

Studiul morfologic și examenul histologic prin colorație HE au permis cercetarea aspectului și al conținutului matricei extracelulare al vasului muscular la diverse nivele de artere musculare, cu scopul de vizualizare microscopică a structurii și conținutului extracelular. Am apreciat potențialul cantitativ de matrice extracelulară. Aspect extrem de important pentru aprecierea capacității de rezistență mecanică necesară la etapa ulterioară de includere microchirurgicală în circulația sanguină a gazdei, după procesul complex și agresiv de decelularizare mixtă prestabilit pentru grefe compozite (os+vas).



**Figura 12. Examenul histologic segmente grefă composit- os+vas, prin colorație HE.**

A. aorta dorsală, B. artera femurală circumflexă laterală, C. segment cortical de os femural nativ.

Am examinat histologic, la microscop optic, grosimea peretelui vascular, respectiv a matricei extracelulare. Aspectul histologic al osului femural a fost cercetat pentru compararea pre și postdecelularizare, precum și pentru aprecierea decelularizării țesutului osos cortical - figura 12.

#### **2.2.4. Stabilirea lungimii grefei în corelație cu definiția de defect osos critic.**

Conform noțiunii de defect osos masiv, descrisă în etapa de examinare a literaturii de specialitate [28], au fost înregistrate valorile categorice numerice pentru calcularea indicatorilor de tendință centrală ai variabilelor aleatorii, utilizând IBM SPSS Statistics 26.0.0.1 FP001, pentru:

- vârsta medie în zile,
- sexul animalului de laborator (M/F)
- greutatea medie în grame,
- lungimea osului femural de la linia articulară proximală până la cea distală.

Lungimea osului femural la animalul de laborator NZWR a fost măsurată la 10 subiecți - cadavre de animale de laborator medii NZWR, la etapa dată de cercetare, și fixate valorile în milimetri. În baza rezultatelor obținute a fost calculată lungimea grefei compozite (os+vas) necesară pentru plastia ortotopică a defectelor osoase tubulare critice, conform definiției din literatura de specialitate.

### 2.2.5. Conservarea și decelularizarea grefelor compozite (os+vas)

Au fost prelevate 20 de grefe osoase vascularizate de dimensiuni prestabilite de la ambele membre posterioare ale 10 animale de laborator medii NZWR, cu ulterioara lor stocare la -82,5°C în frigiderul de laborator ARCTIKO. Grefele au fost stocate pentru următoarea etapă de decelularizare, care a fost efectuată conform protocolului prestabilit [83], în cadrul Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare al USMF „N. Testemițanu”.

Cele 20 grefe compozite (os+pedicul vascularizat) prestabilite ca dimensiune, conform criteriilor pentru plastia unui defect osos critic al osului tubular lung - femur, le-am supus ulterior procesului de decelularizare prin metoda combinată eficientă pentru țesut osos cortical și spongios și țesut moale - vas sanguin (arteră) [83].

Fixarea grefelor pentru procesul de decelularizare a avut loc în boxă sterilă cu circuit închis, conectat la pompa peristaltică care a asigurat instantaneu procesul de spălare a grefelor cu soluțiile prestabilite conform protocolului de decelularizare în 9 etape:

- Etapa I : soluție 0.5 mM Ethylenediamine tetraacetic acid pentru 60 min,
- Etapa II: soluție 0.5 mM Ethylenediamine tetraacetic acid + 10 mM Tris buffer pentru 16 ore,
- Etapa III: soluție PBS (Phosphate-Buffered Saline) pentru 60 min,
- Etapa IV : soluție SDS pentru 24ore,
- Etapa V: soluție PBS (Phosphate-Buffered Saline) pentru 7 ore, cu schimbarea soluției la fiecare 60 minute,
- Etapa VI: soluție Triton X-100 pentru 24 ore,
- Etapa VII: soluție PBS (Phosphate-Buffered Saline) pentru 12 ore,
- Etapa VIII: Sol. DNase 300 U/ml pentru 24 ore,
- Etapa IX: fixare în soluție de antibiotic.

După procesul încheiat de decelularizare depozitarea grefelor compozite (os +vas) decelularizate am efectuat-o în cadrul Laboratorului de Inginerie tisulară și culturi celulare al USMF ”N. Testemițanu”. Condițiile de conservare după decelularizare au fost la temperatura de +4°C în soluție PBS și antibiotic pentru o ulterioară utilizare a acestora la etapa de experiment *in-vivo*. Etapa de pregătire a grefelor compozit decelularizate pentru etapa intraoperatorie *in-vivo* a presupus prelucrarea acestora în soluție nutritivă la baia de apă +37,0°C pentru 6 ore în condiții sterile.

Ulterior grefele au fost utilizate nemijlocit în sala chirurgicală pentru plastia în două etape a defectelor osoase artificial formate ale osului tubular lung - os femural la animalul de laborator NZWR - figura 13.

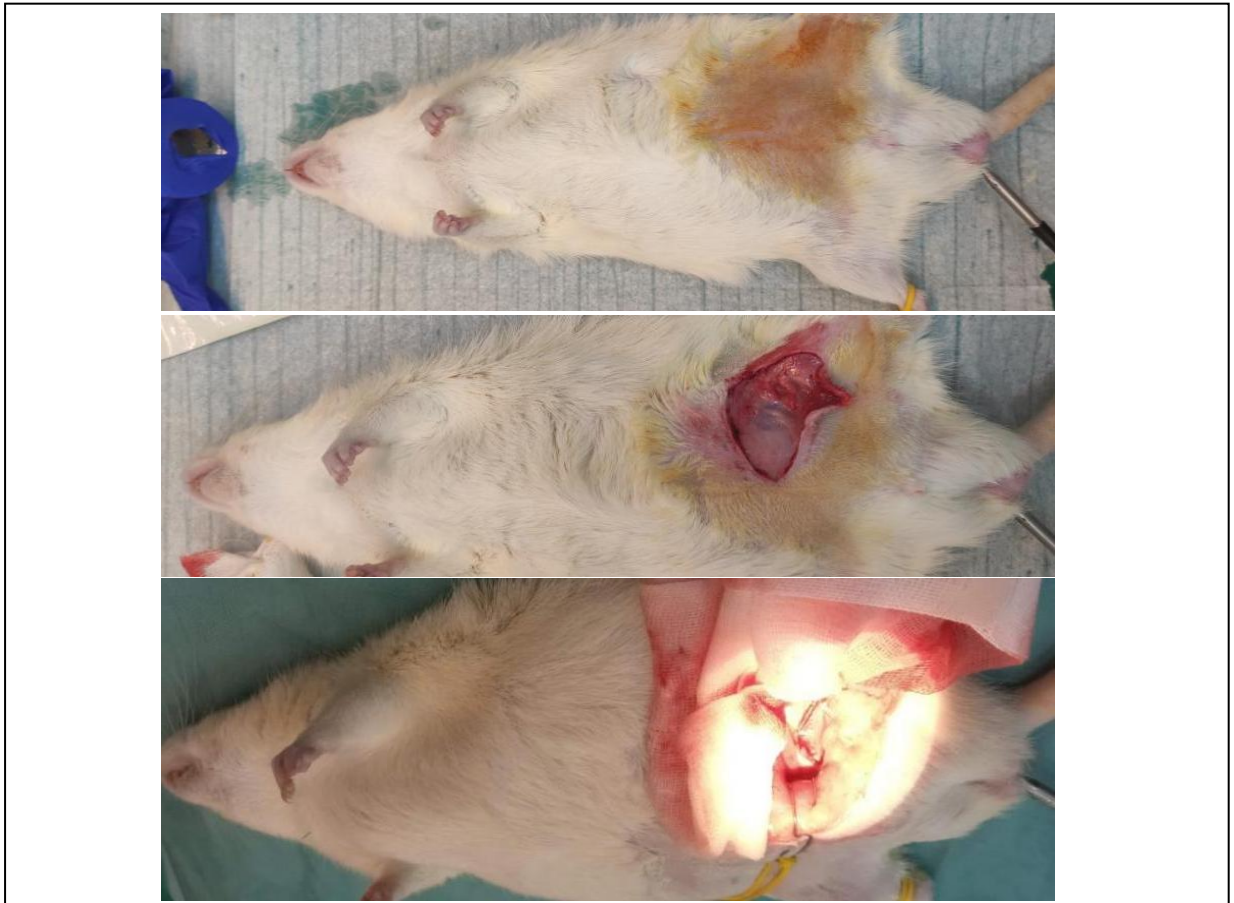


**Figura 13. Aspectul macroscopic al grefelor compozit (os+vas) - de la animal de laborator NZWR prelevate și conservate la frigifer specializat la  $-82,5^{\circ}\text{C}$ .**

### **2.3. Cercetarea posibilităților de anastomozare microchirurgicală și testarea *in-vivo* a pediculului vascular decelularizat al alogrefelor osoase compozite (os+vas) .**

Etapa dată a fost aprobată în cadrul Comisiei de etică a cercetării nr. 118/18.10.2021 a UMF „G.T.Popa” Iași, România, cu numărul de înregistrare 25807, din 19.10.2021. Autorizarea de proiect nr. 44/04.11.2021 a Direcției Sanitar veterinară și pentru Siguranța Alimentelor Iași, România.

Testarea *in-vivo* a pediculului vascular decelularizat este etapa critică pentru a demonstra că „conducta” (artera) poate susține fluxul sanguin, din interior spre exteriorul grefei, fără a declanșa extravazare, tromboză sau o reacție imună acută. Fără un pedicul vascular funcțional osul masiv transplantat nu va fi perfuzat, transformându-se dintr-o grefă vie într-un sechestrul osos mort, predispus la infecție și resorbție (osteoliză).

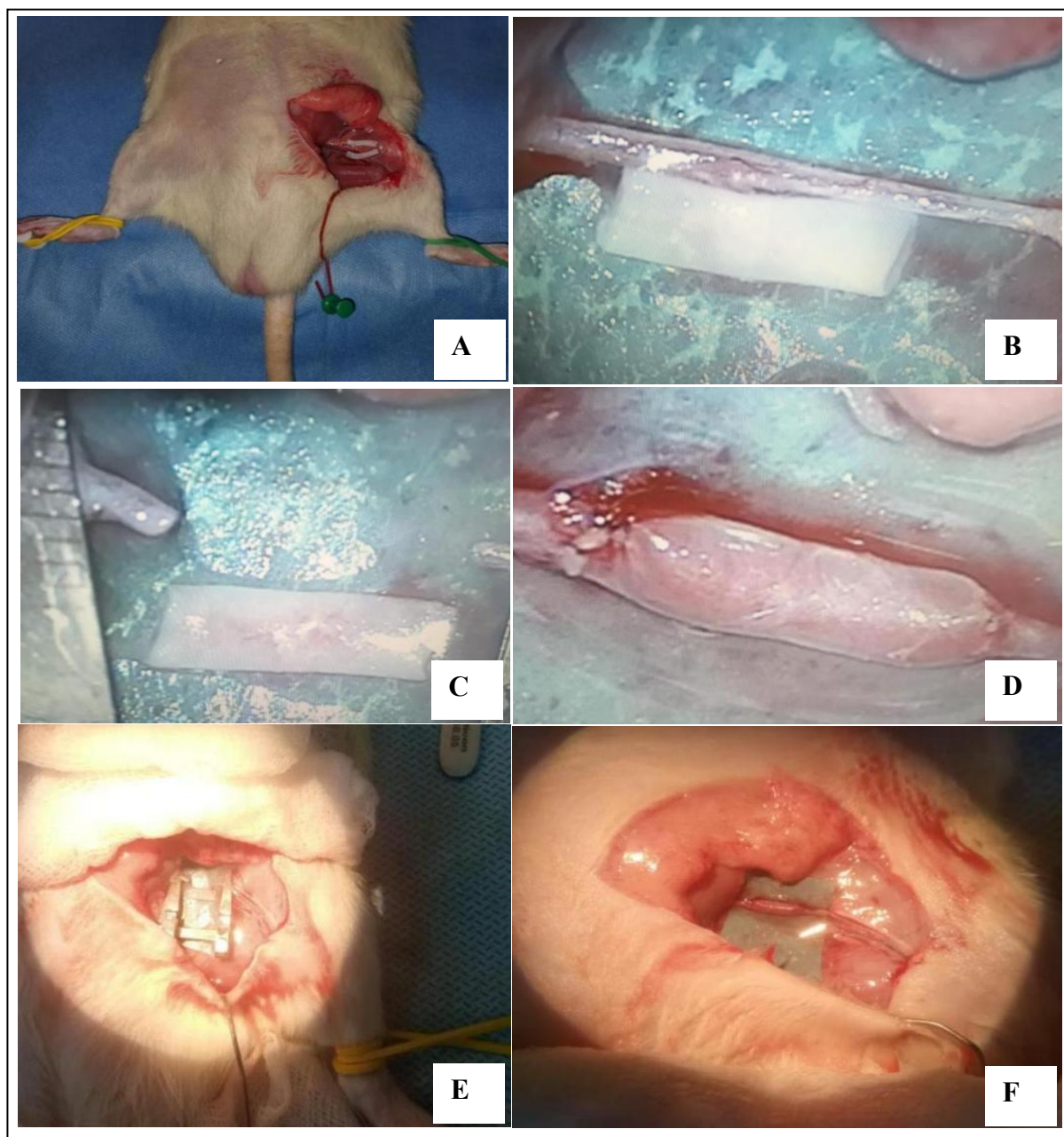


**Figura 14. Aspect macroscopic al abordului chirurgical în triunghiul femural la animal de laborator - șobolan Wistar- testarea *in-vivo* a proprietăților mecanice ale arterei femurale decelularizate.**

Artera femurală decelularizată prin metodă mixtă - eficientă și pentru țesut osos cortical și spongios, a fost testată *in-vivo* pe 5 șobolani (Wistar) în cadrul laboratorului microchirurgical al CEMEX, UMF „G.T.Popa” Iași, România. Segmentele de artere au fost prelevate de la cadaverele animalelor de laborator medii NZWR și supuse procesului de decelularizare mixtă în cadrul Laboratorului de Inginerie Tisulară și culturi celulare al USMF ”N. Testemițanu”.

Grefele decelularizate au fost incluse microchirurgical prin anastomoze termino-terminale în circuitul sanguin pe artera femurală la 5 șobolani (Wistar) pentru testarea proprietăților mecanice - figura 14 , figura 15. Rezultatele experimentului au cuprins observări obiective și cercetări histologice. Timp de 60 de minute, grefele au fost monitorizate *in-vivo* pentru a fi cercetați următorii parametri (biomecanici și de permeabilitate) care au fost înregistrați:

1. menținerea undei pulsatile la intervale de timp - 10, 30,50 minute;
2. menținerea TA la intervale de timp - 10, 30, 50 minute;
3. menținerea fluxului sanguin distal de grefă prin testul de patență la intervale de timp - 10, 30, 50 minute - figura 15.



**Figura 15. Abordului chirurgical în triunghiul femural la animal de laborator.**

(șobolan Wistar). A - aspect macroscopic, B. - aspect microscopic al segmentului de arteră decelularizată comparativ cu artera femurală șobolan, C. crearea defetului segmentar de arteră nativă, D. anastomoză termino-terminală, E.aspect macroscopic anastomoză terminoterminală, F. aspect macroscopic al anastomozei termino-terminală *in-vivo* a arterei decelularizate prin metodă mixtă.

După sacrificarea animalului, eutanasierea prin hiperdoză de anestezic sau soluție de pentobarbital de sodiu injectată intravenos [66], a fost prelevat material biologic fixat cu soluție de formol 10% pentru examinarea histologică. Segmentele prelevate au fost preparate prin colorația hematoxilină-eozină pentru aprecierea histologică sub microscopul optic a următoarelor aspecte: - deteriorarea matricei extracelulare în timpul manipulărilor mecanice (histologic), -

formarea trombusului obstructiv (histologic), - compararea aspectului morfologic pre și post testare *in-vivo* - prezența materialului celular gazdă.

#### **2.4. Stabilirea protocolului de anestezie și operator pentru aprecierea fezabilității plastiei defectelor osoase tubulare prin osteosinteză ortotopică și includerea în circuitul vascular adoptiv al alogrefei compozit decelularizate**

Testarea *in-vivo* a protocolului de anestezie și a celui intra-operator pentru plastia defectelor osoase tubulare prin osteosinteza și includerea în circuitul vascular adoptiv al alogrefei osoase vascularizate decelularizate la NZWR a fost aprobată în cadrul Comisiei de etică a cercetării nr. 118/18.10.2021 a UMF „G.T.Popa” Iași, România, cu numărul de înregistrare 25807, din 19.10.2021. Etapă ce asigură fezabilitatea unui experiment pilot chirurgical. Autorizarea de proiect nr. 44/04.11.2021 a Direcției Sanitar veterinară și pentru Siguranța Alimentelor Iași, România. La această etapă a fost efectuată cercetarea *in-vivo* pe 6 animale de laborator medii NZWR pentru:

**I.** Elaborarea protocolului de anestezie la animal de laborator mediu NZWR - sedare, inducție, menținere. Protocol ce ar asigura efectuarea unei intervenții de lungă durată (80-240 minute) pe animal de laborator NZWR, cu două etape chirurgicale:

- a. osteosinteză ortotopică a unui os tubular lung -*os femoralis*,
- b. anastomoză microchirurgicală pe pedicul vascular decelularizat.

**II.** Elaborarea protocolului operator de plastie *in-vivo* a defectelor osoase tubulare prin alogrefe vascularizate decelularizate reincluse în circuitul vascular adoptiv. Am cercetat:

**A.** Abordul intermuscular lateral - pentru osteotomie și osteosinteză ortotopică a alogrefei osoase decelularizate,

**B.** Abordul medial pentru anastomoza latero-terminală a pediculului decelularizat al alogrefei osoase cu artera femurală din circuitul gazdă.

##### **2.4.1. Elaborarea și testarea *in-vivo* a protocolului de anestezie la animal de laborator mediu NZWR**

**A. Etapa preoperatorie:** Această etapă a fost efectuată conform Ghidurilor privind anestezia și analgezia animalelor de laborator -Universitatea Michigan și Anestezia specifică a iepurelui NZWR - Universitatea din Texas din Austin, ulterior adaptate necesităților intraoperatorii studiului nostru [64, 65]. Animalele au fost ținute în carantină timp de minim 72 de ore, cu scop de adaptare la contact manual și evaluare pentru semne clinice evidente de boală. Acestea au fost cântărite înainte de operație pentru a asigura administrarea corectă a medicamentelor. Iepurii nu pot vomita, prin urmare repausul alimentar este obligatoriu.



**Figura 16. Etapa preoperatorie - Monitorizarea animalului pentru perioada intraoperatorie (TA, Ps, T<sup>0</sup>C intrarectală ).**

Ei tind să acumuleze alimente și lichid în cavitatea bucală și oro-faringe. Din acest motiv, se recomandă o pauză alimentară preanestezie de 1-4 ore. Astfel, se diminuează, de asemenea, volumul total al tractului gastrointestinal, reducând astfel presiunea asupra diafragmei în timpul anesteziei. Pauza alimentară pentru perioade mai lungi de timp îi poate predispune la ileus postoperator și poate scădea nivelul glicemiei. Înclinarea mesei chirurgicale astfel încât capul iepurelui să fie ușor ridicat reduce presiunea asupra diafragmului. Unguentul oftalmic trebuie aplicat pentru a preveni uscarea corneei în timpul intervenției [64]. Monitorizarea Ps, Pa O<sub>2</sub>, TA

a fost efectuată prin Advanced® PO-100B - Pulse Oximetre. Monitorizarea temperaturii intrarectale și menținerea temperaturii corpului pe durata intervenției a fost posibilă prin utilizarea Harvard Homeothermic Blanket Control Unit 115 V, 60 Hz 55VA. A fost preparat cămăul operator prin frezare a blănii regiunea medială și laterală a membrului posterior - figura 16. Protocolul de anestezie stabilit pentru intervenția chirurgicală de lungă durată la animale de laborator de talie medie (iepure NZWR) a presupus trei etape:

1. Sedarea a început cu inhalarea soluției de Izofluran 1000mg / 250ml 3-5 % în camera de inducție.

2. Inducția a continuat cu administrarea intramusculară în *m. gluteus* de Ketamina 44 mg/kg combinată cu soluție de Xilazină 3 mg/kg.

3. Menținerea s-a realizat cu 2-3% Isofluran 1000mg/250ml până la finalul intervenției chirurgicale. În caz de creșterea nivelurilor de Ps/min, FR/min, TA, a fost administrată 1/3 din doza de sol. Ketamina 44 mg/kg pe cale intramusculară. Asigurarea unui suport fluid în timpul intervenției este importantă în special dacă durează 30 minute sau mai mult. Soluția salină sau sol. NaCl<sub>2</sub> 0.9%-250ml, pe cale intravenoasă a fost administrată prin vena auriculară laterală cu doza de 12 ml/kg/h. Profilaxia antibiotică preoperatorie am efectuat prin soluție intramusculară de Ceftriaxonă cu 24 de ore înainte de operație, doza de 100 mg/kg [64, 65].

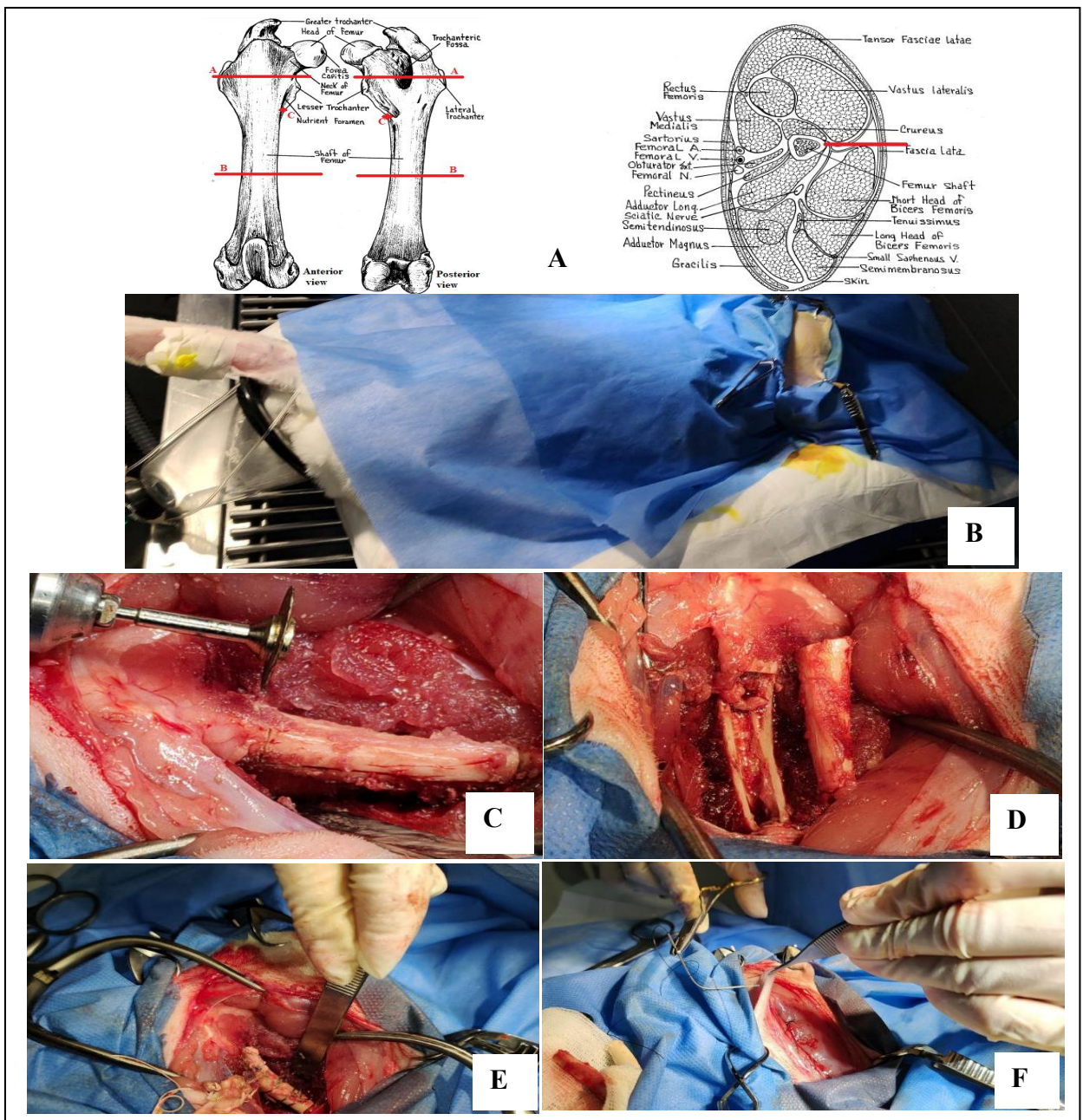
#### **2.4.2. Elaborarea și testarea *in-vivo* a protocolului operator**

Plastia defectelor osoase tubulare prin alogrefe vascularizate decelularizate reincluse în circuitul vascular adoptiv a fost posibilă prin protocolul intraoperator ce a fost divizat în două etape, pentru a permite un abord suficient în cazul anastomozei microchirurgicale. Astfel, am analizat abordul lateral și medial al coapsei pentru modelul animalului de laborator - 6 iepuri NZWR.

A. Abordul intermuscular lateral - pentru osteotomie și osteosinteză ortotopică a defectului osului tubular cu alogrefă vascularizată decelularizată:

1. Prepararea câmpului operator: Iepurele a fost culcat în decubit lateral. Zona a fost rasă și a fost preparată aseptice cu Betadină și sol. Alcool 96%. Câmpul chirurgical a fost apoi drapat într-o manieră sterilă. Soluția de lidocaină 2%-4ml pentru anestezie locală a fost administrată subcutanat și intramuscular.

2. Incizia liniară a țesutului cutanat, de-a lungul părții ventrale a coapsei, prin fascia superficiale și lata, prepararea accesului între *m. vastus lateralis* și capul scurt al *m. biceps femoris*, cu accesul la partea laterală a diafizei osului femural situată între *m. crureus* și *m. vast intermedius*. Linia de incizie a fost trasată între cresta iliacă anterioară-superioară și condilul lateral femural, de-a lungul marginii craniene a femurului, folosind lama standard nr. 22.



**Figura 17. Abordul intermuscular lateral al coapsei**

A. - schema formării defectului osos vast, linia de acces chirurgical lateral. B. - decubit lateral al animalului cu izolarea câmpului operator. C. - procedura chirurgicală de creare defect osos tubular critic, D - aspectul defectului osos tubular creat prin abord lateral intermuscular al regiunii laterale al coapsei, D. - grefarea ortotopică și osteosinteza defectului osos, E - suturarea plăgii pe straturi.

Odată incizată pielea, fascia lata a fost tăiată cu o pereche de foarfece până când s-a ajuns la os. Fascia subcutanată a fost incizată pe aceeași linie cu incizia cutanată.

3. Am efectuat incizia pentru pregătirea accesului între *m. vastus lateralis* și capul scurt al *m. biceps femoral*, cu obținerea abordului în partea laterală a diafizei femurului, situat între *m. crureus* și *m. vastus intermedius*. Cele două linii de osteotomie (pentru osteotomia segmentară de

2,5 cm lungime) au fost efectuată între linia A ( treimea superioară și trohanterul mic) și linia B (treimea distală a diafizei femurale) - figura 17. Osteotomia s-a făcut cu fierăstrăul electric, sub irigarea abundentă cu ser fiziologic în timpul tăierii. În acest fel, am obținut un defect osos masiv al osului tubular lung. Grefa osoasă compozit decelularizată prin abord lateral intermuscular al coapsei a fost osteosintetizată ortotopic, reparând astfel defectul osos critic format în prealabil. Metodele de osteosinteză au fost individuale, incluzând palcă și șurub, serclaj sau mixte. Grefa osoasă a fost poziționată ortotopic cu pediculul vascular protejat spre fosa inghinală (partea medială). După, am făcut sutura în straturi a plăgii chirurgicale. Fascia a fost suturată cu catgut, iar pielea a fost suturată cu mătase - figura 17.

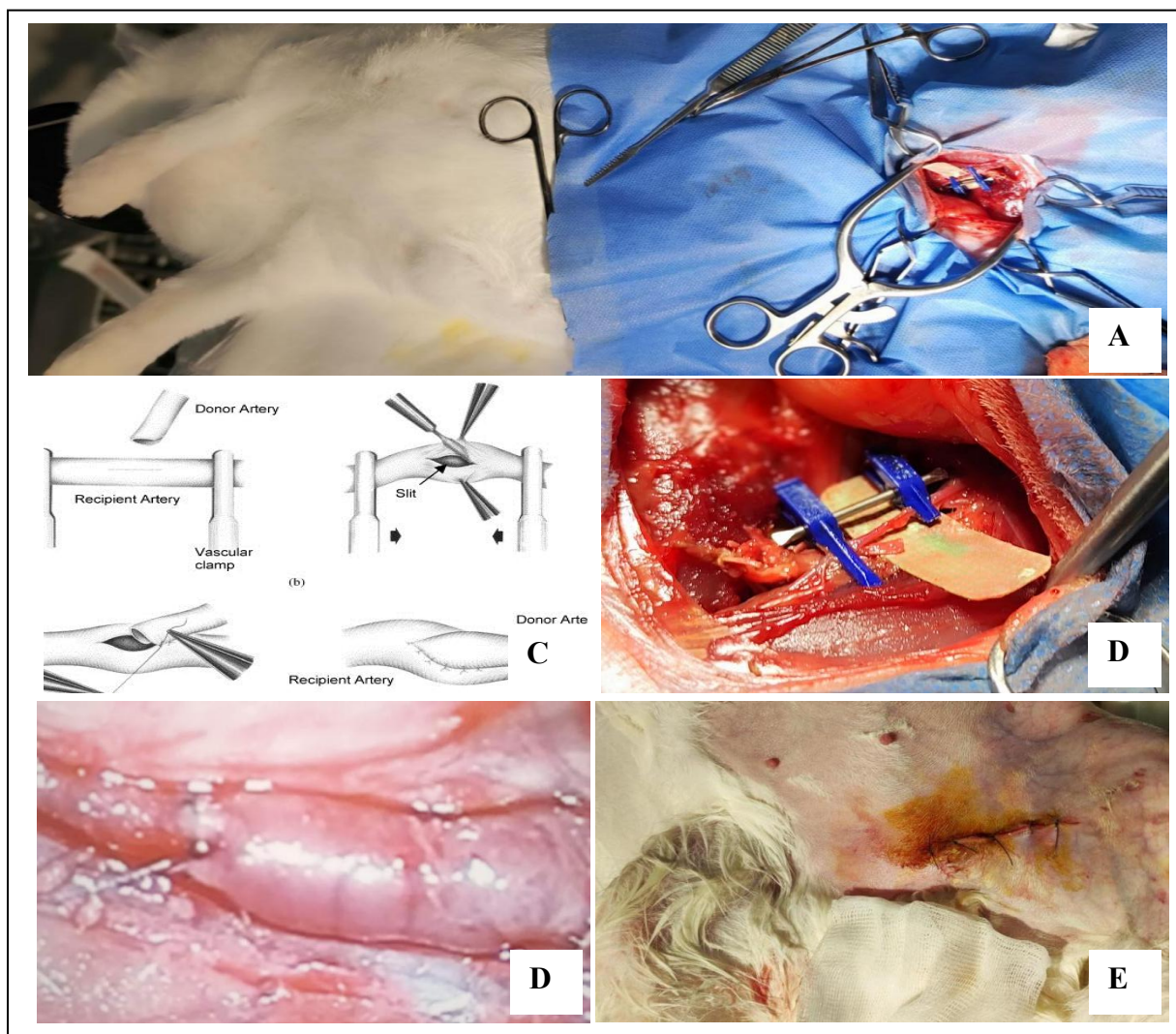
### **B. Abordul medial pentru anastomoza termino-laterală a pediculului grefei cu artera femurală a organismului gazdă.**

Abordul medial pentru anastomoza latero-terminală a pediculului decelularizat al alogrefei osoase cu artera femurală din circuitul gazdă a fost împărțită în 3 etape.

Prima etapă a fost pregătirea câmpului operator și abordul macroscopic medial al pediculului. Fasciculul neurovascular include arteria, vena și nervul femural, fiind situat pe *m. obturator* și *m. pectineus*. Iepurele a fost așezat în decubit dorsal pe masa de operație cu membrul pelvin abduct și femurul perpendicular pe coloana vertebrală (poziția piciorului de broască). Zona a fost rasă preoperator și preparată aseptice cu soluții de Betadină și alcool etilic 96%. Câmpul chirurgical a fost apoi drapat într-o manieră sterilă. S-a făcut o incizie liniară a pielii de-a lungul părții mediale a regiunii inghinale până la regiunea coapsei. Linia a fost realizată paralel cu teaca femurală și perpendicular pe treimea mijlocie a ligamentului inghinal, folosind lama nr. 22.

1. Pregătirea microchirurgicală și anastomoza cap-lateral în triunghiul femural au fost a doua etapă. Învelișul arterei femurale a fost omis folosind micro-disecția cu bont îndreptare de-a lungul axei sale lungi între artera femurală lateral, nervul și vena medial. Înainte de anastomoză, artera femurală receptor a fost detașată din țesutul adipos periarterial și s-a efectuat adventicectomia.

S-a preparat vasul arterial al alogrefei osoase decelularizate în aceeași manieră tehnică. Artera femurală a fost disecată și izolată la cel mai proximal și cel mai mare calibru, cu o panglică colorată sub ea pentru un contrast mai bun. Înainte de secționare, o clamă vasculară dublă metalică a fost poziționată proximal și distal până în acest punct pentru a întrerupe temporar fluxul sanguin în segment. Capătul arterei donatoare a fost tăiat oblic și dimensiunile eliptice în secțiune transversală au fost măsurate și făcute prin fanta de pe artera gazdă - figura 18.



**Figura 18. Abordul medial al coapsei animal de laborator NZWR**

A. - decubit lateral al animalului de laborator NZWR pentru anastomoza microchirurgicală termino-laterală a arterei iliace interne gazdă cu pediculul grefei osoase vascularizate decelularizate, B. - schema anastomozei terminolaterale, C.- aspect macroscopic al arterei gazdă și a pedicolului decelularizat al grefei, D. - aspect microscopic al anastomozei termino-aterale, E.- sutura pe straturi al abordului medial al coapsei

După secționare, când grupul de vase a fost scufundat, regiunea de sutură a fost irigată cu soluție salină heparinizată. În timpul anastomozei, artera gazdă a fost tăiată pe o lungime care depășește puțin diametrul arterei donatoare. Artera donatoare a fost întinsă și suturată pe recipient. Anastomoza a fost efectuată folosind mono-nylon 9/0, cu un ac cerc 3/8, lungime 0,65 cm. După ce am făcut sutura microchirurgicală, am verificat permeabilitatea prin testul de patență al anastomozei.

2. La sfârșitul procedurii, a urmat închiderea anatomică de la mușchi la piele cu sutură de nailon mono-filament 5/0- figura 18.

### 2.4.3. Etapa postoperatorie

În etapa postoperatorie după finalizarea intervenției chirurgicale, s-a efectuat radiografia membrului posterior și o supraveghere timp de 48 de ore. În timpul supravegherii s-au administrat analgezice și antibioterapie (sol. Dexketoprofen 3mg/kg/24h și sol. Ceftriaxonă 300mg/kg/24h). Eutanasierea s-a făcut prin hiperdoză de anestezie sau soluție Pentobarbital de sodiu injectată intravenos. Acest lucru are un efect imediat fiind cel mai acceptabil agent pentru eutanasiere [66]. Rezultatele înregistrării datelor protocolului operator au inclus parametrii măsuțați în timpul intervenției chirurgicale, au fost calculați indicatori ai tendinței centrale a variabilelor prestabilite:

- masa corporală medie a animalelor de laborator NZWR în grame
- durata necesară pentru sedare cu sol. Izoflurane 5%- 1000mg/250ml (min)
- durata intervenției chirurgicale pentru Etapa I+ Etapa II- abordul medial și lateral (min)
- durata osteosintezei ortotopice (Etapa I) (min)
- durata anastomozei microchirurgicale termio-laterale Etapa II (min).

Pentru a determina dacă există dovezi statistice privind diferențele dintre mediile celor șase subiecți de studiu și pentru a evalua corelațiile dintre variabile într-un eșantion mic (6 animale), am utilizat teste neparametrice în caz de absență a unei distribuții normale a datelor.

### 2.5. Studiarea manifestărilor postoperatorii locale și generale după plastia cu alogrefă osoasă vascularizată pe loturi de animale de laborator NZWR.

Conform protocolului de anestezie și operator stabilit în etapa anterioară (abordul intermuscular lateral - pentru osteotomie și osteosinteză și abordul medial pentru anastomoza latero-terminală a pediculului cu artera femurală) în ultima etapă a cercetării a fost efectuată studiarea comparativă pe 3 loturi a câte 4 animale de laborator, iepuri NZWR:

- Lot 1- plastia defectelor osoase tubulare vaste cu autogrefă osoasă compozit
- Lot 2- plastia defectelor osoase tubulare vaste cu alogrefă osoasă compozit nativă
- Lot 3- plastia defectelor osoase tubulare vaste cu alogrefă osoasă compozit decelularizată.

În perioada 06.2022 - 12.2022, au fost dislocate în cadrul vivariului USMF "N. Testemițanu" 12 animale de laborator - NZWR din lotul de animale finanțate de către Școala doctorală în domeniul științe medicale a USMF „Nicolae Testemițanu”.

Cercetarea postoperatorie la fiecare subiect al studiului a implicat următorii parametri:

#### A. Manifestările locale postoperatorii:

- aspectul plăgii: *tumor, calor, rubor*, eliminări, cicatrizare - la interval de 1-a, 5-a, 10-a, 15-a zi postoperator



**Figura 19. Examinare clinică, paraclinică și imagistică postoperatorie a animalelor de laborator pe loturi de studiu.**

- funcționalitatea membrului operat: sprijin pe membru, mers, salt - la interval de 1-a, 5-a, 10-a, 15-a zi postoperator - figura 19.

#### B. Manifestări paraclinice postoperatorii:

- Analiza generală de sânge cu formula leucocitară - a fost efectuată după o prelevare de sânge intravenos din vena auriculară posterioară a NZWR cu depozitarea ulterioară în eprubete pentru examinare și determinarea manifestărilor de inflamație postgrefare.

- Analiza biochimică de sânge cu indicii metabolismului osos: Ca, P, Fosfataza Alcalină - ca indicii osoși pentru examinarea gradului de osteoliză postransplant în loturile de studiu. Acești trei parametri formează un triptic biochimic esențial pentru monitorizarea stabilității grefei. Evoluția lor combinată oferă o informație a succesului sau eșecului biologic de integrare postransplant. Fosfataza alcalină: este indicatorul de construcție. Dacă nivelul crește constant post-transplant, sugerează o integrare activă și o revascularizare reușită (osteoblastele funcționează). Calciul (Ca): Este indicatorul de distrugere (osteoliză).

**Tabelul 2. System for Evaluation of the Fracture Healing of Bone Defects on Radiography** - criteriile pentru aprecierea gradului de consolidare postgrefare a defectelor osoase tubulare.

<b>Criteriile</b>		<b>Scor</b>
<b>Formarea de țesut osos</b>	- fără formare de țesut osos	1
	- țesut osos format cuprinde 25% din defect	2
	- țesut osos format cuprinde 50% din defect	3
	- țesut osos format cuprinde 5% din defect	4
<b>Consolidare osoasă radiografică totală</b>	-fără consolidare	1
	-posibilă consolidare	2
	-consolidare	3
<b>Prezența joncțiunii osoase dintre grefă și țesut osos gazdă</b>	-fără conexiune	1
	-cortex cu trabecula	2
	-cortex cu cortex (o parte)	3
	-cortex cu cortex (două părți)	4
<b>Resorbția țesutului osos al grefei</b>	-fără semne de rezorbție	1
	-parțială rezorbție	2
	-rezorbție totală	3

O creștere a calciului seric (hipercalcemie) corelată cu prezența citokinelor inflamatorii indică faptul că grefa este resorbită prea repede de către sistemul imunitar. Fosforul (P): este indicatorul de echilibru metabolic, modificările sale în raport cu calciul seric, pot semnala o degradare masivă a matricei minerale a grefei, riscând să compromită rezistența mecanică a acesteia. Prin monitorizarea acestor indici în loturile de studiu putem diferenția între o remodelare fiziologică (necesară pentru ca grefa să devină parte din corpul receptorului) și o osteoliză patologică (care duce la fractura sau pierderea grefei) - figura 19.

C. Examinarea imagistică postoperatorie a animalelor de laborator NZWR pe loturi de studiu la a 14-a și 28-a zi.

Radiografia digitală standard a membrului posterior operat prin intermediul radiografiei digitale în una din două proiecții (antero-posterior sau lateral-oblică) prin intermediul *System for Evaluation of the Fracture Healing of Bone Defect* - Anexa 2.

Din acest sistem am selectat patru criterii pentru cercetarea imagistică a rezultatelor grefării vascularizate a defectului osos tubular pe loturile de studiu:

- formarea de țesut osos
- consolidare osoasă totală
- resorbția țesutului osos al grefei
- prezența joncțiunii osoase dintre grefă și țesut osos gazdă - tabelul 2.

D. Examinarea histologică a grefelor. Segmente de grefe au fost prelevate pre- sau intraoperator și după sacrificarea animalului la 30 zile postoperator cu examinarea prin colorație

hematoxilină-eozină a componentului osos și vascular. Osul femural al membrului operat la NZWR, după sacrificare, a fost rezecționat, eliberat de țesuturi moi care nu prezentau interes și secționat segmentul greșat. Pentru cercetări histologice, piesele anatomice au fost fixate în soluție de formol neutralizat de 10%.

Din locul defectului au fost secționate fragmente de țesut osos care, ulterior, au fost decalcificate în soluție de acid azotic de 15% și au fost plasate în parafină. Cu microtomul au fost făcute secțiuni histologice de 7-10 micrometri în grosime și au fost colorate prin tehnica de hematoxilină-eozină, după procedeul Van-Ghizon. Secțiunile histologice au fost realizate în cadrul laboratorului de morfopatologie; în total, au fost analizate 56 de secțiuni histologice.

## **2. 6. Metode matematice de sinteză a rezultatelor cercetării experimentale**

Pentru analiza datelor statistice din acest manuscris, am folosit metodele statisticii descriptive cantitative prin intermediul IBM SPSS Statistics 26.0.0.1 FP001- soft.

Rezultatele fiecărei etape a studiului, care corespund cu obiectivele acestuia, au fost cercetate statistic în corespundere cu tipul de date colectate și variabilele utilizate. Acestea au fost examinate conform bazelor de date elaborate pentru fiecare etapă. Toate testele statistice au fost comparate cu valorile  $P < 0.05$  pentru analizarea aspectului lor de semnificație statistică.

Primar am apreciat distribuirea variabilelor, sau modul în care valorile unei variabile sunt distribuite în cadrul unui set de date, pentru aprecierea comportamentului acestora și aprecierea testelor statistice necesare. Pentru a vizualiza variabilele numerice și a evidenția diferențele între grupuri sau relațiile dintre variabile, au fost utilizate grafice de tip box-plot, ajustate în funcție de testele statistice aplicate.

Pentru comparații între loturile independente, s-a aplicat testul Kruskal-Wallis atunci când variabila dependentă nu urmează o distribuție normală, la fel testul t pentru eșantion unic (One-Sample t-Test). Analiza post-hoc a fost efectuată pentru a identifica diferențele specifice între grupuri. A fost utilizat testul Dunn sau comparații pereche cu valori  $p$  ajustate. În cazul a trei sau mai multe loturi independente cu variabilele numerice cu distribuție simetrică - a utilizat testul ANOVA (one-way sau two-way ANOVA, în funcție de ipoteza cercetării).

Am calculat statisticile descriptive de bază, incluzând valorile minime și maxime, media și abaterea standard, mediana, percentila 25 și 75, precum și abaterea intercuartilică. Compararea variabilelor numerice și nominale între grupuri a fost realizată în funcție de numărul de grupuri și de ipoteza testată. Pentru variabilele categorice, au fost calculate frecvențele absolute și relative, însoțite de intervale de încredere de 95% pentru frecvențele relative.

## 2.7. Limitările studiului experimental preclinic expus

Un studiu pilot chirurgical testează și optimizează o tehnică chirurgicală înainte de a fi aplicată pe scară largă. Acest tip de experiment permite identificarea timpurie a problemelor legate de metodă, complicații sau variabilitatea rezultatelor. Reduce riscurile pentru animale și optimizează designul unui studiu succesiv. Cercetarea tehnicii chirurgicale descrise va permite evaluarea fezabilității, siguranței și a impactului noii tehnici chirurgicale. Studiile pilot chirurgicale folosesc frecvent 4 - 6 animale per grup pentru a estima variabilitatea și pentru a ghida un studiu ulterior de amploare. Reducerea numărului de animale este etic justificată, conform principiului 3R (3R: *Reduce, Refine, Replace*). Puterea statistică poate fi optimizată prin măsurători repetate pe același animal (ex. Evaluări clinice, paraclinice și histologice la mai multe intervale de timp). Dacă studiul va arata tendințe promițătoare, un studiu extins ulterior cu 20 animale per grup ar fi recomandat pentru confirmare [141]. Puterea statistică mică a rezultatelor, nu permite detectarea unor efecte mici, iar concluziile nu pot fi generalizate la o populație mai mare. Lipsa randomizării complete prin distribuirea animalelor în grupuri ce poate fi influențată de factori externi, ducând la bias de selecție.

Altă limitare este variabilitate biologică ridicată, iar diferențele individuale între animale (ex. vârstă, greutate, răspuns biologic) pot influența rezultatele și masca efectele reale ale intervenției chirurgicale. La fel, modelele animale pot să nu reflecte perfect fiziologia umană, limitând aplicabilitatea clinică a tehnicii chirurgicale testate. Anatomia, răspunsul imun și procesele de vindecare diferă între specii. Timpul de urmărire fiind limitat ceea ce nu permite evaluarea completă a vindecării pe termen lung sau a complicațiilor tardive.

Drept concluzie, studiul chirurgical experimental pilot efectuat oferă informații preliminare valoroase, dar are limitări legate de eșantion, variabilitate biologică, extrapolarea în clinică și puterea statistică. Rezultatele trebuie validate ulterior într-un studiu experimental extins, randomizat și controlat pentru a obține concluzii clinice solide pentru etape clinice de testare a metodei de tratament.

### 3. CERETAREA PREMISELOR PLASTIEI DEFECTELOR OSOASE TUBULARE CU ALOGREFE OSOASE VASCULARIZATE DECELULARIZATE

#### 3.1. Vascularizarea arterială a membrului posterior la animal de laborator

În urma cecetării macroscopice a vascularizării membrului posterior pe 10 cadavre de animal de laborator - NZWR, am determinat că fiecare *arteră iliacă comună* dă *artera ilio-lombară* care alimentează peretele dorsal al corpului iepurelui. Ulterior, *artera iliacă comună* se împarte în *artera iliacă internă* care alimentează organele pelvisului, și *artera iliacă externă* care alimentează membrul posterior. *Artera iliacă externă* se termină cu o arteră femurală în fiecare membru posterior, care are ramificații femurale circumflexe – laterale și mediale care trec în jurul articulației șoldului pentru a se termina ca o contribuție la anastomoza trohanterică. Din *artera iliacă externă*, *arterele cervicale anterioare* coboară spre colul femural.

O altă ramură a aceleiași artere este implicată în nutriția femurului - *artera fosei trohanterice*. *Artera femurală circumflexă* izvorăște direct din artera femurală, din distal spre lateral, trece în jos cu 2-2,5 cm înainte de a dispărea în foramenul nutritiv situat pe suprafața medială a diafizei, chiar sub trohanterul mic. Deci, principala arteră nutritivă a femurului de iepure începe din artera femurală circumflexă laterală. În partea distală de artera femurală începe *arteria suprema genu*.

Apoi, artera femurală continuă ca artera poplitea, dând origine *arterelor supracondiliene* (geniculare), care trec spre exterior, furnizând artere fine nutritive pe fața posterioară a metafizei inferioare și condililor. Ele unesc ansele condiliene mediale și laterale. Din *artera poplitee* începe artera tibială anterioară. Artera geniculară de dimensiuni considerabile apare de aici și străpunge capsula articulară, trece deasupra punctului de încrucișare a ligamentului încrucișat și se scufundă într-un foramen în peretele anterior al creștăturii intercondiliene.

Artera nutritivă principală a tibiei, derivată din *artera tibială anterioară* coboară pe suprafața posterioară a osului înainte de a ajunge la canalul nutritiv, situat la 5 mm deasupra nivelului sinostozei tibio-fibulare. A doua arteră nutritivă principală eliberată de tibial anterioară la sinostoză se scufundă în os, chiar sub nivelul de fuziune. Axul porțiunii fibulare a osului nu are o arteră nutritivă proprie.

*Artera safenă* se împarte în *arterele plantare mediale și laterale* - figura 9.

Drenajul venos: O singură *venă comitans* însoțește fiecare arteră. Pe suprafața superficială se formează un cerc venos simplu al fiecărui condil. *Vena intercondiliană femurală* se unește cu *vene intercondiliene tibiale*, care vor forma *vena tibială anterioară*. Venele segmentului tibio-fibular prezintă caracteristici generale care au fost descrise pentru segmentul femural.

**Tabelul 3. Statistici descriptive pentru variabila - Lungime femur (milimetri).**

Numarul total	Valid	10
	Lipsă	0
<b>Media</b>		96,53000
<b>Eroarea standard a mediei</b>		1,141933
<b>Mediana</b>		97,75000
<b>Modul</b>		89,000 <sup>a</sup>
<b>Deviația standard</b>		3,611109
<b>Range</b>		1,800
<b>Minimum</b>		89.00
<b>Maximum</b>		107.00
<b>Percentilele</b>	25	93,37500
	50	97,75000
	75	98,97500

Următoarele puncte individuale trebuie remarcate, precum vena de la marginea diafizei fibulare, de sub sinostoză, ce se scurge în vena peroneală, pe suprafața posterioară a tibiei; două și ocazional trei vene mari pornesc din os. Venele din creasta intercondiliană se alătură celor care drenează epifiza femurală inferioară și trec în cele din urmă în vena tibială anterioară.

Rata fluxului de sânge contrastat prin artera nutritivă principală a femurului din *artera femurală circumflexă* indică faptul că aceasta contribuie la 70-80% din suprafața femurului (în funcție de zona epifizară, metafizară sau diafizară) - figura 11.

### **3.2. Lungimea alogrefei compozit în corelație cu un defect osos critic**

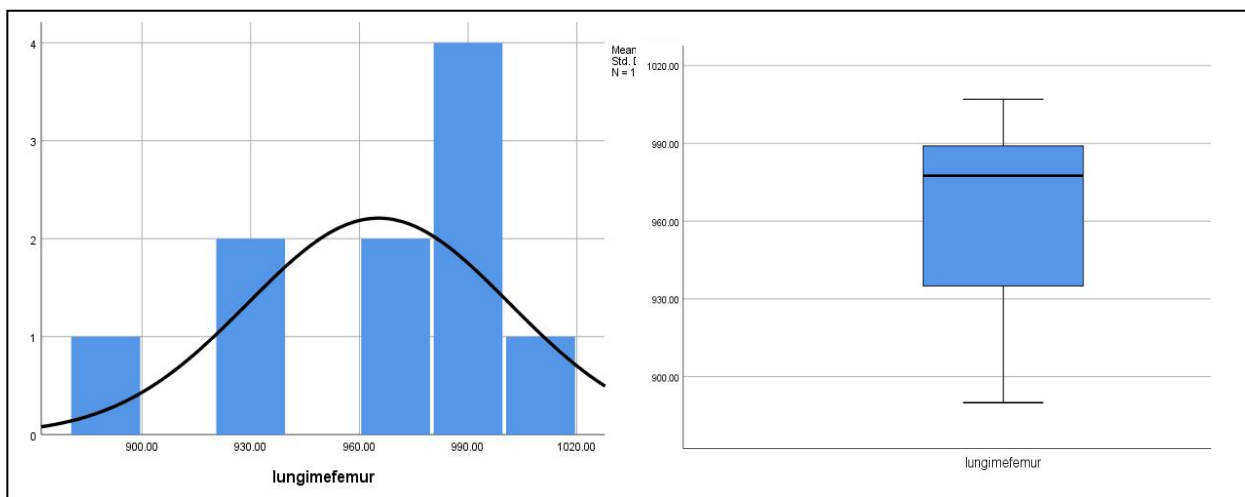
Interpretarea statisticilor descriptive pentru variabila Lungime femur măsurată în milimetri la 10 cadavre de animale de laborator NZWR arată următoarele:

- Media = 96,53 mm, Mediana = 97,75 mm, Modul = 890 mm (valoare multimodală),
- Abaterea standard = 36.11 mm, Interval = 18 mm (Minimum: 89 mm, Maximum: 107 mm),
- Percentile (25%: 93,375 mm, 50%: 97,75 mm, 75%: 98,975 mm) - tabelul 3.

Deci, media lungimii femurului este de 96,53 mm, iar abaterea standard de 3,611 mm indică o variație moderată a valorilor. Distribuția este ușor asimetrică spre stânga, întrucât modul (cea mai frecventă valoare – 890 mm) este semnificativ mai mic decât media și mediana.

Mediana și percentila 50 coincid (97,75 mm), ceea ce confirmă o distribuție aproape normală în zona centrală. Intervalul de variație este de 18 mm, cuprins între un minim de 89 mm și un maxim de 107 mm.

Analiza distribuției impune compararea mediei și medianei, unde media (96,53 mm) < mediana (977.5 mm), deci se suspectă o posibilă asimetrie spre stânga (negativă). O abatere standard de 36.11 mm nu indică o variabilitate mare în date - figura 20 .



**Figura 20. Histograma cu curba normală și Box-plot cu valorile extreme ale variabilei Lungime femur.**

**Tabelul 4. One-Sample t-Test-comparare mediei cu o valoare de referință - lungimea alogrefei osoase cu pedicul vascularizat (Test Value = 42).**

	t	df	Sig. (2-tailed)	Diferența medie	95% Interval de Încredere de 95%	
					Inferior	Superior
<b>Lungime femur</b>	4.77	9	.001	545.300	519.4677	571.1323

Putem utiliza teste parametrice cum ar fi Testul t pentru eșantion unic (One-Sample t-Test) pentru a compara media cu o valoare de referință ipotetică care a fost egală cu 42 mm, ce reprezintă lungimea alogrefei osoase cu pedicul vascularizat prelevate - figura 13.

Detalii despre rezultatele testului  $Test\ Value = 42$  mm ce este lungimea grefei, indică valarea  $t=4,7752$ , deci diferența dintre media lungimii femurului și lungimea grefei de 42 mm este foarte semnificativă. O valoare t atât de mare indică o diferență semnificativă din punct de vedere statistic - tabelul 4.

Gradele de libertate (df = 9): Având în vedere un eșantion de 10 observații, gradele de libertate calculate sunt 9 (N - 1). Esențiale pentru evaluarea semnificației statistice a testului t.

Valoarea p (Sig. 2-tailed < 0.001): Rezultatul indică o valoare p extrem de mică (< 0.001), ceea ce semnaleză o diferență semnificativă statistic între media lungimii femurului și valoarea de referință de 42 mm. Astfel, ipoteza nulă, conform căreia lungimea femurului ar fi egală cu 42 mm, este respinsă cu un nivel ridicat de încredere.

Pentru a determina dacă lungimea grefei de 42 mm corespunde criteriilor pentru un defect osos tubular critic, conform definiției, trebuie să comparăm lungimea grefei cu cerințele specificate pentru defectul osos critic din definiție.

Compararea lungimii grefei de 42 mm cu aceste criterii, cum ar fi defectul pe o suprafață  $\geq 2$  cm<sup>2</sup>, adică se referă la o suprafață de cel puțin 2 cm<sup>2</sup>, iar grefa este de 42 mm lungime; pentru a îndeplini acest criteriu, lățimea defectului ar trebui să fie de cel puțin 1 cm. Dacă defectul are o lățime de 1 cm, suprafața defectului ar fi  $42 \text{ mm} \times 10 \text{ mm} = 250 \text{ mm}^2 = 2,5 \text{ cm}^2$ , ceea ce este mult mai mare decât 2 cm<sup>2</sup>, deci acest criteriu este îndeplinit.

Dimensiunea defectului trebuie să depășească capacitatea intrinsecă de auto-regenerare: fiind un criteriu mai general, care indică faptul că defectul trebuie să fie suficient de mare pentru a nu putea fi reparat prin procesele naturale de regenerare ale osului. Lungimea grefei de 42 mm pare să depășească acest prag, având în vedere că aceasta este mult mai mare decât cerințele pentru un defect osos critic și este imposibil să fie regenerată complet de organism. Confirmăm astfel validitatea modelului experimental prin crearea unui defect osos tubular critic, reprezentând aproximativ 43,5% din lungimea totală a segmentului femural la NZWR.

Deci, lungimea grefei de 42 mm corespunde criteriilor pentru un defect osos tubular critic. Prin urmare, alogrefa osoasă de 42 mm este suficientă pentru a trata un defect osos critic, conform acestor criterii din definiție. Defectul intraoperator pe care l-am creat a fost de o lungime cuprinsă între 42-45 mm, iar grefele prelevate, conservate și decelularizate pentru un asemenea defect osos au corespuns ortotopic.

### **3.3. Testarea *in-vivo* a pediculului vascular decelularizat prin metodă eficientă pentru alogrefele osoase compozite**

Timpe de 60 min grefele vasculare de tip arterial care au fost supuse preventiv procesului de decelularizare, incluse în circuitul gazdă prin anastomoza termino-termianlă, au fost monitorizate *in-vivo* pe 5 subiecți - șobolani WinStar. Obiectiv au fost înregistrați următorii parametri:

- menținerea undei pulsatile la 10, 30, 50 minute
- menținerea TA la 10, 30, 50 minute
- menținerea fluxului sanguin distal de grefă prin *milking-test* la 10, 30, 50 minute.

Acești parametri i-am utilizat pentru a evalua viabilitatea și performanța grefei vasculare decelularizate după anastomoza microchirurgicală, în scopul de a obține informații despre capacitatea grefei de a se integra în sistemul circulator și de a furniza sânge la țesutul osos din interior spre exterior, țesut care urmează să fie transplantat ortotopic ca alogrefă osoasă vascularizată decelularizată.

Pentru analiza comparativă a diferențelor dintre condițiile studiate, variabilele au fost codificată binar, unde „1” reprezintă succesul (de exemplu, prezența unui efect sau eveniment de interes - prezența undei pulsatile), iar „0” reprezintă eșecul sau lipsa evenimentului de interes .

**Tabelul 5. Statistici descriptive pentru nouă variabile binare - măsurate în trei momente de timp (10 minute, 30 minute, 50 minute) ale examinării obiective *in-vivo* ale vasului decelularizat.**

		<b>Puls 10min</b>	<b>Puls 30min</b>	<b>Puls 50min</b>	<b>TA 10min</b>	<b>TA 30min</b>	<b>TA 50min</b>	<b>Milk test 10min</b>	<b>Milk test30min</b>	<b>Milk test 50min</b>
<b>N</b>	<b>Valid</b>	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	<b>Lipsă</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Media</b>		1.00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.00	1.0	1.40	2.20
<b>Mediana</b>		1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	3.00
<b>Modul</b>		1.00	1.00	1.0	1.0	1.0	1.0	1.00	1.00	3.00
<b>Deviația standard</b>		.000	.000	.00	.00	.0	.0	.000	.894	1.09
<b>Range</b>		.00	.00	.00	.0	.0	.0	.00	2.00	2.00

Pentru variabilele TA- menținerea TA, Puls - menținerea undei pulsatile, în eșantionul de 5 subiecți - șobolani WinStar, nu există nicio variabilitate în examinări. Toți cei 5 subiecți au avut exact aceiași indicatori (egali cu 1.0- prezența evenimentului monitorizat) în toate cele trei momente de timp ale experimentului.

Pentru variabila - menținerea fluxului sanguin distal de grefă prin *milking-test*, până la minutul 50, rezultatele testului de patență a anastomozei au început să se modifice. Deși valoarea medie a crescut la 2.20, datele au devenit mai dispersate (deviație standard 1.09), iar valoarea care apare cel mai frecvent (modul) este 3.00.

Monitorizarea obiectivă indică o relativă omogenitate a răspunsurilor în cadrul grupurilor, ceea ce sugerează că modificările între subiecții de studiu nu au avut un impact suficient de pronunțat pentru a genera variații statistice relevante - tabelul 5.

Evaluarea funcțională a grefelor arteriale decelularizate: toate cele 5 segmente au fost manipulate cu succes prin tehnici microchirurgicale pentru realizarea anastomozelor latero-terminale. În urma testelor de patență, 100% dintre grefe au transmis unda pulsatilă distal de locul suturii și au rezistat la tensiunea intra-arterială a animalului gazdă. Aceste rezultate sugerează că, deși nu s-au observat diferențe semnificative în circuitul sanguin post-implantare între condițiile analizate, grefele arteriale decelularizate sunt viabile și funcționale în cadrul modelului experimental utilizat - figura 14, figura 15.

Obiectiv, durata supravegherii *in vivo* a fost cuprinsă între 50-60 de minute, interval în care s-au monitorizat atent comportamentul grefelor vasculare și manifestările locale după anastomoză. La nivel macroscopic, grefele și-au menținut consistența și structura, nefiind

observate semne de discontinuitate, rupturi sau deformări, evidențiindu-se o arhitectură tisulară intactă și absența modificărilor inflamatorii acute, fără extravazări sanvine prin peretele EMC. sangvin. Nu au fost evidențiate leziuni mecanice directe care să fi condus la apariția sângerărilor. Singurele hemoragii observate au fost localizate la nivelul zonelor de sutură microchirurgicală, fiind de intensitate redusă și autolimitându-se într-un interval de 1–2 minute de la inițierea circuitului sangvin după anastomoză. Aceste episoade hemoragice au fost interpretate ca fiind normale și inerente tehnicii de sutură, fără impact negativ asupra integrității sau funcționalității grefelor.

Testul de patență efectuat după realizarea anastomozei microchirurgicale termino-terminală sau *end-to-end*, la minutul 50 post-anastomoză s-a constatat o diminuare semnificativă a fluxului distal de sânge, sugerând inițierea unui proces obstructiv. Cu toate acestea, nu s-a înregistrat o obstrucție completă a lumenului, fluxul sangvin fiind în continuare prezent, deși redus distal de alogrefa decelularizată.

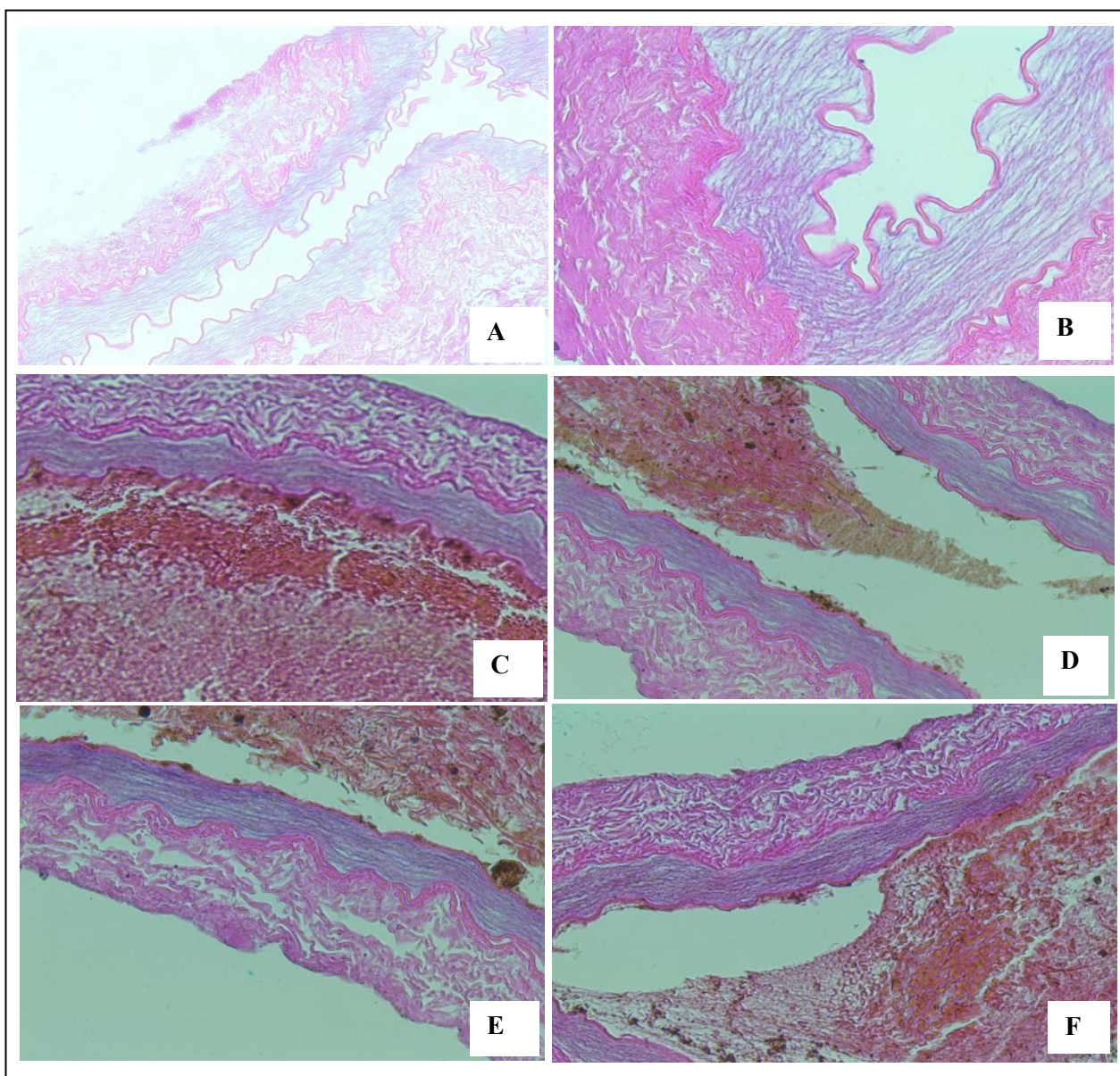
În ansamblu, datele obținute susțin stabilitatea structurală a grefelor testate, precum și o bună compatibilitate cu manipulările chirurgicale și expunerea la mediul *in vivo* pe termen scurt.

Grefele au fost supuse unei evaluări histologice atât preoperator, cât și postoperator, în urma expunerii la testarea *in vivo*. Analiza microscopică a evidențiat păstrarea integrității structurale a matricei extracelulare, fără semne de degradare sau alterări tisulare, indicând o bună rezistență la manipulările mecanice efectuate în timpul procedurii a peretelui vascular decelularizat.

Examinarea histologică a segmentelor incluse în circuitul vascular gazdă a confirmat prezența unui trombus intralumenal, localizat distal de anastomoză. Important de menționat este faptul că acest trombus nu era aderent la suprafața internă a grefei, ceea ce sugerează o interacțiune redusă între componenta trombotică și matricea vasului decelularizat. Deci, endotelul (sau matricea extracelulară rămasă) nu este trombogenică.

De asemenea, analiza microscopică nu a evidențiat prezența celulelor gazdă ca macrofage și limfocitele, în structura matricei decelularizate în intervalul de timp analizat, ceea ce indică o lipsă de integrare celulară imediată în segmentul implantat și confirmă că procesul de decelularizare a eliminat eficient MHC-ul donorului.

Aceste observații susțin ideea că tromboza observată este cel mai probabil rezultatul unei reacții hemodinamice intraluminale, nu a unui răspuns la suprafața acelulară a grefei, și nu a unei interacțiuni directe între celulele sanguine gazdă și materialul decelularizat al peretelui vascular - figura 21. Observațional, prin test de patență și histologic, confirmăm că alogrefa vasculară decelularizată asigură pasajul sangvin din interior spre exteriorul grefei osoase, asigurând succesul în stabilirea vascularizării grefei, ceea ce este un indicator pozitiv al viabilității și succesului alogrefei compozite în plastia defectelor osoase tubulare critice.



**Figura 21. Examinare histologică a segmentelor de arteră decelularizată inclusă microchirurgical în circuitul vascular gazdă, colorație HE.**

**A, B** - Examinarea histologică prin HE a segmentelor arteriale decelularizate de la animal de laborator NZWR denotă absența nucleelor celulare, păstrarea matricei extracelulare la nivel de 3 straturi din componența peretelui vascular arterial (endoteliu, tunica musculară, adventicea).

**C, D, E, F**- Peretele vascular al arterelor incluse microchirurgical în circuitul vascular adoptiv timp de 60 min- determinăm păstrarea structurii matricei extracelulare, prezența trombusului intralumenal neaderent la endoteliul decelularizat precum și absența materialului celular gazdă în matricea vasului decelularizat

### 3.4. Fezabilitatea plastiei defectelor osoase tubulare cu alogrefe osoase vascularizate decelularizate prin osteosinteză și includerea în circuitul vascular adoptiv la animal de laborator NZWR

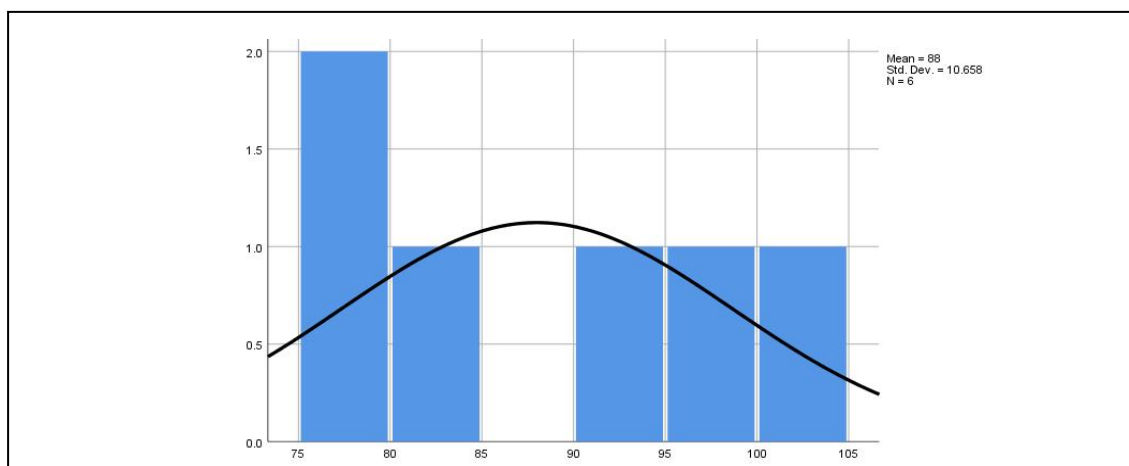
Fezabilitatea studiului pilot chirurgical propus prevede aprecierea viabilității și a posibilităților practice de realizare a intervenției chirurgicale experimentale *in-vivo*. Am cercetat fezabilitatea tehnică pentru confirmarea replicării în condiții experimentale a protocolului elaborat. Elementele concrete care definesc acest tip de fezabilitate sunt: accesibilitatea anatomică, stabilitatea mecanică a alogrefei osoase pentru a preveni tracțiunea sau torsionarea pediculului vascular. Am calculat indicatorii tendinței centrale a variabilelor prestabilite prin metodele de Statistică descriptivă cantitativă:

- masa corporală medie a animalelor de laborator NZWR
- durata medie necesară pentru sedație cu sol. Izoflurane 5%- 1000mg/250ml (min)
- durata medie a intervenției chirurgicale (etapa I și II, min)
- durata medie a osteosintezei ortotopice (etapa I) (min)
- durata medie a anastomozei microchirurgicale termio-laterale etapa II (min).

Analiza generală a variabilelor indică 6 valori valide, fără date lipsă. Valorile tendinței centrale: Media și Mediana sunt apropiate pentru toate variabilele, ceea ce sugerează o distribuție relativ echilibrată. Modul indică că pentru unele variabile există valori frecvente diferite. Devierea standard (Std. Deviation) și varianța (Variance) indică faptul că durata totală a intervenției are o variație mai mare decât alte variabile (Std. Dev. = 10.658). Observațiile pe variabile specifice: Greutatea (g) - Media: 4091.67 g, Min-Max: 3800 - 4570 g, are o distribuție relativ strânsă (Dev. Std.= 279.24). Durata totală a intervenției a variat între 78 și 95 minute, cu o medie de 85 minute. Abordul medial cu anastomoză termino-laterală a fost etapa cu cea mai mare durată (medie: 43,3 minute), reprezentând componenta principală a intervenției chirurgicale - tabelul 6, tabelul 7, figura 22.

**Tabelul 6. Indicatorii tendinței centrale ale variabilelor protocolului anestezic și operator.**

Parametru	Medie	Minim	Maxim	Deviație standard
Greutate (g)	4,09	3,800	4,570	± 279.24
Inducție anestezie (min)	8.2	5	13	± 2.9
Abord lateral (min)	19.2	14	25	± 3.9
Abord medial + anastomoză (min)	43.3	38	50	± 4.3
Alte manevre (min)	15	10	20	± 3.5
Doze ketamină (1/3 doză)	0.83	0	2	± 0.75
Durata totală chirurgie (min)	85	78	95	± 6.76



**Figura 22. Reprezentarea grafică a distribuției variabilei - Durata intervenției chirurgicale (minute).**

**Tabul 7. Evaluarea indicatorilor tendinței centrale ai variabilei - Durata intervenției chirurgicale (minute).**

		Greutate (g)	Abord lateral (min)	Abord medial (min)	Alte manipulări (min)	Durata intervenției (min)
N	Valide	6	6	6	6	6
	Absente	0	0	0	0	0
<b>Media</b>		4091.67	19.17	43.33	15.00	88.00
<b>Mediana</b>		4025.00	18.50	42.50	14.50	88.00
<b>Moda</b>		3800 <sup>a</sup>	14 <sup>a</sup>	38 <sup>a</sup>	10 <sup>a</sup>	76 <sup>a</sup>
<b>Deviația Std.</b>		279.243	4.167	5.046	3.578	10.658
<b>Varianța</b>		77976.667	17.367	25.467	12.800	113.600
<b>Minimum</b>		3800	14	38	10	76
<b>Maximum</b>		4570	25	50	20	103
<b>Sum</b>		24550	115	260	90	528
<b>Percentile</b>	<b>25</b>	3875.00	15.50	38.75	12.25	77.50
	<b>50</b>	4025.00	18.50	42.50	14.50	88.00
	<b>75</b>	4315.00	23.50	48.50	18.50	97.00

Subiecții care au primit doze suplimentare de ketamină (s1-s4) au avut, în general, intervenții mai lungi, în special subiectul 4, care a necesitat 2 doze și a avut durata cea mai lungă (95 min). Subiecții fără doze suplimentare (s5 și s6) au avut cele mai scurte intervenții (78 min), ceea ce indică o corelație între nevoia de reanesteziere în cazul duratei mai mari a intervenției. Greutatea corporală nu a influențat semnificativ durata intervenției. Subiectul cel mai greu (s5) a avut una dintre cele mai scurte intervenții. Inducția anesteziei a variat, dar nu a demonstrat o corelație directă cu durata totală după valorile tendinței centrale.

Deci, durata intervenției chirurgicale a fost determinată în principal de complexitatea procedurii și de necesitatea suplimentării anesteziei, nu de greutatea corporală.

**Tabelul 8. Stabilirea corelației dintre variabilele Masa animalului, Durata intervenției și protocolul de anestezie (ANOVA unidirecțională).**

	Suma Pătratelor	df	Media Pătratelor	F	Sig./P
<b>În Grupe</b>	366.000	2	183.000	2.718	.212
<b>Între Grupe</b>	202.000	3	67.333		
<b>Total</b>	568.000	5			

Etapa cea mai solicitantă din punct de vedere al timpului a fost abordul medial și anastomoza microchirurgicală a vasului decelularizat la pediculul gazdă. Timpul acordat pentru abordările chirurgicale (lateral și medial) în minute -valorile tendinței centrale indică:

- Abord lateral intermuscular: Medie de 19.17 min, cu valori între 14 și 25 min.
- Abordarea medială pentru anastomoză: Medie de 43.33 min, între 38 și 50 min.
- Alte manipulări: Medie de 15 min, între 10 și 20 min.
- Durata totală a operației: Medie de 88 min, cu un minim de 76 min și un maxim de 103 min - tabelul 6B.

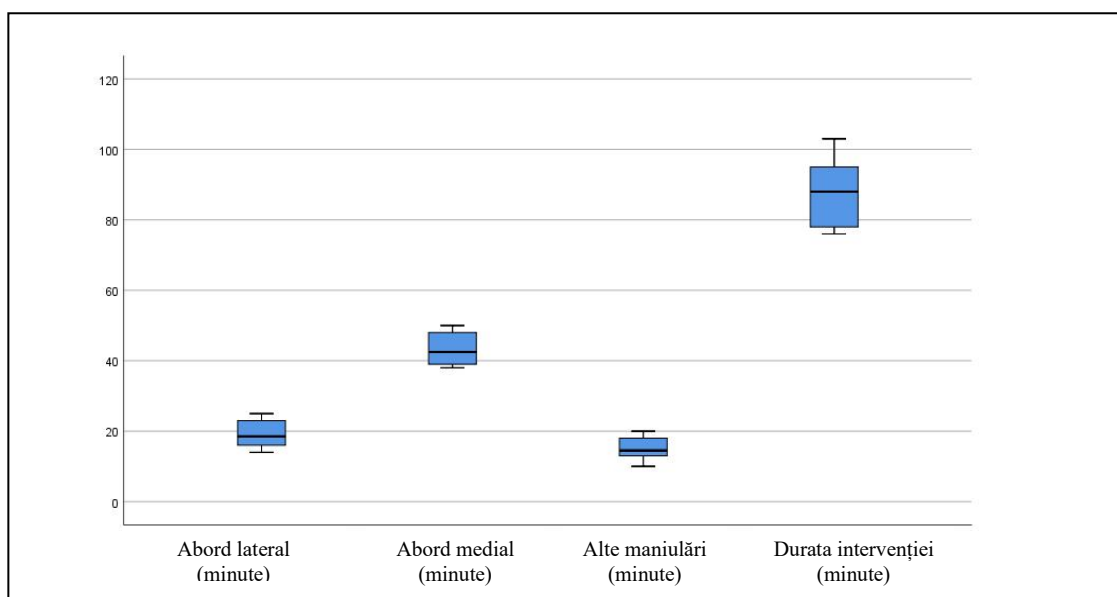
Durata totală a intervenției a variat între 78 și 95 minute, cu o medie de 85 minute. Abordul medial cu anastomoză termino-laterală a fost etapa cu cea mai mare durată (medie: 43,3 minute), reprezentând componenta principală a intervenției chirurgicale.

Pentru cele trei variabile analizate – Abord lateral intermuscular, Abord medial și Durata totală a intervenției chirurgicale –la aplicarea testului ANOVA unidirecțională am identificat eventuale diferențe semnificative statistic între cele trei loturi studiate.

A fost stabilit indicele  $F = 2.718$ , care are o valoare mai mare, deci indică diferențe mai mari între grupuri. Indicele  $p = 0.212$  (Sig.),  $p > 0.05$ , nu există o diferență statistic semnificativă între grupuri în ceea ce privește durata intervenției chirurgicale. Deci, protocolul de anestezie nu a avut un efect semnificativ asupra duratei operației - tabelul 7.

1. Abord lateral intermuscular (minute) -Valoarea F obținută a fost de 1,105, cu un nivel de semnificație (p) de 0,437. Acest rezultat indică faptul că nu există diferențe semnificative statistic între grupuri în ceea ce privește durata etapei de abord lateral intermuscular. Valorile ridicate ale  $p (> 0,05)$  sugerează o omogenitate a duratelor înregistrate în cadrul celor trei loturi.

2. Abord medial (minute) - valoarea F a fost de 2,841, iar nivelul de semnificație asociat ( $p = 0,203$ ) depășește, de asemenea, pragul convențional de semnificație statistică ( $p < 0,05$ ). Aceasta semnalează că diferențele observate între loturi nu sunt semnificative statistic, deși valoarea F este relativ mai mare comparativ cu cea obținută pentru abordul lateral, ceea ce ar putea sugera o tendință spre diferențiere, fără a atinge însă un nivel de semnificație acceptabil.



**Figura 23. Reprezentare grafică Boxplot – variabila Durata intervenției chirurgicale (minute).**

3. Durata totală a intervenției chirurgicale (minute) - valoarea F de 2,718, cu un nivel de semnificație (p) de 0,212. Acest rezultat confirmă, la rândul său, absența unor diferențe semnificative statistic între cele trei grupuri comparate în ceea ce privește timpul total necesar realizării procedurii chirurgicale.

Rezultatele analizei ANOVA sugerează că utilizarea vaselor decelularizate, obținute prin metoda mixtă agresivă, nu a influențat semnificativ durata diferitelor etape ale intervenției chirurgicale (abord lateral, abord medial) sau durata totală a intervenției, în cadrul condițiilor experimentale analizate. Deși au fost observate variații ale mediei timpilor între grupuri, acestea nu au atins pragul statistic de semnificație, ceea ce poate fi pus pe seama variabilității interindividuale sau a dimensiunii reduse a eșantionului ( $df = 5$ ). Prin urmare, aceste rezultate sugerează că tipul de protocol de anestezie utilizat nu a avut un impact semnificativ asupra duratei abordului medial sau asupra duratei totale a intervenției chirurgicale – tabelul 9.

Nici o etapă operatorie analizată nu a exercitat o influență semnificativă din punct de vedere statistic asupra duratei totale a intervenției. Acest rezultat sugerează o uniformitate relativă a timpilor operatori între grupuri, indiferent de variabilele specifice investigate sau de protocolul chirurgical aplicat - figura 23.

Deci, pentru plastia defectelor osoase tubulare - os femural, cu grefe compozit (os+vas decelularizate) e nevoie de 2 aborduri chirurgicale ale coapsei medial și lateral. Diferențe statistic semnificative pentru ambele etape intraoperatorii nu s-au determinat, astfel faptul că anastomoza microchirurgicală cu un vas decelularizat nu prezintă necesitatea de timp adițional demonstrează că aceasta este tehnic fezabilă.

**Tabelul 9. Evaluarea impactului etapelor protocolului chirurgical asupra duratei totale ale intervenției (Anova unidirecțională).**

ANOVA		Suma Pătratelor	df	Media Pătratelor	F	Sig.
Abord lateral intermuscular (min)	Între loturi	36.833	2	18.417	1.105	.437
	În loturi	50.000	3	16.667		
	Total	86.833	5			
Abord medial (min)	Între loturi	83.333	2	41.667	2.841	.203
	În loturi	44.000	3	14.667		
	Total	127.333	5			
Durata intervenției (min)	Între loturi	366.000	2	183.00	2.718	.212
	În loturi	202.000	3	67.333		
	Total	568.000	5			

### 3.5. Testarea *in-vivo* a țesutului osos decelularizat prin plastie cu grefe osoase vascularizate pe loturi de animale de laborator.

Conform protocolului de anestezie și operator stabilit (abordul intermuscular lateral - pentru osteotomie și osteosinteză și abordul medial pentru anastomoza lateral-terminală a pediculului cu artera femurală) în etapa a 3-a a cercetării, a fost efectuată cercetarea comparativă pe 3 loturi de studiu a câte 4 animale de laborator NZWR :

- 1.Lot 1 - plastie de defect osos critic cu autogrefă osoasă vascularizată
- 2.Lot 2 - plastie de defect osos critic cu alogrefă osoasă vascularizată (nativă)
- 3.Lot 3 - plastie de defect osos critic cu alogrefă osoasă vascularizată decelularizată.

Cercetarea postoperatorie la fiecare subiect din loturile de studiu a fost strict determinată.

#### **A. Manifestări postoperatorii locale în a 1-a, a 5-a, a 10-a, a 15-a zi postoperatorie:**

- aspectul plăgii: tumor, calor, rubor, eliminări plagă, cicatrizare plagă.

Pentru analiza comparativă a diferențelor dintre condițiile studiate, variabilele au fost codificată binar, unde „1” reprezintă succesul (de exemplu, prezența unui efect sau eveniment de interes - prezența *Tumor*), iar „2” reprezintă lipsa evenimentului de interes, la această etapă la nivelul plăgii postoperatorii a:

- *tumor* - tumefierii cicatricii și a țesuturilor vecine
- *calor* - hipertermie locală în regiunea cicatricii
- *rubor* - hiperemia locală în regiunea cicatricii
- eliminări plagă
- cicatrizare plagă - tabelul 9

**Tabelul 10. Statistici descriptive variabilele manifestărilor postoperatorii locale ale membrului operat.**

	<b>N</b>	<b>Minimum</b>	<b>Maximum</b>	<b>Media</b>	<b>Deviația Std.</b>
<b>Greutate (g)</b>	12	3350.0	3810.0	3597.5	147.162
<b>SEX</b>	12	1.00	1.00	1.000	.00000
<b>TUMOR ziua 1</b>	12	1.00	2.00	1.083	.28868
<b>CALOR ziua 1</b>	12	1.00	2.00	1.166	.38925
<b>RUBOR ziua 1</b>	12	1.00	2.00	1.250	.45227
<b>Eliminări plagă ziua 1</b>	12	1.00	2.00	1.083	.28868
<b>Cicatrizare plagă ziua 1</b>	12	2.00	2.00	2.000	.00000
<b>TUMOR ziua 5</b>	12	1.00	2.00	1.083	.28868
<b>CALOR ziua 5</b>	12	1.00	2.00	1.416	.51493
<b>RUBOR ziua 5</b>	12	1.00	2.00	1.500	.52223
<b>Eliminări plagă ziua 5</b>	12	1.00	2.00	1.166	.38925
<b>Cicatrizare plagă ziua 5</b>	12	2.00	2.00	2.00	.00000
<b>TUMOR ziua 10</b>	12	1.00	2.00	1.666	.49237
<b>CALOR ziua 10</b>	12	1.00	2.00	1.916	.28868
<b>RUBOR ziua 10</b>	12	1.00	2.00	1.750	.45227
<b>Eliminări plagă ziua 10</b>	12	1.00	2.00	1.666	.49237
<b>Cicatrizare plagă ziua 10</b>	12	1.00	2.00	1.750	.45227
<b>TUMOR ziua 15</b>	12	1.00	2.00	1.833	.38925
<b>CALOR ziua 15</b>	12	2.00	2.00	2.00	.00000
<b>RUBOR ziua 15</b>	12	1.00	2.00	1.750	.45227
<b>Eliminări plagă ziua 15</b>	12	1.00	2.00	1.916	.28868
<b>Cicatrizare plagă day15</b>	12	1.00	2.00	1.083	.28868

Singura variabilă continuă este Greutatea medie a subiecților a fost de 3597.5 grame, variind între 3350 și 3810. Toate variabilele variabile binare au fost pe un eșantion de 12 subiecți, fără lipsă de valori. Majoritatea variabilelor (cu excepția greutății în grame) sunt măsurate pe o scală redusă, având valoarea minimă 1.00 și valoarea maximă 2.00. Examinarea rezultatelor expuse în tabelul 10, prezintă medii care se modifică de la Ziua 1 la Ziua 15, indicând o tendință de vindecare sau de progresie a inflamației.

- Ziua 1: Mediile sunt apropiate de 1.00 (de ex. *TUMOR* ziua 1 media = 1.0833), sugerând că majoritatea semnelor de inflamație sunt prezente.

- Ziua 10 și Ziua 15: Mediile cresc spre 2.00 (de ex. *CALOR* ziua 10 media = 1.9167), sugerând că semnele de inflamație devin absente sau mai puțin pronunțate pe măsură ce rana evoluează.

- Eliminări din plagă: Media crește de la 1.0833 la 1.9167, sugerând o scădere a secrețiilor în timp.

Rezultatele oferă un instantaneu numeric al modului în care evoluează semnele clinice locale postoperatoriu la 12 subiecți. Datele indică o variabilitate minimă sau inexistentă în anumite măsurători, în timp ce parametri de inflamație (CALOR, RUBOR, TUMOR) și secrețiile scad pe parcursul celor 15 zile de observație la toate cele 3 loturi de observație.

### **B. Manifestările postoperatorii generale.**

- funcționalitatea membrului operat: sprijin pe membru, mers, sărituri/salt.

Pentru a evalua funcționalitatea membrului operat în timp și analiza comparativă a diferențelor dintre condițiile studiate, variabilele au fost codificată binar, unde „1” reprezintă succesul (de exemplu, prezența unui efect sau eveniment de interes - prezența Sprijin pe membru), iar „2” reprezintă lipsa evenimentului de interes, la această etapă la nivelul membrului operati a: - sprijin pe membrul operat, - mers cu membrul operat calor- hipertermie locală în regiunea cicatricii, - *salt cu membrul operat*- tabelul 10, tabelul 11.

Ziua 1- Toate cele 12 animale nu au putut merge și nu au putut sări în prima zi.

Ziua 5 - Majoritatea animalelor au început să se sprijine (media 1.16). Mersul este încă predominant absent (media 1.75, mai aproape de 2=absent). Nici un animal nu a putut sări (media exact 2.00).

Ziua 10: Sprijinul pe membru a revenit aproape la normal pentru tot eșantionul. Mersul s-a îmbunătățit considerabil, iar unii subiecți au început să sară.

Ziua 15: Recuperarea a progresat în continuare. Mersul este aproape complet recuperat la nivelul întregului grup. Săritura arată cea mai bună medie (1.4167) din tot studiul, deși rămâne funcția cel mai puțin recuperată în total.

**Tabel 11. Statisticile descriptive variabilelor manifestărilor postoperatorii funcționalității membrului operat.**

	N	Minim um	Maximu m	Media	Deviația Std.
<b>Sprijin ziu a 1</b>	12	1.00	2.00	1.91	.28868
<b>Mers ziua 1</b>	12	2.00	2.00	2.0000	.00000
<b>Salt ziua1</b>	12	2.00	2.00	2.0000	.00000
<b>Sprijin ziua 5</b>	12	1.00	2.00	1.1667	.38925
<b>Mers ziua 5</b>	12	1.00	2.00	1.7500	.45227
<b>Salt ziua 5</b>	12	2.00	2.00	2.0000	.00000
<b>Sprijin ziua 10</b>	12	1.00	2.00	1.0833	.28868
<b>Mers ziua 10</b>	12	1.00	2.00	1.4167	.51493
<b>Salt ziua 10</b>	12	1.00	2.00	1.8333	.38925
<b>Sprijin ziua 15</b>	12	1.00	2.00	1.0833	.28868
<b>Mers ziua 15</b>	12	1.00	2.00	1.1667	.38925
<b>Salt ziua 15</b>	12	1.00	2.00	1.4167	.51493

**Tabelul 12. Examinarea recuperării pe loturi a funcționalității membrului operat.**

Funcție	Ziua 1	Ziua 15 (Lot I, II, III)	Observații
Sprijin	Foarte scăzut	Recuperare completă/cvasicompletă	Toate loturile se recuperează bine
Mers	Absent	Recuperare completă	Toate loturile se recuperează bine
Salt	Absent	Lot I: 3/4; Lot II: 0/4; Lot III: 3/4	<u>Diferență majoră- Lotul II nu recuperează această funcție avansată.</u>

Statisticile descriptive confirmă tendința generală de recuperare funcțională în timp: de la incapacitatea totală în ziua 1, la recuperarea sprijinului și mersului, culminând cu recuperarea parțială a săriturii în ziua 15. Variabilitatea (Deviația Standard) indică faptul că nu toate animalele s-au recuperat în același ritm.

Recuperarea plăgii postoperatorii (după indicii de inflamație) și a funcției locomotorii (sprijin, mers, săritură) după loturi de studiu:

- Lotul I, alogrefă osoasă vascularizată- prezintă cea mai rapidă și completă recuperare, atât din punct de vedere al vindecării rănilor (dispar rapid semnele de inflamație: *Tumor, Calor, Rubor*), cât și din punct de vedere funcțional (subiecții încep să sară primii).

- Lotul II, alogrefă osoasă vascularizată- prezintă cea mai lentă recuperare în ambele aspecte. Semnele de inflamație persistă mai mult timp, iar funcțiile complexe (săritura) nu se recuperează complet în intervalul de 15 zile.

Lotul III, alogrefă osoasă vascularizată decelularizată- are rezultate intermediare, fiind mai aproape de Lotul I în ceea ce privește recuperarea funcției de a sări, dar cu o vindecare a răni puțin mai lentă decât Lotul I - tabelul 11, tabelul 12.

Datele sugerează o eficacitate superioară a tratamentului în rezultatele funcțional în Lotul I, urmat de Lotul III, în timp ce Lotul II a avut cele mai slabe rezultate de vindecare și recuperare funcțională.

### **C. Manifestările postoperatorii paraclinice:**

**1. Analiza generală a sângelui cu formula leucocitară** ca indicator al procesului inflamator persistent a fost examinată pe loturile de studiu la intervale de timp de 14 și 28 zile.

Pentru un eșantion de 12 participanți (N = 12), au fost evaluate valorile Leucocitare totale (WBC) și subpopulațiile granulocitare (Gran), limfocitare (Lym) și monocitare (Mon) în două momente postoperatorii: ziua 14 și ziua 28.

- Leucocite (White Blood Cells – leucocite totale): Ziua 14: Media a fost de  $12,00 \times 10^3/\mu\text{L}$  ( $\pm 3,23$ ), cu o mediană de 10,50 și un interval de valori între 8,63 și 19,43. Ziua 28: Media a fost ușor redusă,  $11,76 \times 10^3/\mu\text{L}$  ( $\pm 5,44$ ), cu o mediană de 9,06 și un interval între 6,90 și 20,40. Se observă o ușoară scădere a valorilor medii și mediane ale WBC până la ziua 28, ceea ce ar putea sugera o normalizare progresivă a răspunsului inflamator postoperator în loturile de cercetare.

- Granulocite (Gran)- Ziua 14: Media a fost  $6,86 \times 10^3/\mu\text{L}$  ( $\pm 2,02$ ). Ziua 28: Media a crescut la  $7,83 \times 10^3/\mu\text{L}$  ( $\pm 4,81$ ), cu un maxim de 16,45. Deși valorile medii cresc ușor, deviația standard indică o variabilitate mai mare în ziua 28, ceea ce sugerează un răspuns heterogen între participanți.

- Limfocite (Lym) - în Ziua 14 Media a fost  $6,01 \times 10^3/\mu\text{L}$  ( $\pm 2,15$ ), cu o mediană de 5,61. Ziua 28, Media a crescut la  $7,44 \times 10^3/\mu\text{L}$  ( $\pm 3,44$ ), cu o mediană de 7,36. Se înregistrează o creștere constantă a limfocitelor, ceea ce poate reflecta o revenire la homeostazie imună și o reducere a inflamației acute.

- Monocite (Mon) - Ziua 14: Media a fost  $0,76 \times 10^3/\mu\text{L}$  ( $\pm 0,53$ ), cu un minim de 0 și un maxim de 2,1. Ziua 28: Media a fost  $0,67 \times 10^3/\mu\text{L}$  ( $\pm 0,37$ ), cu o mediană de 0,735. Valorile monocitelor rămân relativ stabile, fără variații semnificative între cele două momente - tabelul 13.

Analiza pe loturi de studiu după indicatorii tendinței centrale:

Lotul II (plastie cu alogrefă osoasă vascularizată) indică un răspuns inflamator mai accentuat, reflectat în valori mai mari ale leucocitelor totale, granulocitelor și limfocitelor, în special la ziua 28-a postgrefare.

**Tabelul 13. Valorile medii și deviațiile standard pentru parametrii Leucocite, Granulocite, Limfocite și Monocite (zilele 14 și 28 -a pe loturile de studiu).**

Parametru	Ziua	Lotul I	Lotul II	Lotul III
Leucocite	14	$11.68 \pm 4.20$	$14.31 \pm 4.02$	$9.91 \pm 0.89$
	28	$8.74 \pm 1.37$	$11.77 \pm 4.76$	$7.56 \pm 3.20$
Granulocite	14	$6.83 \pm 2.76$	$7.10 \pm 2.89$	$6.21 \pm 1.83$
	28	$6.46 \pm 1.98$	$11.62 \pm 4.39$	$6.17 \pm 3.11$
Limfocite	14	$6.38 \pm 2.52$	$8.53 \pm 3.54$	$4.48 \pm 1.37$
	28	$6.64 \pm 2.36$	$10.86 \pm 3.97$	$7.00 \pm 3.46$
Monocite	14	$0.54 \pm 0.50$	$0.35 \pm 0.49$	$0.69 \pm 0.35$
	28	$0.47 \pm 0.44$	$0.75 \pm 0.37$	$0.49 \pm 0.36$

**Tabel 14. Rezultatele valorilor tendinței centrale și ale distribuției pentru variabilele formulei leucocitare ca indicatori ai procesului inflamator pe loturile de studiu.**

		Leucocite Ziua 14	Granulocite Ziua 14	Limocite Ziua 14	Monocite Ziua 14	Leucocite Ziua 28	Granulocite Ziua 28	Limocite Ziua 28	Monocite Ziua 28
N	Valid	12	12	12	12	12	12	12	12
	Lipsă	0	0	0	0	0	0	0	0
	Media	12.0	6.8591	6.0108	.764167	11.76	7.8383	7.4408	.6683
	Media Pătr.	.95	.5831	.6206	.1539	1.571	1.387	.99426	.10655
	Mediana	10.5	7.2650	5.6050	.7150	9.0650	6.8300	7.3600	.7350
	Moda	8.63	2.410 <sup>a</sup>	3.230 <sup>a</sup>	.4500 <sup>a</sup>	6.90 <sup>a</sup>	1.80 <sup>a</sup>	7.36	.73
	Deviația Std.	3.23	2.0199	2.149	.533129	5.442	4.806	3.4442	.36910
	Variația	10.871	4.080	4.622	.284	29.621	23.101	11.863	.136
	Range	10.800	7.1900	7.1300	2.10	13.50	14.65	11.77	1.04
	Minimum	8.6300	2.4100	3.2300	.00	6.90	1.80	2.60	.06
	Maximum	19.430	9.6000	10.3600	2.10	20.40	16.45	14.37	1.10
	Suma	144.70	82.3100	72.1300	9.170	141.17	94.06	89.29	8.02
Percentile	25	9.5850	5.73250	4.36250	.450	7.3100	3.8250	4.5775	.2675
	75	14.500	8.33500	7.69750	.930	18.372	12.132	9.360	.9825

Lotul I (plastie cu autogrefă soasă vascularizată) prezintă valori moderate, sugerând o reacție inflamatorie mai scăzută comparativ cu Lotul II care este una tipică pentru reacție la țesut alogen.

Lotul III (plastie cu alogrefă osoasă vascularizată decelularizată) are valori mai scăzute la majoritatea parametrilor, cu o excepție pentru monocite la ziua 14, ceea ce poate indica un profil inflamator diferit sau o toleranță imună mai bună, comparabilă cu cea din Lotul I - Tabelul 13.

Distribuția valorilor Leucocite - ziua 14 este moderat asimetrică, sugerând o variație fiziologică între răspunsurile individuale. La ziua 28, distribuția devine semnificativ mai asimetrică spre dreapta, indicând persistența unor valori leucocitare crescute la un subset de indivizi, posibil asociate cu inflamație prelungită sau complicații postoperatorii. Această variație interindividuală poate reflecta diferențe între tipurile de grefe utilizate (autotransplant vs. alotransplant vs. decelularizat) - figura 27.

În urma aplicării testului Kruskal–Wallis, care a indicat existența unor diferențe semnificative între grupurile analizate, a fost realizată o analiză post-hoc utilizând *Pairwise Comparisons*.

Rezultatele obținute în urma comparațiilor pereche au evidențiat atât diferențe semnificative, cât și diferențe ne semnificative statistic între loturile de studiu. Aceste rezultate oferă o imagine

detaliată asupra modului în care grupurile comparate se diferențiază în funcție de variabila analizată, completând astfel interpretarea testului aplicat. Pentru reducerea riscului de erori de tip I, generate de efectuarea mai multor comparații, s-a aplicat Corecția Bonferroni, o metodă esențială în analiza multiplă a datelor. Comparațiile statistice ne semnificative au fost determinate între Lotul III (alotransplant decelularizat vascularizat) cu Lotul I (autotransplant osos vascularizat): Test Statistic: 3.250, p-value: 0.202, Adj. p-value (corectat Bonferroni): 0.607. Concluzie: p-value ajustat de 0.607 este mult mai mare decât valoarea de semnificație standard de 0.05.

La fel, au fost realizate comparații multiple între loturile studiate pentru evaluarea indicilor hematologici ai inflamației posttransplant.

- Comparația Lot III cu Lotul II: Testul statistic a relevat o valoare de 6,500, cu o valoare p de 0,011, iar p-ul ajustat pentru testele multiple (Corecția Bonferroni) a fost 0,032, rezultând astfel o diferență semnificativă din punct de vedere statistic.

- Comparația Lot I cu Lotul II: Testul statistic a avut o valoare de -7,750, cu o valoare p de 0,002, iar p-ul ajustat a fost 0,007, ceea ce indică, de asemenea, o diferență semnificativă statistic la nivelul de semnificație  $\alpha = 0,05$ . Diferența între Loturile III (alotransplant osos decelularizat vascularizat) și Lotul I (autotransplant osos vascularizat) nu a fost semnificativă din punct de vedere statistic pentru indicatorii hematologici ai inflamației posttransplant- figura 24.

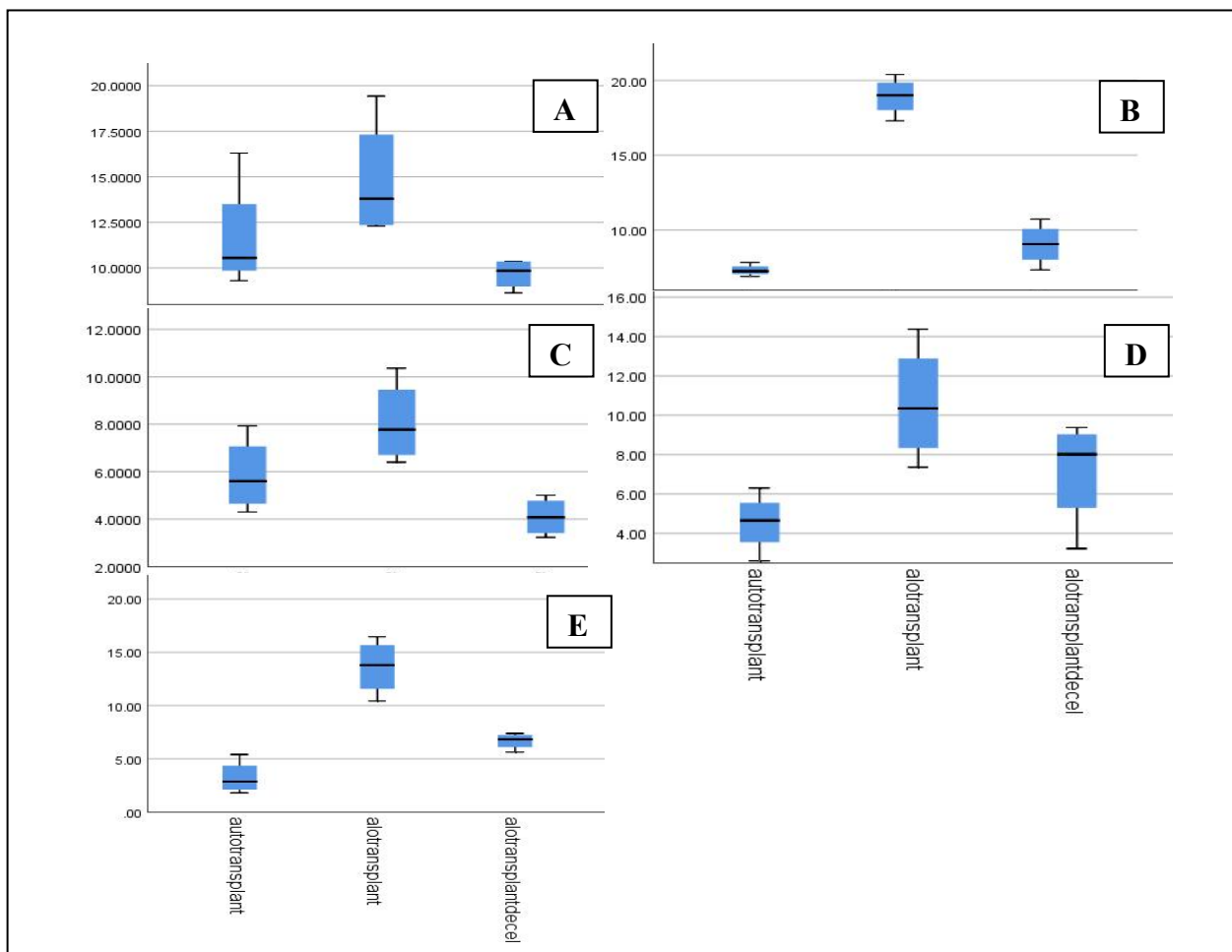
Persistența asimetriei la dreapta a valorilor leucocitare în ziua 28 indică un răspuns inflamator prelungit în Lotul II - allotransplant nativ, spre deosebire de Lotul III, unde absența antigenelor celulare pare să favorizeze o stabilizare imunologică precoce, similară autotransplantului - Lotul I - figura 25.

**2. Analiza biochimică a sângelui** - (Ca, P, Fosfataza Alcalină)- cu indicii osoși pentru examinarea gradului de osteoliză postransplant în loturile de studiu.

Analiza tendințelor centrale (media, mediana, modul) și a dispersiei (deviația standard, varianța) indică următoarele aspecte ale acestor indicatori cheie - tabelul 15, tabelul 16:

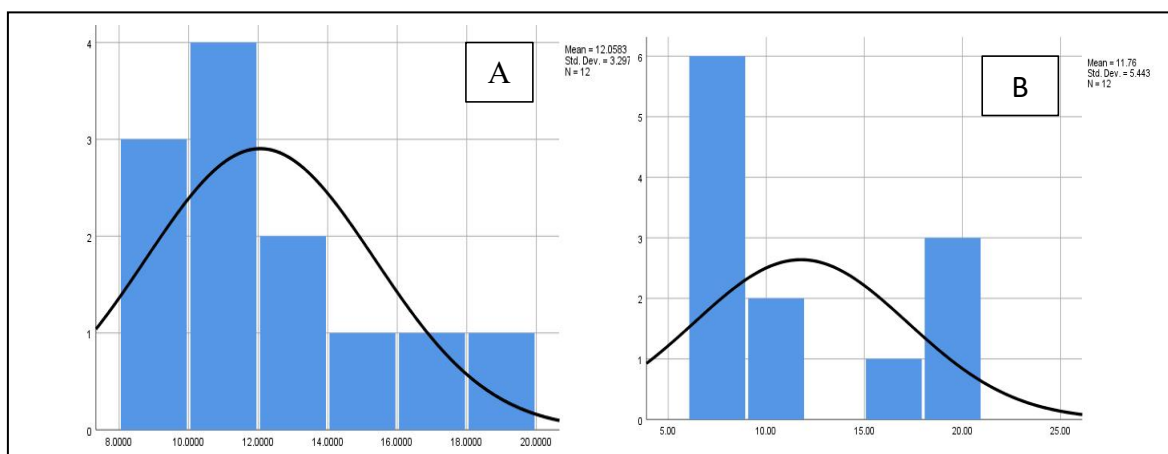
- Nivelurile medii de Ca sunt relativ stabile la subiecți în etapele de cercetare a 14-a, deși există o variabilitate moderată în eșantion (Deviația standard = 0.938 la a 14-a zi). Nivelul mediu de calciu crește semnificativ de la ziua 14 la ziua 28 (Media=4.68, Deviația standard = 1.84 ). Această creștere sugerează o mobilizare crescută a calciului în organism, necesară pentru procesul de remineralizare și consolidare. Intervalul de valori (Range) crește și el, indicând o variabilitate mai mare între subiecții pe loturile de studiu în Ziua 28.

- Nivelul de Fosfor crește de la Ziua 14 la Ziua 28 (de la Medie=2.408 mg/dL la 3.1825 mg/dL). Similar cu calciul, creșterea Fosforului indică activitate metabolică crescută legată de formarea țesutului osos, unde calciul și fosforul sunt componente esențiale.



**Figura 24. Reprezentarea grafică pentru distribuțiile variabilelor formulei leucocitare pe loturi de studiu (în ziua a 14-a și 28-a de evaluare postgrefare).**

A - Leucocite ziua a 14-a pe loturi de studiu, B- Limfocite ziua a 14-a pe loturi de studiu,  
 C- Granulocite ziua a 14-a pe loturi de studiu, D - Leucocite ziua a 28-a pe loturi de studiu  
 E- Limfocite ziua a 28-a pe loturi de studiu.



**Figura 25. Reprezentarea grafică a distribuției rezultatelor statistic semnificative ziua a 28-a - analiza generală a sângelui cu formula leucocitară ca indicatori ai procesului inflamator.**

A - în Lotul II - allotransplant nativ, B - Loturile III (alotransplant osos decelularizat vascularizat).

- Fosfataza Alcalină (ALP)- prezintă o medie de 202.21 U/L în ziua a 14-a pe subiecții din loturile de examinare, cu o variabilitate mare în eșantion (Deviație standard 74.85). În ziua 28, o Medie= 245.32 U/L. Fosfataza alcalină este un marker biologic cheie pentru activitatea osteoblastelor. O creștere a ALP indică o rată crescută a formării osoase.

În contextul vindecării osoase nivelurile crescute de Calciu, Fosfor și, în special, Fosfataza Alcalină sunt indicatori pozitivi ai formării osoase active (osteogeneză) și ai procesului de vindecare. La nivel biochimic, organismul subiecților a intrat într-o fază intensă de reparație și formare de os nou.

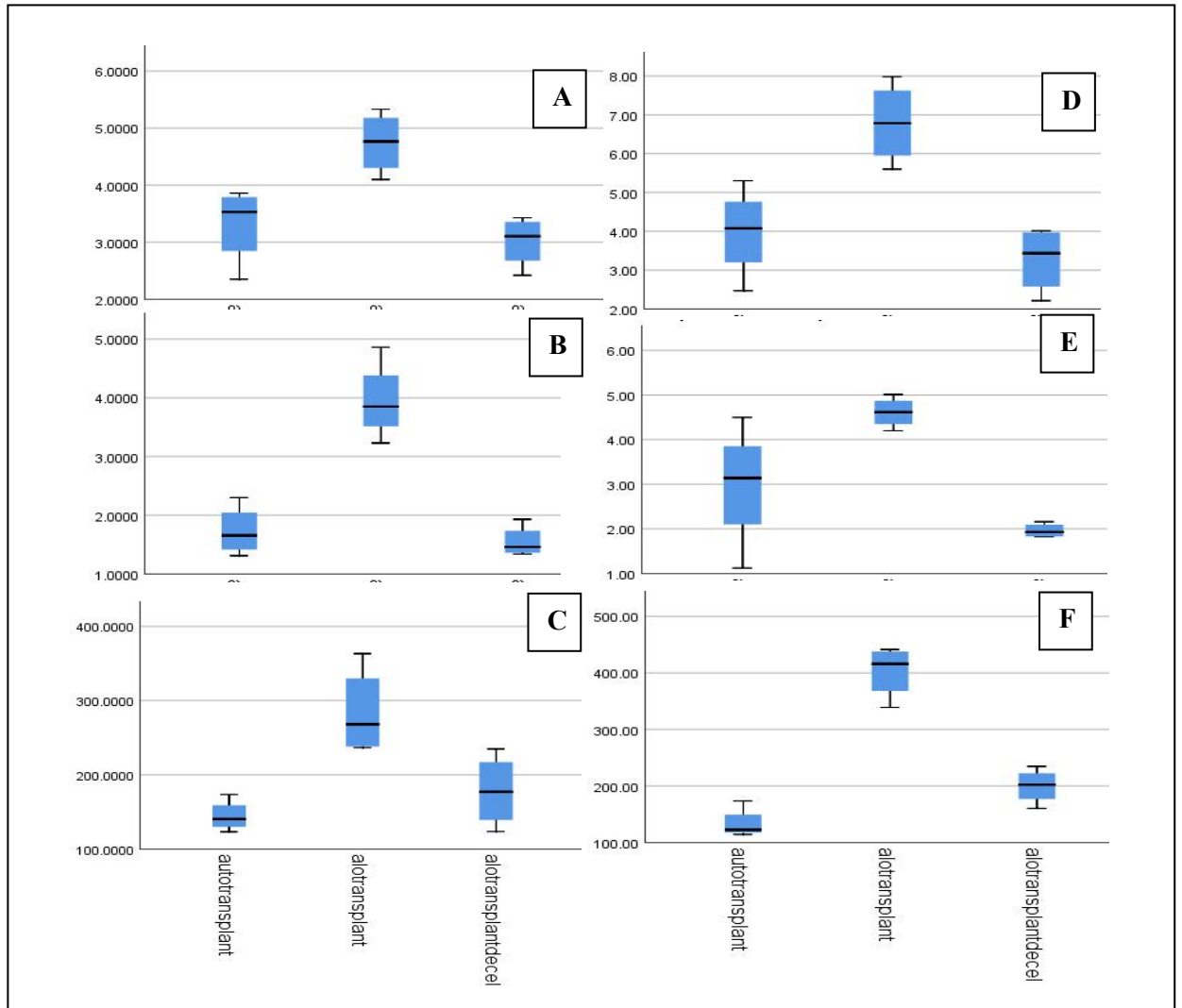
Numeric există o tendință clară de creștere a nivelurilor medii pentru toți indicatorii mășurați (Calciu, Fosfor, ALP) pe măsură ce timpul trece (de la ziua 4/14 la ziua 28). Există o variabilitate considerabilă (reflectată de *Std. Deviation* și *Range*) între cei 12 subiecți, în special pentru ALP, unde deviația standard este foarte mare. Pentru multe variabile, media și mediana sunt destul de diferite (de ex., pentru ALP ziua 28, Media=245 vs. Mediana=202), ceea ce indică faptul că distribuția datelor este asimetrică, cu unii subiecți având valori mult mai mari decât media. Analiza vizuală a diagramelor boxplot arată diferențe semnificative în mediane (linia orizontală în interiorul fiecărui dreptunghi) și în dispersia datelor între grupuri - figura 26.

- Comparație în Ziua 14: Lotul II are niveluri de Calciu semnificativ mai mari (mediana în jur de 4.5) comparativ cu grupurile autotransplant (mediana în jur de 3.5) și allotransplantdecel (mediana în jur de 3.0). La fel se determina pentru Lotul II cele mai ridicate niveluri de fosfor (mediana în jur de 3.8). Lotul I și Lotul III au niveluri similare, semnificativ mai scăzute (mediana în jur de 1.8) comparativ cu Lotul II.

Pentru variabila ALP ziua 14 (Fosfatază alcalină), Lotul II are cele mai ridicate niveluri (mediana în jur de 280 U/L), Lotul I și Lotul III prezintă valori mult mai scăzute (mediane în jur de 150 și, respectiv, 180 U/L). Astfel, Lotul II- allotransplantul osos vascularizat, demonstrează cea mai mare activitate biochimică legată de osteomobilitate în ziua a 14-a de experiment.

- Comparație în Ziua 28: Nivelul de calciu a crescut semnificativ în toate Loturile comparativ cu ziua 14, dar grupul allotransplant rămâne în frunte (mediana în jur de 7.0), cu cea mai mare dispersie a datelor. Lotul II - allotransplant osos vascularizat- menține cele mai ridicate niveluri de Fosfor (mediana în jur de 4.5). Nivelurile de ALP continuă să crească. Lotul II depășește semnificativ celelalte 2 grupuri de studiu (mediana în jur de 400 U/L).

Superioritatea valorilor minerale în Lotul II la ziua 14 comparativ cu Lotul I și Lotul III evidențiază impactul prezenței componentelor celulare native asupra vitezei inițiale de turnover osos. Totuși, asimetria datelor ALP la ziua 28 sugerează că Lotul III începe să recupereze decalajul metabolic pe măsură ce procesul de recellularizare in vivo progresează.



**Figura 26. Analiza biochimică a sîngelui cu indicii osoși pe loturile de studiu.**

A. Calciu seric ziua 14-a pe loturi de studiu, B. Fosfor ziua a 14-a pe loturi de studiu, C. ALP ziua a 14-a pe loturile de studiu, D. Calciu ziua a 28-a pe loturile de studiu, E. Fosfor ziua a 28-a pe loturi de studiu, F. ALP ziua a 28-a pe loturile de studiu.

Lotul II, alotransplantul osos vascularizat, are cea mai mare activitate biochimică și cele mai ridicate niveluri mediane ale markerilor de modelare osoasă (Ca, P, ALP) atât în ziua 14, cât și în ziua 28.

Fiind decelularizată, grefa nu are celule proprii care să producă ALP sau să manipuleze calciul imediat, deoarece depinde în întregime de migrarea celulelor receptorului (recolularizare) din interior spre exteriorul grefei. Raportăm o fază de latență necesară pentru ca celulele gazdei să colonizeze „schemă” (*scaffold*-ul) decelularizată.

**D. Radiografia membrului posterior operat** cu examinarea consolidării defectelor segmentelor osoase tubulare grefate pe loturile de studiu prin utilizarea sistemelor de scor standardizate ale *System for Evaluation of the Fracture Healing of Bone Defects on Radiography* (Anexa 2).

**Tabelul 15. Analiza tendințelor centrale și a dispersiei pentru valorile analizei  
biochimice a sângelui.**

		<b>Ca ziua 14</b>	<b>P ziua 4</b>	<b>ALPziua 14</b>	<b>Caziua 28</b>	<b>P ziua 28</b>	<b>ALP ziua 28</b>
<b>N</b>	<b>Valid</b>	12	12	12	12	12	12
	<b>Lipsă</b>	0	0	0	0	0	0
<b>Media</b>		3.690833	2.4083	202.211667	4.6800	3.1825	245.3275
<b>Std. Error of Mean</b>		.2708501	.35268	21.6098571	.53123	.39445	35.85463
<b>Mediana</b>		3.575000	1.8600	186.350000	4.1150	3.1400	202.1150
<b>Moda</b>		2.3500 <sup>a</sup>	1.3100 <sup>a</sup>	123.3000 <sup>a</sup>	3.93	1.83 <sup>a</sup>	114.30 <sup>a</sup>
<b>Deviația Std.</b>		.9382523	1.2217	74.8587409	1.84024	1.36643	124.20409
<b>Varianța</b>		.880	1.493	5603.831	3.386	1.867	15426.655
<b>Range</b>		2.9800	3.5500	239.9000	5.77	3.89	327.10
<b>Minimum</b>		2.3500	1.3100	123.3000	2.21	1.12	114.30
<b>Maximum</b>		5.3300	4.8600	363.2000	7.98	5.01	441.40
<b>Suma</b>		44.2900	28.900	2426.5400	56.16	38.19	2943.93
<b>Perce ntile</b>	<b>25</b>	3.017500	1.4150	138.375000	3.1875	1.8800	133.7500
	<b>75</b>	4.400	3.65	238.875	6.125	4.500	382.775

**Tabelul 16. Rezultatele valorilor tendinței centrale și ale distribuției pentru variabilele  
analizei biochimice a sângelui pe loturile de studiu.**

<b>Parametru</b>	<b>Ziua 14</b>	<b>Ziua 28</b>
<b>Calciu seric (Ca)</b>	Media: 3.69 ± 0.27 mg/dL Mediană: 3.58 mg/dL Range: 2.35 - 5.33 mg/dL	Media: 4.68 ± 0.53 mg/dL Mediană: 4.12 mg/dL Range: 2.21 - 7.98 mg/dL
<b>Fosfor seric (P)</b>	Media: 2.41 ± 0.35 mg/dL Mediană: 1.86 mg/dL Range: 1.31 - 4.86 mg/dL	Media: 3.18 ± 0.39 mg/dL Mediană: 3.14 mg/dL Range: 1.12 - 5.01 mg/dL
<b>ALP (fosfatază alcalină)</b>	Media: 202.21 ± 21.61 U/L Mediană: 186.35 U/L Range: 123.3 - 363.2 U/L	Media: 245.33 ± 35.85 U/L Mediană: 202.11 U/L Range: 114.3 - 441.4 U/L

Conform punctajului acumulat, imaginile radiografice au fost examinate și analizate pe loturile de studiu pentru criteriile - tabelul 2:

- formarea de țesut osos
- consolidare osoasă totală

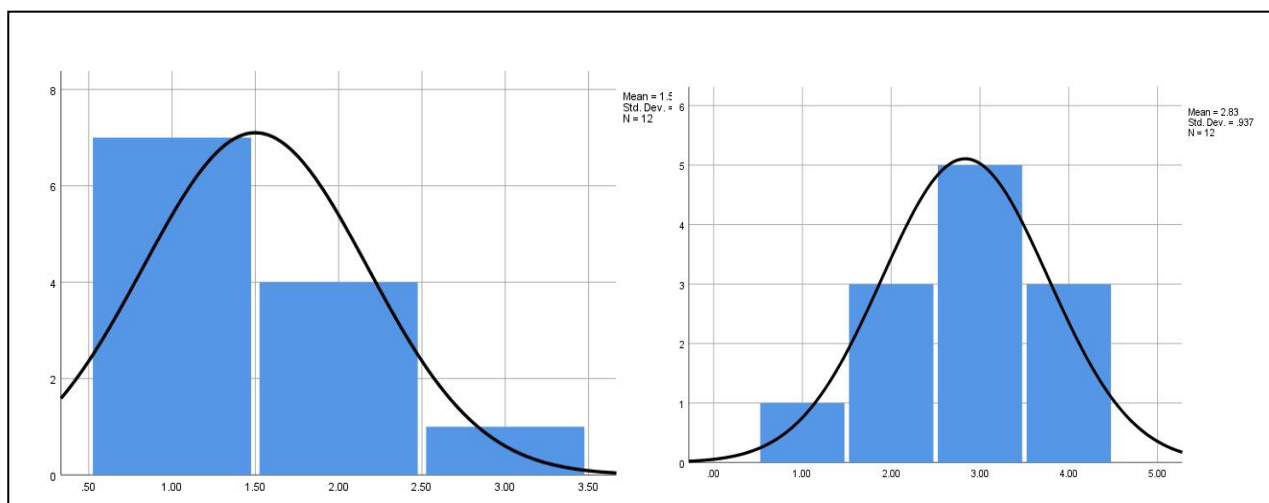
- resorbția țesutului osos al grefei
- prezența joncțiunii osoase dintre grefă și țesut osos gazdă.

Interpretarea detaliată a rezultatelor prin analiza comparativă a celor trei loturi experimentale evidențiază evoluții distincte ale variabilelor examinate la intervale de timp de 14 și 28 de zile permit o evaluare clară a capacității fiecărui tip de grefă de a susține regenerarea osoasă în defectele osoase tubulare experimentale.

După variabila Formarea țesutului osos, la 14 zile, formarea primară de țesut osos este comparabilă între Lotul I și Lotul III (Media= 1.75), în timp ce Lotul II prezintă valori semnificativ mai mici (Media=1.0), indicând un debut mai lent al osteogenezei. Evoluția până în ziua 28 arată diferențe marcante între loturi. Lotul III înregistrează cea mai accentuată creștere a formării osoase (1.75 → 3.50), sugerând o activitate osteogenică intensă și o tranziție eficientă de la țesut imatur la os lamelar în curs de maturare. Lotul I prezintă, de asemenea, o creștere importantă (1.75 → 3.25), demonstrând un mecanism de osteogeneză bine susținut, deși ușor inferior Lotului III. Lotul II, în schimb, are o evoluție mult mai modestă (1.0 → 1.75), indicând o capacitate redusă de inițiere și progresie a formării osoase. Lotul III generează cel mai robust răspuns osteogenic, urmat îndeaproape de Lotul I, în timp ce Lotul II prezintă o osteogeneză semnificativ limitată, posibil afectată de procese biochimice sau biomecanice insuficiente.

După variabila Consolidarea osoasă, la 14 zile, Loturile I și III au valori similare (Media= 1.50), în timp ce Lotul II rămâne inferior (1.0). Diferențele devin mult mai clare la 28 de zile: Lotul III obține cea mai mare valoare (3.0), indicând un proces de maturare și stabilizare optim al osului neoformat. Lotul I prezintă o consolidare bună, dar mai redusă decât Lotul III (2.50). Lotul II nu prezintă niciun progres în intervalul 14–28 zile (rămâne 1.0), ceea ce indică absența consolidării adecvate a defectului, un semn important al eșecului osteointegrării grefei în acest lot. Lotul III demonstrează cea mai bună capacitate de consolidare a refei osoase, urmat de Lotul I. Lotul II este deficitar, sugerând fi osteointegrare a grefei compromisă.

Resorbția țesutului grefei - Lotul II prezintă cea mai mare resorbție (2.25 → 2.50), fenomen care, corelat cu slaba formare osoasă și consolidare, indică o degradare accelerată a grefei înainte ca aceasta să fie înlocuită eficient cu os nou. Lotul III prezintă o resorbție stabilă, moderată (1.75 → 1.75), sugerând un echilibru optim între resorbția grefei și formarea de os nou. Lotul I are chiar o scădere a valorilor (1.25 → 1.0), ceea ce poate sugera o stabilitate crescută a grefei și o resorbție lentă, favorabilă unei osteointegrării progresive. Astfel, Lotul III prezintă cel mai bun raport resorbție–formare osoasă, indicând un proces bine coordonat de remodelare. Lotul I este stabil, iar Lotul II prezintă un dezechilibru major, cu resorbție excesivă, ceea ce poate explica și performanțele slabe din celelalte categorii.



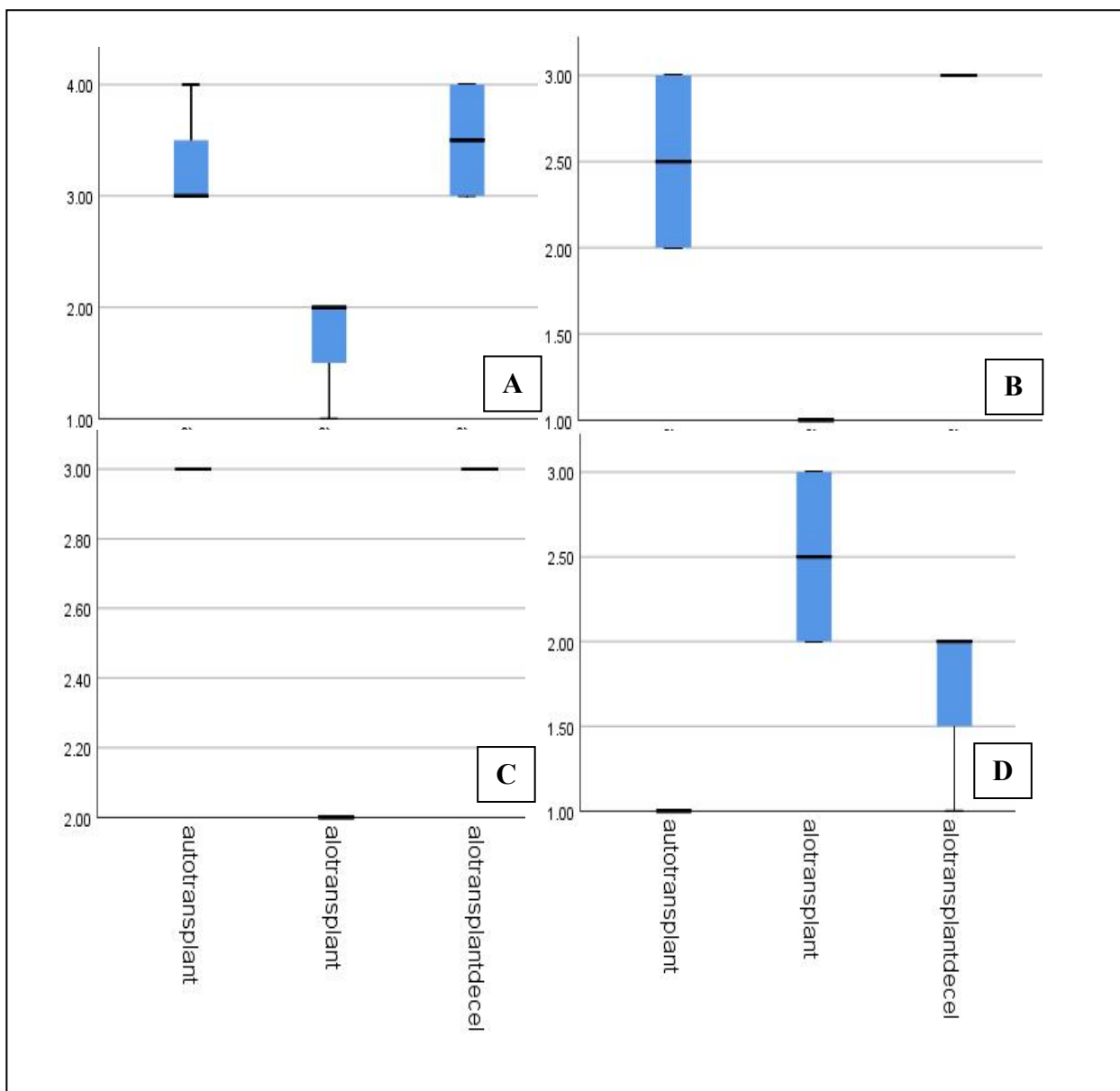
**Figura 27. Reprezetarea grafică pentru distribuțiile variabilei - Formarea de țesut osos ziua 14-a și a 28-a.**

**Tabelul 17. Rezultatele valorilor tendinței centrale și ale distribuției pentru variabilele cercetate imagistică pe loturile de studiu.**

		Formare de țesut osos ziua 14	Consolidare osoasă ziua 14	Resorbția țes. osos al grefei ziua 14	Prezența jonc. osoase ziua 14	Formare de țesut osos ziua 28	Consolidare osoasă ziua 28	Prezența jonc. osoase ziua 28	Resorbția țes. osos al grefei ziua 24
<b>Lot I</b>	<b>Media</b>	1.75	1.50	1.25	2.0	3.25	2.5	3.0	1.0
	<b>Deviația Std.</b>	.957	.577	.50	.81	.50	.57	.00	.00
<b>Lot II</b>	<b>Media</b>	1.00	1.00	2.25	1.75	1.75	1.0	2.0	2.5
	<b>Deviația Std.</b>	.00	.000	.50	.50	.50	.00	.00	.57
<b>Lot III</b>	<b>Media</b>	1.7500	1.5000	1.7500	1.5000	3.5000	3.0000	3.0000	1.7500
	<b>Deviația Std.</b>	.500	.577	.50	.57	.57	.00	.00	.50

Prezența joncțiunii osoase dintre grefă și osul nativ- Lotul I prezintă o evoluție foarte bună (2.0 → 3.0), confirmând o integrare progresivă și solidă a grefei. Lotul III crește de la 1.50 la 3.0, ajungând la același nivel final ca Lotul I, dar cu o progresie mai dinamică. Lotul II rămâne mult în urmă (1.75 → 2.0), indicând o joncțiune fragilă și insuficientă pentru transmiterea eficientă a forțelor biomecanice.

Loturile I și III sunt comparabile în ceea ce privește formarea joncțiunii osoase, sugerând o osteointegrare eficientă. Lotul II demonstrează un proces insuficient de conectare structurală a grefei- figura 27, tabelul 16.



**Figura 28. Rezultatele statistic semnificative petru Radiografia membrului ziua 28-a** prin utilizarea sistemelor de scor standardizate ale *System for Evaluation of the Fracture Healing of Bone Defects on Radiography*.

- A. Formarea țesutului osos, B. Consolidarea osoasă, C. Prezența joncțiunii osoase,  
D. Resorbția țesutului grefei.

Analiza comparativă a celor trei loturi experimentale (autotransplant osos vascularizat – Lot I, allotransplant osos vascularizat– Lot II și allotransplant vascularizat decelularizat – Lot III) prin intermediul testului Kruskal–Wallis evidențiază diferențe semnificative în dinamica regenerării osoase, atât în ceea ce privește formarea de os nou, cât și în ceea ce privește mineralizarea, integrarea grefei și resorbția tisulară. Formarea de țesut osos la 28 de zile- datele arată o diferență în Lotul III, unde allotransplantul decelularizat a prezentat cele mai mari valori ale formării osoase. Autotransplantul (Lot I) a demonstrat un nivel bun de osteogeneză, însă inferior celui din Lotul III, în timp ce allotransplantul simplu (Lot II) s-a situat consistent la

nivelurile cele mai scăzute. Acest rezultat sugerează că vascularizarea din interior spre exterior influențează semnificativ procesul osteogenic încă din prima lună post-implantare, gerând o integrare eficientă - figura 28.

Astfel, Lotul III demonstrează ea mai intensă formare osoasă, cea mai bună consolidare a regeneratului, o resorbție optim echilibrată a grefei, formarea unei joncțiuni osoase solide. Lotul I prezintă, de asemenea, o evoluție foarte bună: formare osoasă și consolidare consistente, joncțiune osoasă bine formată, resorbție lentă, dar stabilă. Lotul I reprezintă o variantă eficientă, dar ușor inferioară Lotului III. Lotul II este net inferior celorlalte două loturi: formare osoasă redusă, lipsă de consolidare și resorbție exagerată cu o joncțiune osoasă insuficientă.

Analiza comparativă a dinamicii în imaginile radiografice confirmă că decelularizarea (Lotul III) reușește să transforme un grefon potențial imunogen într-o matrice stabilă, care facilitează o remodelare echilibrată, spre deosebire de alogrefa nativă (Lotul II), unde resorbția accelerată compromite integritatea structurală a reconstrucției

**E. Examinarea histologică a segmentelor de os:** după sacrificarea animalelor (30 zile) pe loturile de studiu. Descrierea histologică pe loturi de studiu a plastiei ortotopice a defectelor osoase tubulare critice la NZWR a fost efectuată prin colorație cu hematoxilină-eozină la microscop optic a segmentului de femur supus plastiei defectului osos pre-operator și postoperator (după sacrificarea animalului la a 30-a zi de experiment). La o lună după operație, macroscopic au fost detașate toate țesuturile moi, cu secționarea segmentului de os grefat. Periostul deasupra grefei este îngroșat în toate trei loturi de studiu. Sub periost se determină țesut conjunctiv lax, multe vase sangvine, care au fost înlăturate.

**Lotul I (autogrefă osoasă vascularizată)** de studiu prezintă postoperator semne histologice de remodelare a traiectului haversian al grefei, cu țesut osos imatur cu un număr mare de osteocite și fibre de colagen dezorganizate (hematoxilină-eozină). Secțiunile histologice confirmă că grefa autogenă este biocompatibilă și are o citotoxicitate joasă. Grefa este integrată în țesut osos nou format și provoacă o cascadă de evenimente celulare din partea lojei recipientului. După modelarea cheagului de sânge, grefa autogenă este înconjurată de țesut conjunctiv lax bogat de capilare sangvine, care înaintază între fibrele colagene. Fibrocitele se înmulțesc și se diferențiază în osteoblaste și osteoclaste. Limfocitele apar în toate câmpurile de vedere, dar nu se adună în mai multe rânduri, ceea ce ne permite să concluzionăm că nu este o reacție patogenică. Putem considera că are loc osteogeneza desmală, trecând prin toate etapele de modificare a țesuturilor pentru a obține forma definitivă - figura 29.

Pe parcursul modificărilor tisulare, grefa rămâne integrată în regeneratul nou format. Apoi, apar primele sisteme osteonice, care au o viață tranzitorie, fiind lizate de către osteoclaste și

înlocuite de sisteme osteonice maturizate, cu o arhitectonică de lamele osoase, așezate deja nu haotic, dar paralel circular cu un canal haversian clasic în centru. În ceea ce privește rezultatul restructurărilor respective de maturizare a regeneratului osos, în regiunea defectului, se formează o placă de os compact. Capacitățile osteoinductive ale grefei autogene prelucrate pot fi explicate prin păstrarea în componența matricei osoase a unei familii întregi de proteine morfogenetice osteoinductive [140].

**Lotul II (alogrefă osoasă vascularizată)**, a fost cercetat histologic în condiții similare, plastia defectului osos fiind efectuată cu grefe compozit, stocate anterior la frigider +4°C pentru maxim 3-4 zile, de la animal de laborator NZWR. Secțiunile histologice confirmă că grefa alogenă osoasă prezintă resorbția țesutului osos în zona de adiție osoasă, cu debut de la periferie spre centrul grefei, lăsând un spațiu între țesutul osos cortical și limitele externe ale grefei. Activitatea osteoformatoare este mai accentuată în jurul lacunelor osoase ce mărginesc cu grefa, țesutul osos al gazdei încercând să umple aceste lacune cu os nou format.

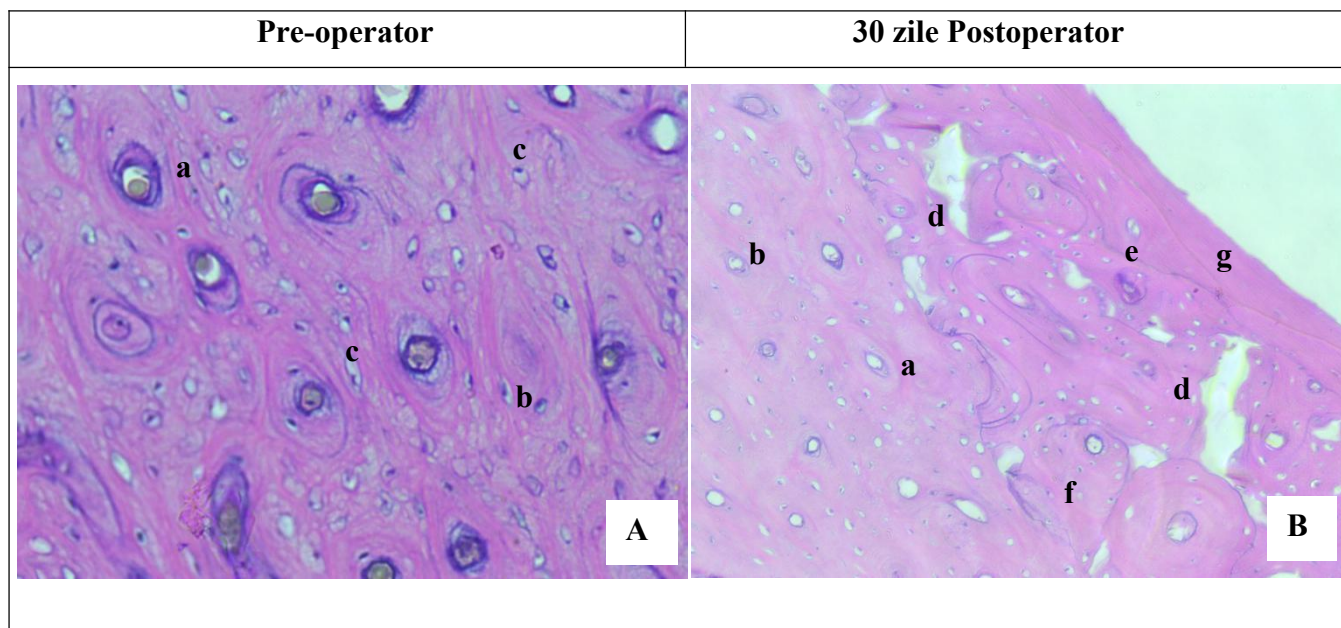
Apoziția de os nou s-ar realiza tot dinspre periferia grefei, dar persistă resorbția cu participarea osteoclastelor și se substituie cu țesut osos imatur neordonat, fără remodelare în structura lamelară tipică osului matur.

Timpul de resorbție osoasă a fost mai rapid decât timpul necesar organismului gazdă de a forma os nou. Astfel, au rezultat spații optic vide la nivelul corticalei adiționate, fiind evidente la microscopia optică, dar și în imaginile radiologice. Noul țesut osos cortical are o structură neomogenă, dezorganizată, datorită numeroaselor lacune osoase, în care nu s-a apoziționat os nou, dar și datorită reacției de inflamație cronică granuloasă gigantocelular - figura 30.

**Lotul III (alogrefă osoasă vascularizată decelularizată)**, a fost cercetată histologic în condiții similare, plastia defectului osos fiind efectuată cu grefele alogene compozit os+vas decelularizate prin metodă mixtă, stocate anterior la congelator -82.4°C pentru câteva luni, de la animal de laborator NZWR. La microscopul optic am urmărit prezența celulelor osteoblaste și osteocite în zonele adiționate grefei decelularizate.

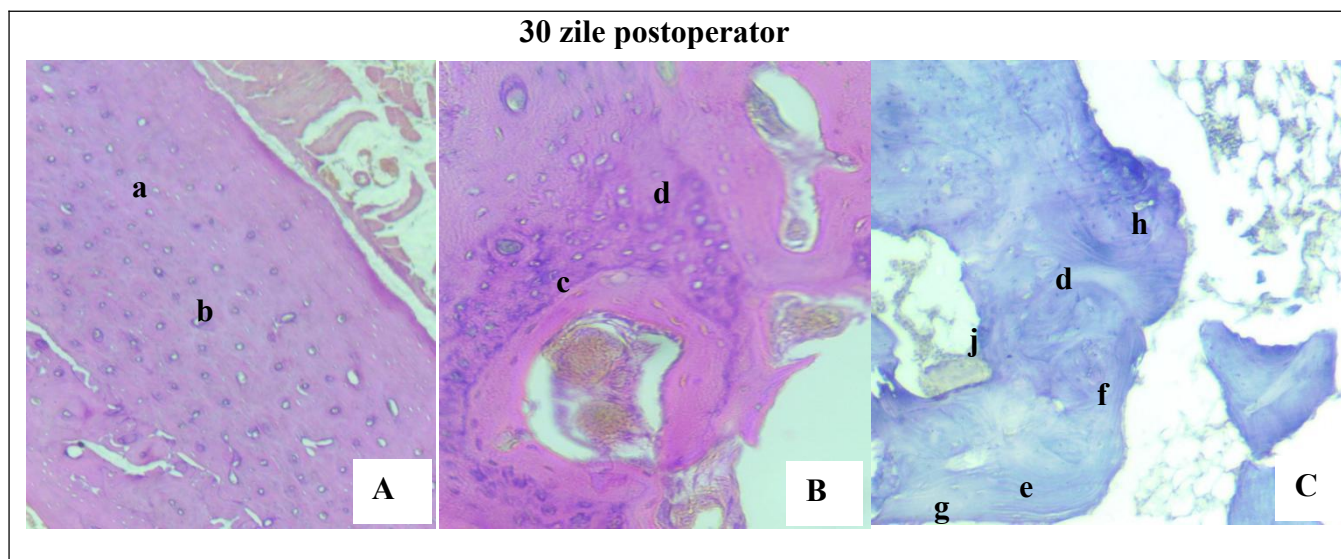
Am identificat zonele de os nou format prin densitatea de celule osteoformatoare, dar și prin aspectul caracteristic histopatologic tipic al osului nou format. Astfel, densitatea osteoblastelor și osteocitelor este satisfăcător, excluzându-se efectul citotoxic al grefei decelularizate.

Se determină segmente de remodelare osoasă haversiană, comparativ cu Lotul I, este mai lentă. De asemenea, se determină repopularea celulară a grefei osoase decelularizate. Nu se determină pe secțiunile histologice cercetate la subiecții de cercetare din lotul III manifestări ale reacției de inflamației cronice prin conglomerate granuloase gigantocelulare - figura 31.



**Figura 29. Examinare histologică Lot I - Autogrefă osoasă vascularizată**

- A.** a. țesut osos haversian și vas haversian, b. prezența osteocitului în lacunele osoase, c. substanță fundamentală osoasă în volum normal,
- B.** a. țesut osos haversian și vas haversian, b. prezența osteocitului în lacunele osoase, d. substanță fundamentală osoasă rărită dar nemodificată cu fragmentarea trabeculelor osoase, e. țesut osos haversian nou format, f. linia Sharp, g. țesut osos imatur cu un număr mare de osteocite și fibre de collagen dezorganizate, H-EX90.

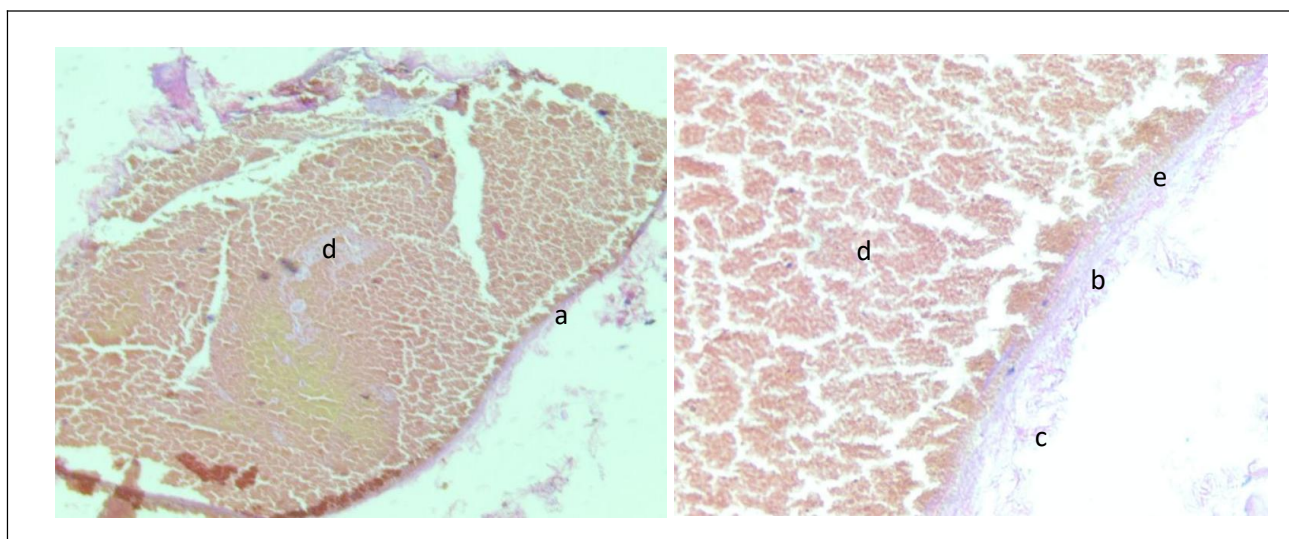


**Figura 30. Examinare histologică Lot II (Alogrefă osoasă vascularizată).**

- A.** a. epuizarea substanței fundamentale osoase, b. epuizarea osteocitelor din lacunele osoase,
- C.** c. conglomerat de osteocite, d. zona de trabecule osoase noi și canale Haversiene incomplete,
- D.** d. zona de trabecule osoase noi și canale Haversiene incomplete, fragmentate, e. zona de necroză cu rezorbție osoasă, f. epuizarea substanței osoase, g. absența substanței osoase fundamentale, proces ischemic, h. spații optice vide la nivelul corticalei adiționate, j. reacție inflamatorie cronică granuloasă gigantocelulară, H-EX90, H-EX40

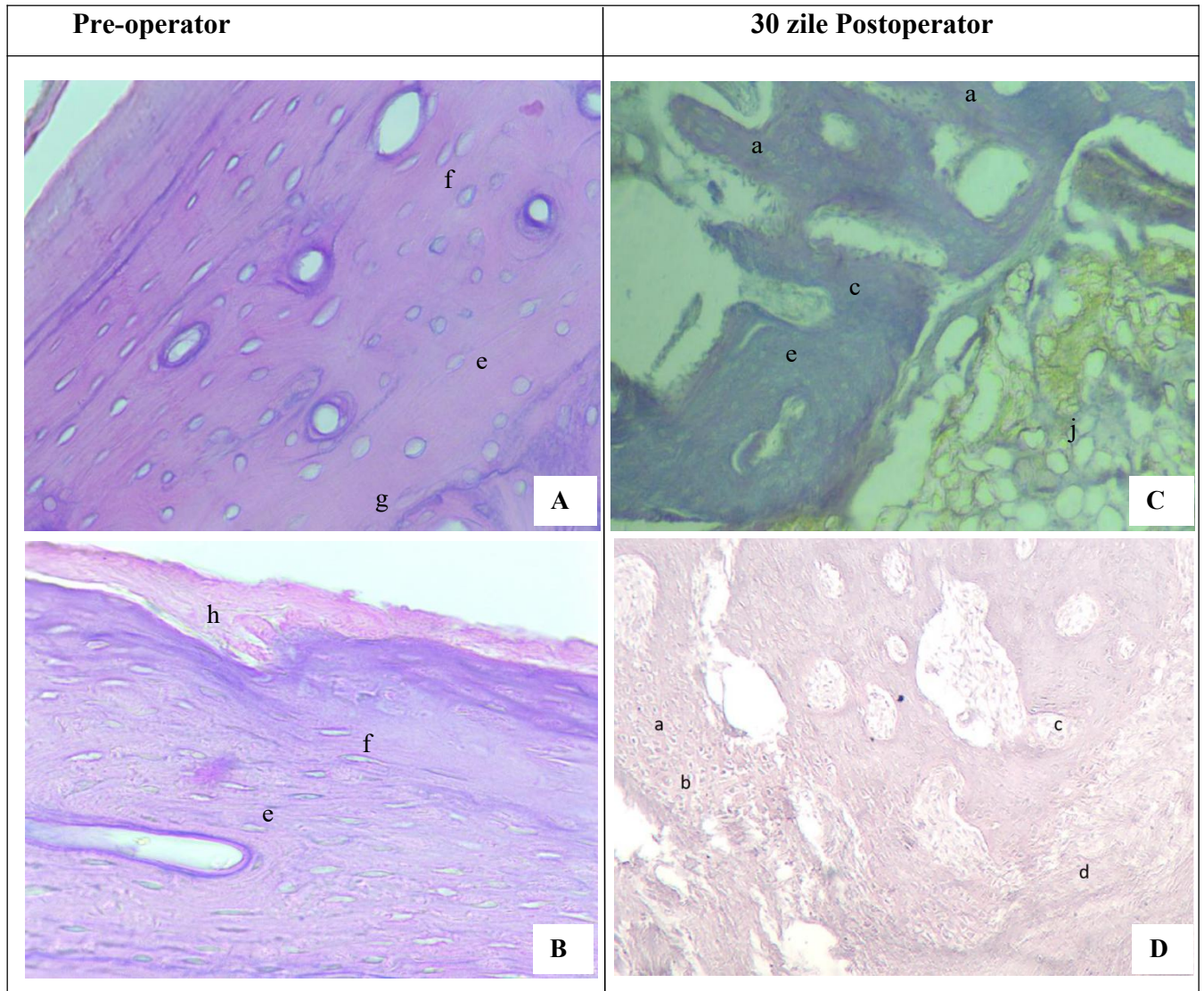
A fost cercetat histologic în condiții similare, pe loturile de studiu și segmentele vasculare ale grefei compozit os+vas, atât native, cât și decelularizate de la animal de laborator NZWR. Secțiunile histologice confirmă prezența celor trei straturi distincte care formează pereții arterelor, atât la grefele native, cât și cele decelularizate. Stratul interior este tunica intimă, căptușită de endoteliu, care este format din celule epiteliale scuamoase simple. La grefele decelularizate el rămâne intact, cu absența nucleelor intracelulare. La adâncimea endoteliului se află o membrană bazală și un strat de țesut conjunctiv subendotelial care oferă suport celulelor de deasupra; în urma decelularizării el devine dezorganizat. Stratul muscular sau tunica medie este formată din țesut muscular neted care conține și produce matricea extracelulară la acest nivel.

După procesul de decelularizare acest strat își păstrează arhitectonica, dar devine dezorganizat structural, iar conținutul nuclear celular este absent. Stratul exterior este tunica adventicială, cunoscută și sub denumirea de tunica externă. Acest strat este compus în principal din collagen de tip I și țesut conjunctiv elastic (în cazul arterelor). Acest strat exterior este responsabil pentru ancorarea vaselor la organele adiacente. În urma procesului de decelularizare el este practic absent, fiind determinate doar câteva formațiuni fibroconjunctivale. În lumenul vascular se determină elemente sangvine cu preponderență masă trombocitară, aderente la endoteliul decelularizat al vasului. Dar lumenul vascular prezintă segmente libere pentru pasajul sangvin. Se determină interpoziționarea celulelor sangvine în peretele decelularizat al vasului la 30 zile de aflare în circuitul adoptiv gazdă - figura 32.



**Fig. 32 Cercetarea histologică a segmentului vascular decelularizat postoperator.**

a. endoteliu vascular decelularizat cu structura conjunctivă păstrată, b. tunica musculară decelularizată cu structura conjunctivă păstrată, c. tunica adventicială decelularizată cu structura conjunctivă păstrată, d. lumen vas decelularizat postoperator cu conglomerat de elemente sangvine, preponderent trombocite, eritrocit, e. interpoziționarea celulelor sangvine în endoteliu și tunica musculară al vasului.



**Figura 31. Examinare histologică Lot III - Alogrefă osoasă vascularizată decelularizată.**

**A-** e. țesut osos haversian acelular, f. lacune osoase fără celule, g. epuizarea substanței osoase fundamentale, h. țesut fibro-conjunctiv decelularizat,

**B-** e. țesut osos haversian acelular, f. lacune osoase fără celule, h. țesut fibro-conjunctiv decelularizat, **C-** a. conglomerat de osteoblaste cu proliferare ce determină segmente de remodelare osoasă și repopulare celulară a grefei, c. rezorbție osoasă, e. țesut osos haversian acelular c. rezorbție osoasă, d. fibroză, e. țesut osos haversian acelular, j. țesut osos medular, **D-** a. conglomerat de osteoblaste cu proliferare ce determină, b. segmente de remodelare osoasă și repopulare celulară a grefei, c. cub de formare de osteoid, d. rezorbție osoasă, d. fibroză, H-EX90, H-EX40

## DISCUȚII

Metodele actuale de reconstrucție a defectelor mari ale scheletului prezintă multiple limitări, ceea ce face ca tratamentul defectelor segmentare ale oaselor tubulare lungi să rămână o provocare majoră în chirurgia reconstructivă. Acest lucru se datorează în principal capacității limitate de regenerare spontană a osului în absența unei vascularizații adecvate [89, 100]. Deși osul are, în mod natural, o remarcabilă capacitate de autovindecare, atunci când dimensiunea defectului depășește un prag critic, procesele fiziologice de regenerare sunt compromise, iar vindecarea completă nu mai poate avea loc spontan. Menținerea unei vascularizații optime este esențială pentru succesul regenerării osoase, care altfel devine insuficientă în contextul defectelor extinse [101].

Studiul *in-vivo* de cercetare experimentală la etapă preclinică pe plastia defectelor osoase tubulare cu alogrefe osoase vascularizate decelularizate prezintă o semnificație complexă și se referă la explorarea unei metode avansate de reconstrucție osoasă. Cercetarea premiselor de plastie a defectelor osoase tubulare prin metoda experimentală *in-vivo* cu alogrefe osoase vascularizate decelularizate incluse în circuitul vascular gazdă la animale de laborator mici și medii pentru testarea ulterioară preclinică și clinică prezintă un studiu inovator și promițător pentru tratamentul defectelor osoase mari, care ar putea revoluționa reconstrucția osoasă și îmbunătăți semnificativ calitatea vieții pacienților cu leziuni severe ale oaselor lungi.

Astfel, scopul cercetării date, derulate în cadrul studiilor de doctorat, subliniază combinația inovatoare ce aduce o contribuție semnificativă în domeniul bioingineriei osoase, oferind o alternativă promițătoare la metodele tradiționale de plastie osoasă, în special în situațiile clinice complexe, unde autogrefele nu sunt suficiente. Oaselor lungi (ex: femur, tibie), sunt specifice prin faptul că suportă acțiune mecanică sporită, necesită stabilitate biomecanică ridicată și au vascularizație complexă. Abordarea acestui subiect aduce originalitate clinică și experimentală într-un context ortopedic foarte provocator.

Opțiunile de reconstrucție actuale includ utilizarea substituenților osoși cum ar fi alogrefele crioconservate, transportul osos, înlocuire protetică, osteogeneză indusă de membrană, și autogrefele osoase vascularizate, toate cu o incidență semnificativă a complicațiilor și eșecului. În ciuda progreselor în domeniul biomaterialelor și al tehnologiilor de substituție osoasă, majoritatea înlocuitorilor osoși disponibili au fost utilizați aproape exclusiv pentru tratarea defectelor osoase de mici dimensiuni, în special în context clinic. Aceștia au fost validați în situații în care condițiile de regenerare osoasă sunt favorabile, iar defectul nu depășește limita critică a auto-vindecării. Totuși, eficiența lor în reconstrucția defectelor segmentare de mari dimensiuni, unde suportul mecanic și vascularizarea sunt esențiale, rămâne limitată sau insuficient documentată. Această restrângere a utilizării se explică prin lipsa unei integrări

vasculare eficiente, a unei arhitecturi tridimensionale adaptabile și, în multe cazuri, prin lipsa datelor preclinice solide care să susțină extinderea indicațiilor acestor materiale la defectele osoase complexe. Astfel, nevoia dezvoltării unor grefe compozite cu suport osteoconductor și integrare vasculară devine o direcție prioritară în cercetarea reconstructivă actuală [28, 30, 97, 109].

Grefele osoase vascularizate sunt net superioare din perspectiva vaselor sanguine, care servesc ca un șablon de bază, în jurul căruia are loc dezvoltarea structurii osoase prin aportul de elemente critice pentru homeostazia osoasă în micromediul osteogen, inclusiv minerale, factori de creștere și celule progenitoare osteogene. Vascularizarea osului este efectuată de arterele intramedulare, vasele periostale și arteria nutricia. Ultima joacă un rol esențial în fortificarea întregului proces de consolidare osoasă [28, 30, 35, 106]. În timpul proceselor de regenerare osoasă, în special a osului cortical, prezența unei rețele capilare intraosoase joacă un rol critic. De fapt, vasele de sânge transportă celule progenitoare osoase, diverse pericite și molecule bioactive în această zonă. S-a demonstrat că factorul de creștere derivat din trombocite, eliberat de pre-osteoclaste, poate duce la creșterea osificării, precum și la angiogeneză, ca urmare a interacțiunilor dintre moleculele celulelor osoase și suprafața exterioară a vaselor de sânge [103, 107, 108].

Etapă de cercetare a vascularizării membrului posterior la animalul de laborator mediu NZWR a urmărit identificarea segmentului optim de os tubular lung care beneficiază de o sursă vasculară adecvată pentru integrarea microchirurgicală prin anastomoză în circuitul vascular al gazdei. Acest aspect este esențial, având în vedere că procesul de decelularizare implică atât structurile vasculare, cât și țesuturi osoase spongioase și corticale, cu proceduri chimice și fizice intensive și agresive, ce au un potențial de alterare a integrității matricei extracelulare.

Cercetând structura și compoziția osului tubular lung, ne dăm seama că diafiza, porțiunea principală a osului, se va confrunta cu deficiențe nutriționale mai severe decât alte părți ale osului lung după leziuni osoase segmentare mari, ceea ce face ca repararea acestuia să fie o mare provocare. Se raportează că 5-10% dintre pacienții cu defecte osoase tubulare lungi segmentare mari vor fi invalidați din cauza unirii întârziate sau a pseudartroză a fragmentelor. În ultimul deceniu, s-au făcut multe încercări în ingineria țesutului osos pentru a promova repararea defectelor osoase cu schele în combinație cu celule osteoprogenitoare. Cu toate acestea, aceste schele proiectate prezintă un efect curativ suboptim din cauza lipsei celulelor progenitoare și a rețelei vasculare, ceea ce duce adesea la necroză tisulară [87, 100].

Transplantul osos autolog este considerat „standardul de aur” pentru repararea osului datorită caracteristicilor sale excelente de osteogeneză, histocompatibilitate, viteză mare de vindecare a osului și fuziune osoasă completă. Prezența celulelor progenitoare periostale vii pe

suprafața autogrefelor osoase conferă o vindecare mai bună decât alogrefa devitalizată. Cu toate acestea, există multiple limitări, cum ar fi sursa restrânsă în cazul necesităților defectelor osoase critice și riscul de complicații ale locului donator. Deci, principalele dezavantaje ale transplantului osos autolog sunt timpul lung de operare, traumatismele secundare mari și locurile donatoare limitate. O abordare multidisciplinară care implică chirurghi ortopedici, plastici și vasculari este esențială pentru a optimiza ratele plastiei [84, 87, 101, 102].

Cercetarea literaturii de specialitate cu formarea bazei de date de peste 600 surse, ce le-am stocat în cadrul soft-ului PaperPile, prezintă rezultate de concentrare a comunității științifice pe studierea grefei osoase vascularizate simple sau combinate, cu factori locali și sistemici care cresc bioactivitatea osoasă.

„Conceptul de diamant”, fiind un cadru conceptual pentru un răspuns de succes al reparației osoase, acordă o importanță egală stabilității mecanice și mediului biologic. Mai mult, vascularizația osoasă adecvată și starea fiziologică a gazdei sunt considerate esențiale în acest cadru de consolidare. Disponibilitatea mediatorilor osteoinductivi, a celulelor osteogene, a unei matrici osteoconductive (schela), a mediului mecanic optim, a vascularizației adecvate și abolirea oricăror comorbidități existente ale gazdei creează premise favorabile pentru o consolidare [110]. Astfel, vascularizarea defectelor osoase este considerată o componentă crucială pentru regenerarea cu succes a defectelor osoase mari [76]. Inducerea creșterii vaselor de sânge sau a neoangiogenezei influențează decisiv funcționalitatea transplantului [77]. Celulele viabile din cadrul unei grefe pot fi celulele supraviețuitoare derivate din grefă, descendenții lor sau celulele derivate de la gazdă din circulație sau osul înconjurător [75]. Transplantul de os alogen viu permite avantajele ortotopicității - potrivirea osului donator cu locul primitor, combinat cu proprietățile de vindecare și remodelare dorite ale osului viu [89].

Studiile demonstrează că alogrefele osoase masive sunt revascularizate foarte lent și sunt ancorate intim de osul gazdă, cu condiția ca controlul eficient al inflamației și infecția grefei să fie evitată [99]. Alotransplantul de țesut compozit reprezintă o nouă disciplină în chirurgia reconstructivă. Vasculopatia grefei reprezintă un obstacol în calea supraviețuirii pe termen lung a osului vascularizat, astfel trebuie dezvoltate instrumente adecvate de monitorizare [93]. Vascularizarea este un obstacol major în grefele osoase – integrarea unui sistem vascular (prin prevascularizare *in vitro* sau inducție *in vivo*) este încă în fază de cercetare activă.

Succesul după alogrefa osoasă vascularizată este asigurat prin menținerea circulației pe artera nutricia și microcirculația sângelui. Anastomoza microchirurgicală a pediculului alogrefei ar admite crearea condițiilor optime pentru o revascularizare suficientă soldată cu consolidarea, rezistența și o rigiditate crescută a segmentului. Astfel, grefa osoasă vascularizată este considerată superioară celei nevascularizate. Sarcina sa este nu numai să înlocuiască structural

defectul, ci și să se angajeze biologic în formarea de os nou. Pentru a crește vindecarea osoasă este esențială, o vascularizare adecvată și o excelentă stabilitate mecanică. Deoarece alogrefele osoase nu numai că înlocuiesc osul lipsă, dar ajută și la reconstrucția osului pierdut, acționând ca o schelă pentru osteoconducție și ca sursă de celule osteogene și osteoinductoare pentru formarea osului. Pentru a crește vindecarea osoasă este esențială, o vascularizare adecvată și o stabilitate mecanică excelentă. Alotransplantul osos vascularizat, prin urmare, pentru prima dată îndeplinesc perfect specificațiile pentru chirurgia de reconstrucție definite de Harold Gillies: „*replace the lost part like with like*”. Dacă ne gândim bine, nicio tehnică actuală de autogrefă sau reconstrucție nu poate oferi un astfel de rezultat [95, 96, 111].

Interacțiunea celulelor sanguine imunocompetente cu endoteliul vascular al grefei este prima etapă din cascadă care induce ischemia, tulburarea de reperfuzare și rejet. Oprirea microcirculației prin alogrefă este considerată cauza principală a eșecului grefei [112, 113]. Ramificațiile clinice ale transplanturilor osoase la om nu sunt analoge cu situația clinică a transplantului de alte organe. Dacă la etapa clinică se efectuează alotransplantul de os vascularizat, este necesară o formă relativ sigură de imunosupresie [79]. Imunosupresia marchează progresul în transplantologia contemporană. Fiind demonstrat că grefele osoase vascularizate sunt superioare, mai ales pentru reconstrucția defectelor mari, deoarece păstrează proprietatea de osteogeneză. Dilema cerută de alogrefele osoase vascularizate înseamnă necesitatea unei imunosupresii și imunomodulări postgrefare. Transplantul membrilor, articulațiilor, țesutului osos nu este similară cu transplantul de organe vitale precum inima, ficatul, care necesită imunosupresie pe termen lung pentru a evita complicațiile sistemice. Iar în cazul țesutului musculo-scheletal, necesarul de medicație este de 2-3 ori mai mare decât în cazul transplantului de organe. La scară largă, imunosupresia pe termen lung nu se justifică, iar riscul indus de toxicitatea organică, malignitate sau alte complicații nu îl justifică în aceste situații vitale necritice [8, 9, 10, 98]. Experiența mondială demonstrează în mod clar că alotransplantul osos vascularizat este fezabil și oferă rezultate clinice valoroase. Imunosupresia (la o doză de transplant de rinichi sau mai mare) rămâne esențială până în prezent. Dezbaterea etică rămâne: pentru a restabili o funcție de membru pierdută, avem dreptul să expunem un pacient tânăr și sănătos la complicațiile și riscurile imunosupresiei? Principala speranță pentru viitor este inducerea toleranței, care va necesita probabil prezența în alogrefă a măduvei osoase vascularizate. Când ne putem lipsi de imunosupresie sau reduce semnificativ riscurile, indicațiile de transplant în Ortopedie-Traumatologie vor depăși cu mult ca frecvență indicațiile actuale pentru transplantul de inimă, plămâni, ficat, rinichi și pancreas [96].

Alotransplantul osos vascularizat fără riscurile pentru sănătate ale medicamentelor imunosupresive sau inducția toleranței ar fi un progres important. Studiile recente prezintă

transferul osos microchirurgical cu dezvoltarea unui nou aport de sânge osos derivat de gazdă prin neoangiogeneza chirurgicală. Imunosupresia trebuie doar să permită suficient timp pentru ca angiogeneza să se instaleze, iar toleranța specifică donatorului nu este o condiție prealabilă pentru supraviețuirea osoasă [81]. O metodă nouă prin care transplantul unui astfel de țesut ar putea fi realizat fără riscurile imunosupresiei pe tot parcursul vieții, este neoangiogeneza chirurgicală pentru a dezvolta o nouă rețea și aport sangvin osos derivat de gazdă [89].

Neoangiogeneza chirurgicală derivată din țesutul autogen implantat îmbunătățește viabilitatea osului greșat. Combinația de reconstrucție vascularizată a țesuturilor moi și reconstrucție osoasă folosind os alogen împreună cu angiogeneza chirurgicală s-a dovedit a fi eficientă în testările preclinice in-vivo [90, 92]. Viabilitatea transplanturilor de alogrefă osoasă vascularizată este păstrată după retragerea imunosupresiei, cu condiția ca designul greșei și pregătirea locului receptor să permită neovascularizarea epifizară și metafizară [86]. Investigațiile ulterioare pot confirma neoangiogeneza derivată de la gazdă ca alternativă la inducerea toleranței sau imunosupresia în alotransplantul osos [88]. Este de fapt posibil, folosind aceste tehnici, să se realizeze reconstrucții complexe prin transplant revascularizat de țesuturi echivalente, dar normale, prelevate de la un donator de organe, fără morbiditate la locul donor, deoarece nu există loc donor. Țesuturile transplantate sunt flexibile și bine vascularizate, ceea ce este avantajos în zonele iradiate sau sclerotice. La copii, cartilajele de creștere epifizare își mențin potențialul de creștere.

Menținând proprietățile osteoplastice ale autogrefei vascularizate, combinându-le cu caracteristicile ortotopice ale unui os alogen, acestea ar fi o alternativă de succes pentru chirurgia reconstructivă a sistemului osos dacă se vor rezolva problemele de imunosupresie. Transplantul de o alogen vascularizat poate fi o potențială soluție „perfectă” în cazul defectelor osoase critice, numai dacă pot fi evitate riscurile semnificative și nejustificate ale imunosupresiei pe termen scurt și lung [61, 62, 63].

O altă posibilitate de a omite răspunsul imun al gazdei în urma alotransplantului osos vascularizat este de a extrage conținutul imunogen, altfel zis membrana celulară străină, care este percepută rapid de către sistemul imun al recipientului. Metode de decelularizare au fost implementate de către ingineria tisulară pentru diferite țesuturi, inclusiv osteoarticulare. [102, 113, 114, 115].

Originalitatea subiectului de cercetare în teză constă în combinarea acestor două tehnologii moderne: decelularizarea și vascularizarea greșei într-un singur construct osos, ceea ce favorizează integrarea rapidă, crește rata de supraviețuire a greșei, permite reconstruirea unor defecte de dimensiuni mari, greu de tratat altfel. O metodă de decelularizare mixtă a alogrefei compozit os+vas a fost propusă în cadrul Laboratorului de Inginerie Tisulară și Culturi Celulare

a USMF "N. Testemițanu", care s-a dovedit a fi eficientă în extragerea materialului celular atât la nivel osos, cât și vascular [83].

Aplicarea decelularizării pe țesut osos vascularizat, menținând atât proprietățile structurale osului cât și cele ale vasului, nu doar că asigură suport mecanic, dar și perfuzia grefei, astfel creează și premisele biologice necesare pentru aportul de factori de creștere osoasă endogeni din partea organismului gazdă, facilitând astfel procesul de integrare, osteoinducție și osteoconsolidare *in vivo*. Această metodă poate oferi un cadru tridimensional care susține creșterea celulară, stimulează formarea de os nou și permite vascularizarea din interior spre exterior a grefei osoase. Originalitatea și caracterul inovator al acestei cercetări rezidă în abordarea integrată a regenerării osoase prin utilizarea unei grefe compozite decelularizate, care combină suportul structural oferit de osul cortical și spongios cu avantajele unei structuri vasculare conservate, capabile de reconectare microchirurgicală la sistemul circulator al gazdei. Această strategie depășește limitele modelelor convenționale, care nu includ componente vasculare funcționale, și propune o soluție biologică complexă, ce permite aportul direct de factori osteoinductivi și celule din microcirculația gazdei, facilitând astfel integrarea grefei și consolidarea osoasă. În literatura de specialitate, astfel de modele experimentale rămân rare, ceea ce subliniază caracterul de pionierat al acestei direcții de cercetare în domeniul ingineriei tisulare și al chirurgiei reconstructive ortopedice.

Etapă a III-a de cercetare din cadrul acestei teze a fost demonstrată rezistența mecanică *in-vivo* a matricei extracelulare a vasului sanguin decelularizat la unda pulsatilă, TA și la o anastomoză microchirurgicală pentru a fi incluse în circuitul vascular gazdă. Microanastomoza arterială terminoterminală dintre o arteră nativă și pediculul decelularizat al grefei nu a prezentat particularități tehnice [85]. Grefele au menținut patența vasculară imediată, au rezistat la presiunea intra-arterială și nu au generat reacții inflamatorii sistemice semnificative, conform analizelor hematologice comparative între loturi.

Microanastomoza arterială *end-to-side* este o tehnică utilizată pentru revascularizarea lambourilor libere în chirurgia reconstructivă, pentru a restabili alimentarea cu sânge a membrilor traumatizate sau pentru a revasculariza lambourile libere la nivelul membrilor. În această tehnică, se creează o deschidere în partea laterală a arterei primitoare, iar capătul arterei donatoare este cusut la deschidere, astfel încât să permită sângelui să curgă din artera primitoare în artera donatoare. În mod tradițional, această tehnică presupune crearea unui orificiu în artera receptoare pentru a asigura o rată de permeabilitate ridicată. Un alt factor important atunci când se încearcă crearea unei anastomoze eficiente cu flux adecvat și fără eșec (tromboză), este evitarea transferării stratului opus suturii. Pentru aceasta, este necesară trecerea suturilor sub vizualizare directă [118, 119, 120, 121].

Experimentele chirurgicale pilot *in-vivo* implică animale de laborator. Printre modelele de animale medii, iepurii furnizează rețea vasculară cu un calibru suficient pentru implantarea anastomotică a grefelor vasculare ca teste preclinice înainte de a efectua studii mari pe animale. Iepurii au un mecanism hemostatic similar cu cel uman și pot găzdui grefe vasculare cu diferite diametre în locații diferite și, astfel, oferă un model valid pentru evaluarea grefelor vasculare cu diametru mic. Din punct de vedere histologic, oasele lungi de iepure au o microstructură foarte diferită de cea a ființelor umane. În comparație cu alte specii, cum ar fi primatale și unele rozătoare, iepurele are o schimbare mai rapidă a scheletului și a turnover-ului osos (intra-cortical semnificativ, remodelare Haversiană). Acest lucru poate face dificilă extrapolarea rezultatelor din studiile efectuate la iepuri asupra răspunsului clinic probabil uman. Cu toate acestea, iepurii sunt utilizați în mod obișnuit ca model animal pentru cercetările experimentale pe oase *in-vivo* [117, 122].

După ce am determinat *in-vivo* că un vas arterial, după procesul de decelularizare efectiv pentru țesut osos, rezistă la aspectul mecanic al activității circulatorii (TA, unda pulsativă), precum și la manipulările de anastomoză, a fost cercetat *in-vivo* țesutul osos vascularizat decelularizat pentru capacitatea acestuia de plasticitate a unui defect mare al osului tubular - femur la animalul de laborator mediu NZWR. Animalele de laborator au fost examinate pe loturi din aspect clinic, paraclinic, imagistic și histologic.

Evoluția postoperatorie clinică locală a fost monitorizată prin inspecția zilnică a plăgii operatorii și evaluarea funcționalității membrului posterior operat, în zilele 1, 5, 10 și 15 postintervenție. În primele 48 de ore s-au remarcat semne inflamatorii fiziologice (tumefacție, hiperemie, căldură locală), urmate de regresie treptată. Epitelizarea a început din ziua a 5-a, cu cicatrizare completă la ziua 15, în absența complicațiilor supurative. Din punct de vedere funcțional, sprijinul pe membru a fost absent în ziua 1, progresând treptat până la sprijin aproape complet la ziua 15, corelat cu reducerea durerii și stabilitatea mecanică a reconstrucției. Progresul funcțional depinde de: tipul de greafă ososă vascularizată (autoloagă, alogenă, decelularizată), durerea și inflamația postoperatorie.

Am evaluat răspunsul sistemic postoperator și statusul metabolic al osului prin să monitorizarea parametrilor biochimici și hematologici serici, în special:

- Formula leucocitară (pentru inflamație / infecție)
- ALP (fosfataza alcalină – marker fazei de liză sau de remodelare activă a osului)
- Calciu seric (Ca), Fosfor seric (P) (evaluarea indirectă a activității osteoblastice și a procesului de mineralizare osoasă activă).

Determinările serice au evidențiat o creștere semnificativă a leucocitozei și a procentului de neutrofile în ziua 14 postoperator în toate grupurile, cu revenire progresivă spre valorile de

referință până la ziua 28-a. Valorile ALP au fost crescute semnificativ în Loturile II și III, sugerând o activitate osteoblastică accentuată asociată consolidării grefei. Calciul și fosforul seric au prezentat valori stabile, cu tendință ușoară de scădere în perioada de formare osoasă activă, fără semne de dezechilibru major.

Evaluarea radiologică a membrului posterior operat s-a realizat prin efectuarea de radiografii standardizate la 2 și 4 săptămâni postoperator, utilizând sistemul de scor SEFHB-R (*System for Evaluation of the Fracture Healing of Bone Defects on Radiography*). Parametrii urmăriți au inclus prezența și cantitatea calusului osos, continuitatea corticalei, gradul de estompare a liniei de defect și nivelul de remodelare osoasă. Rezultatele obținute au fost interpretate, scorurile fiind comparate statistic între loturile studiate. Grefele autologe, Lotul I, au demonstrat o consolidare mai rapidă, în timp ce alogrefele decelularizate vascularizate - Lotul III, au prezentat o integrare progresivă, cu rezultate comparabile la săptămâna a 4-a.

Evaluarea radiografică este un instrument critic pentru clinicieni pentru a monitoriza progresul vindecării fracturilor și pentru a lua decizii informate cu privire la managementul pacientului. Mai multe sisteme și criterii sunt utilizate pentru a evalua vindecarea fracturii pe cale radiografică, concentrându-se pe prezența și calitatea formării calusului, a legăturii la locul fracturii și a continuității corticale. Capacitatea oricărei grefe de a promova vindecarea osoasă se bazează pe trei calități principale, enumerate anterior: - osteogeneză, prezența celulelor osteoblaste sau a celulelor precursorilor lor care sunt capabile să formeze țesut os nou; - osteoconducție, capacitatea grefei de a servi drept schelet pe care poate crește țesutul osos nou; și - osteoinducția- capacitatea de a induce diferențierea celulelor osteoprogenitoare în osteoblaste. Deși auto sau alogrefele oferă o alternativă pentru defecte osoase tubulare mari, evaluarea radiografică a acestor grefe necesită monitorizare pentru încorporarea grefei, precum și potențiala complicație cu fracturi. În plus, deoarece grefarea osoasă suferă un mecanism diferit de încorporare (substituție târâtoare), spre deosebire de o osificare intramembranoasă mai „naturală”, aceasta tinde să formeze o „bară” mai degrabă decât canalul cortexului mai fiziologic observat în consolidarea primară. În cele din urmă, radiografic se determină că alogrefele osoase demonstrează cel mai înalt nivel de opacitate în perioada postoperatorie timpurie și devin mai transparente cu timpul pe măsură ce grefa începe a se resorbi sau să se încorporeze în țesutul osos gazdă [141]. Evaluarea vindecării fracturilor defectelor osoase pe radiografie implică evaluarea sistematică a procesului de recuperare a osului; prin urmare, imagistica radiologică împreună cu evaluarea clinică rămâne abordarea cea mai frecvent utilizată pentru evaluarea vindecării defectelor osoase tubulare.

Examinarea histologică este o componentă esențială în evaluarea rezultatelor privind plastia defectelor osoase tubulare cu grefele osoase vascularizate conform loturilor de studiu (autogrefe,

alogrefe vascularizate, alogrefe osoase vascularizate decelularizate). Aceasta oferă dovezi obiective la nivel microscopic despre procesul de vindecare osoasă, integrarea grefei, formarea de os nou, reacții inflamatorii sau de respingere la nivel celular. Aspectele date au fost descrise pe segmentele osoase și vasculare colectate pe loturi intraoperatorii și după sacrificarea animalului.

Țesutul osos are capacitatea de autoreparare și regenerare, dar defectele osoase tubulare lungi de dimensiuni critice nu se pot vindeca intrinsec. Plastia chirurgicală cu transplant osos este necesară în cazul acestor pacienți. Majoritatea materialelor pentru tratamentul acestor defecte osoase sunt materiale ce au bioactivitate insuficientă și calități ortotopice insuficiente, rezultând o capacitate scăzută de regenerare osoasă, slăbire și eșec de transplant [102].

Osul alogen viu vascularizat, fără a fi nevoie de imunosupresie, ar fi o alternativă perfectă în tratamentul defectelor osoase masive. Cu alte cuvinte, cercetarea *in vivo* a alogrefelor osoase vascularizate pentru a omite potențialul lor imunogen prin decelularizare are o importanță tot mai mare. Metodele actuale de decelularizare a vasului păstrează rezistența vasculară [80, 83]. În acest context, experimentul *in vivo* de includere ortotopice în circuitul sanguin al gazdei a unei alogrefe osoase vascularizate decelularizate va permite descrierea atât a aspectelor vasculare, cât și a celor osoase în plastia eficientă a defectelor osoase vaste.

Originalitatea prezentului studiu rezidă în abordarea integrată a reconstrucției defectelor osoase tubulare de mari dimensiuni, utilizând alogrefe osoase decelularizate cu potențial de revascularizare. Această combinație inovatoare aduce o contribuție semnificativă în domeniul bioingineriei osoase, oferind o alternativă experimentală promițătoare la metodele tradiționale de plastie osoasă, în special în situațiile clinice complexe, unde autogrefele nu sunt viabile.

Contribuția originală a tezei constă în elaborarea și testarea experimentală a unei metode de plastie a defectelor osoase tubulare prin utilizarea alogrefelor osoase decelularizate cu potențial de revascularizare. Această abordare combină două direcții inovatoare – decelularizarea pentru reducerea antigenicității și inducția vasculară pentru integrare accelerată – într-un model aplicat pe oase lungi, cu relevanță și translație clinică majoră. Am realizat un protocol experimental original, am demonstrat fezabilitatea metodei și am obținut rezultate relevante care susțin aplicabilitatea acestei tehnici în reconstrucția osoasă de înaltă complexitate.

## CONCLUZII

Concluziile au fost formulate pentru fiecare etapă de studiu care a corespuns cu obiectivele trasate la debutul cercetării pentru atingerea scopului cercetării experimentale pilot *in-vivo*.

1. Metoda de utilizare a grefelor compozite decelularizate în reconstrucția defectelor osoase tubulare are un caracter inovator, interdisciplinar și de pionierat, contribuind la extinderea domeniului ingineriei tisulare și al microchirurgiei reconstructive ale locomotorului.

2. Structura vasculară matricială extracelulară a grefei osoase de femur la modelul de iepure NZWR asigură integrarea funcțională și plastia ortotopică a defectelor osoase tubulare lungi *in-vivo* cu o lungime prestabilită de 40–45 mm, cu pedicul vascular optim, de la artera nutricia până la artera iliacă internă.

3. Durata procedurii microchirurgicale de anastomoză vasculară cu vas decelularizat nu diferă de timpul necesar osteosintezei ortotopice a defectului osos, ceea ce demonstrează fezabilitatea tehnică a protocolului elaborat.

4. Metoda mixtă prestabilită de decelularizare asigură conservarea integrității arhitecturale a matricei extracelulare a vasului de tip muscular din grefa compozit. Grefele vasculare decelularizate mențin mecanic patența vasculară la anastomoza microchirurgicală *in vivo* cu o arteră nativă, asigurând un flux sanguin la interval de 60 minute.

5. Peretele vasului decelularizat nu este infiltrat cu macrofage și limfocite, deci procesul de decelularizare a eliminat eficient potențialul imun al donatorului, iar matricea endotelială nu este trombogenică

6. Alogrefele osoase vascularizate decelularizate (Lotul III) utilizate în plastia defectelor osoase critice demonstrează un potențial de osteoconsolidare comparabil cu cel al autogrefelor (Lotul I). Succesul integrării biologice este susținut de dinamica ascendentă a fosfatazei alcaline (de la 202,21 U/L la 245,32 U/L) și de menținerea unui echilibru metabolic între resorbție și formare (indice stabil de 1,75), spre deosebire de dezechilibrul osteolitic observat în cazul alogrefelor native (Lotul II). Aceste biomateriale oferă o alternativă funcțională și structurală viabilă, asigurând o recelularizare *in vivo* din interior spre exterior eficientă și o remodelare haversiană organizată.

7. Metoda proprie de plastie cu alogrefe compozite decelularizate a defectelor osoase tubulare este fezabilă tehnic, cu perspective aplicative în chirurgia reconstructivă și cu potențial de translație spre studiile preclinice și, ulterior, clinice. Această metodă oferă avantajul major de a elimina necesitatea terapiei imunosupresoare, deschizând noi perspective în chirurgia reconstructivă osoasă de mare complexitate.

## RECOMANDĂRI

În urma cercetării efectuate, a obiectivelor formulate, a etapelor parcurse, precum și a rezultatelor obținute analizate statistic, se pot formula următoarele recomandări pentru practica de cercetare preclinică și pentru direcțiile viitoare de studiu:

1. Selecția modelului animal. Pentru studiile preclinice *in vivo* privind reconstrucția defectelor osoase critice cu grefe osoase vascularizate, se recomandă utilizarea unor modele animale adaptate scopului cercetării, variind de la:

- rozătoare mici (șobolani) – pentru faze incipiente;
- animale medii (iepure – NZWR) – pentru testare funcțională și histologică;
- animale mari (porcine) – pentru simularea condițiilor clinice umane.

Este esențială realizarea unei analize prelabile a vascularizației osoase pentru a identifica segmentul optim destinat recoltării și reimplantării grefei.

2. Prelucrarea și conservarea grefelor compozite. Grefele compozite os+vas pot fi conservate la  $-84,5^{\circ}\text{C}$ , pe termen nedeterminat. Acestea pot fi supuse ulterior unui proces complex de decelularizare, fără separarea componentelor: osoas și vascular, păstrând astfel continuitatea pediculului vascular nutritiv. Caracteristicile vaselor musculare decelularizate prin metode combinate (chimice și enzimatic) se păstrează, inclusiv integritatea mecanică necesară pentru: suturi microchirurgicale sigure și reintegrare în circulația sistemică a gazdei (rezistență la presiunea arterială și unda de puls).

3. Optimizarea tehnicii chirurgicale. Pentru realizarea plastiei ortotopice a defectelor osoase segmentare femurale, folosind alogrefe decelularizate vascularizate, se recomandă abordul chirurgical dublu – medial, pentru expunerea completă și manipularea adecvată microchirurgicală a vaselor și cel lateral pentru structura osoasă.

4. Monitorizarea postoperatorie completă. Evaluarea integrării și toleranței grefei necesită o monitorizare sistematică, ce trebuie să includă la etapa de studiu pilot experimental chirurgical:

- parametri clinici: evoluția plăgii, inflamația locală, funcționalitatea membrului;
- parametri paraclinici: markeri inflamatori, biochimici și imagistici;
- evaluări histologice pentru validarea regenerării osoase și a vascularizației.

5. Analize histologice și imunohistochimice - introducerea metodelor de imunohistologie și imunohistochimie pentru evaluarea: reacției tisulare față de greafă, proceselor de integrare osoasă și revascularizare, eventualelor reacții de rejet imunologic.

6. Evaluarea microangiografică a grefelor- Se recomandă efectuarea de microangiografii seriate pentru evaluarea gradului de revascularizare a alogrefei decelularizate la diferite intervale postoperatorii (ex. 7, 14, 28 zile), în scopul validării funcționalității pediculului vascular reconectat.

7. Rezultatele histologice și biochimice superioare ale Lotului III, recomandă utilizarea alogrefelor osoase vascularizate decelularizate ca o alternativă viabilă la autogrefele compozit în studii preclinice pe animale mari de laborator. Această abordare permite eliminarea necesității terapiei imunosupresoare postoperatorii (obligatorie în cazul alogrefelor native din Lotul II), reducând astfel riscurile de toxicitate sistemică și complicații infecțioase pentru pacient, fără a compromite succesul osteointegrării și stabilitatea mecanică a reconstrucției

8. Extinderea validării experimentale și creșterea aplicabilității clinice, sunt necesare studii extinse pe animale mari de laborator. Realizarea unor studii *in vivo* pe animale mari de laborator (ex. porc) în loturi de 8–12 subiecți, cu selecție pe baza unui profil imunologic apropiat de HLA uman, pentru testarea grefelor compozite în condiții similare celor clinice.

9. Dezvoltarea infrastructurii preclinice. Este necesară amenajarea unei săli chirurgicale specializate pentru intervenții experimentale pe animale mari, dotată cu sisteme de anestezie veterinară avansată, tehnologie microchirurgicală, echipamente pentru monitorizare perioperatorie și terapie intensivă veterinară.

Implementarea acestor recomandări ar contribui la consolidarea cercetării în domeniul bioingineriei osoase și la apropierea de aplicabilitatea clinică a grefelor compozite vascularizate decelularizate în reconstrucția defectelor osoase critice.

## BIBLIOGRAFIE

1. Bishop AT, Pelzer M. Vascularized bone allotransplantation: current state and implications for future reconstructive surgery. *Orthop Clin North Am.* 2007;38(1):109-22.
2. Garbuz DS, Masri BA, Czitrom AA. Biology of allografting. *Orthop Clin North Am.* 1998;29(2):199-204.
3. Cannada LK. Viable bone and circulatory factors required for survival of bone grafts. *Clin Orthop North Am.* 2010;41(1):5-13.
4. Yeoh AC, Taylor BA. Osseous healing in foot and ankle surgery with autograft, allograft, and other orthobiologics. *Orthop Clin North Am.* 2017;48(3):359-69.
5. Larsen M, Friedrich PF, Bishop AT. A modified vascularized whole knee joint allotransplantation model in the rat. *Wiley Online Library.* 2010 Sep 14.
6. Menger MD, Vollmar B. Role of microcirculation in transplantation. *Microcirculation.* 2000;7(4):291-306.
7. Korompilias AV, Paschos NK, Lykissas MG, Kostas-Agnantis I, Vekris MD, Beris AE. Recent updates of surgical techniques and applications of free vascularized fibular grafts in extremity and trunk reconstruction. *Wiley Online Library.* 2011 Mar 3.
8. Randolph MA, Yaremchuk MJ, Moore JR, Robinson RA, Weiland AJ. Experimental vascularized bone allografting. *Microsurgery.* 1987;8(4):210-7. doi:10.1002/micr.1920080409.
9. Shigetomi M, Doi K, Kuwata N, Muramatsu K, Yamamoto H, Kawai S. Experimental study on vascularized bone allografts for the reconstruction of massive bone defects. *Microsurgery.* 1994;15(9):663-70. doi:10.1002/micr.1920150913.
10. Hofmann GO, Kirschner MH. Clinical experience in allogeneic vascularized bone and joint allografting. *Microsurgery.* 2000;20(8):375-83. doi:10.1002/1098-2752(2000)20:8<375::aid-micr6>3.0.co;2-0.
11. Malhotra P, Malu S, Kapur S. Immunology of transplant rejection. *MedScape.* 2015 Dec 30.
12. Amirlak B, Gorantla VS, Lehrman CR, Gonzalez NR, Campbell AC, Tobin GR, et al. Hand transplantation. *MedScape.* 2017 Jan 3.
13. Kotsougiani D, Hundepool CA, Bulstra LF, Friedrich PF, Shin AY, Bishop AT. Recipient-derived angiogenesis with short-term immunosuppression increases bone remodeling in bone vascularized composite allotransplantation: A pilot study in a swine tibial defect model. *J Orthop Res.* 2017;35(6):1242-9.
14. Mattar T, Friedrich PF, Bishop AT. Effect of rhBMP-2 and VEGF in a vascularized bone allotransplant experimental model based on surgical neoangiogenesis. *J Orthop Res.* 2013;31(4):561-6.

15. Giessler GA, Zobitz M, Friedrich PF, Bishop AT. Transplantation of a vascularized rabbit femoral diaphyseal segment: mechanical and histologic properties of a new living bone transplantation model. *J Orthop Res.* 2008;28(4):291-9.
16. Houben RH, Aleff RA, Friedrich PF, Shin AY, Wieben ED, van Wijnen AJ, Bishop AT. Neo-angiogenesis, transplant viability, and molecular analyses of vascularized bone allotransplantation surgery in a large animal model. *J Orthop Res.* 2020;38(8):1745–1754. doi:10.1002/jor.24481.
17. Hundepool CA, Nijhuis THJ, Kotsougiani D, Friedrich PF, Bishop AT, Shin AY. Optimizing decellularization techniques to create a new nerve allograft: an in vitro study using rodent nerve segments. *J Neurosurg Focus.* 2017;42(3):1-7
18. Pelzer M, Larsen M, Friedrich PF, Aleff RA, Bishop AT. Repopulation of vascularized bone allotransplants with recipient-derived cells: detection by laser capture microdissection and real-time PCR. *J Orthop Res.* 2009;27:1514-20.
19. Kremer T, Giessler GA, Friedrich PF, Willems WF, Giusti G, Bishop AT. Surgical angiogenesis with short-term immunosuppression maintains bone viability in rabbit allogenic knee joint transplantation. *Plast Reconstr Surg.* 2013 Feb;131(2):148e-157e. doi:10.1097/PRS.0b013e3182789ad4. PMID: 23358010; PMCID: PMC3927985.
20. Kotsougiani D, Hundepool CA, Willems JI, Friedrich PF, Shin AY, Bishop AT. Surgical angiogenesis in porcine tibial allotransplantation: a new large animal bone vascularized composite allotransplantation model. *J Vis Exp.* 2017 Aug 13;(125):55238. doi:10.3791/55238.
21. Goorah S, Hindocha S. Therapeutic use of vascularized bone transfer for bone reconstruction. *Asian J Biomed Pharm Sci.* 2013;3(22).
22. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence. *BMC Med.* 2012;10:81. doi:10.1186/1741-7015-10-81.
23. Garreta E, Oria R, Tarantino C, et al. Tissue engineering by decellularization and 3D bioprinting. *Mater Today.* 2017;20(4):166-78.
24. Gardin C, Ricci S, Ferroni L, et al. Decellularization and delipidation protocols of bovine bone and pericardium for bone grafting and guided bone regeneration procedures. *PLoS One.* 2015 Jul 20;10(7):e0132344. doi:10.1371/journal.pone.0132344.
25. Muramatsu K, Doi K, Akino T, Shigetomi M, Kawai S. Results of vascularized joint allograft under immunosuppression with cyclosporine. *J Microsurg.* 1993;14:527-36.
26. Mishra R, Bishop T, Valerio IL, Fisher JP, Dean D. The potential impact of bone tissue engineering in the clinic. *Regen Med.* 2016;11:571-87.

27. Mauffrey C, Barlow BT, Smith W. Management of segmental bone defects. *J Am Acad Orthop Surg.* 2015;23:143-53.
28. Roddy E, DeBaun MR, Daoud-Gray A, Yang YP, Gardner MJ. Treatment of critical-sized bone defects: clinical and tissue engineering perspectives. *Eur J Orthop Surg Traumatol.* 2018;28:351-62.
29. Vidal L, Kamplaitner C, Brennan MA, Hoornaert A, Layrolle P. Reconstruction of large skeletal defects: current clinical therapeutic strategies and future directions using 3D printing. *Front Bioeng Biotechnol.* 2020;8:61. doi:10.3389/fbioe.2020.00061.
30. Willems WF. Bone graft: revascularization strategies. Universiteit van Amsterdam. 2014.
31. Hung NN. Basic knowledge of bone grafting. In: Zorzi A, editor. Bone grafting. Croatia: InTech; 2012. p. 11-38.
32. Shin AY, Dekutoski MB. The role of vascularized bone grafts in spine surgery. *Clin Orthop North Am.* 2007;38:61-72.
33. Peric M, Dumic-Cule I, Grcevic D, et al. The rational use of animal models in the evaluation of novel bone regenerative therapies. *J Bone.* 2015;70:73-86.
34. **Nacu V. Optimizarea regenerării osoase posttraumatice dereglate [Optimization of disordered post-traumatic bone regeneration]. Chișinău: Sirius; 2010. 188 p. Romanian.**
35. Dimitriou R, Mataliotakis GI, Angoules AG, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011;9:66. doi:10.1186/1741-7015-9-66.
36. Cannada LK. Viable bone and circulatory factors required for survival of bone grafts. *Clin Orthop North Am.* 2010;41:5-13.
37. Galia CR, Porto Alegre LF. The biology of bone grafts. *Recent Adv Arthroplasty.* 2012. doi:10.5772/27381.
38. Krieg J, Hak D. Bone grafting and bone graft substitutes. *Bone Graft Function.* 2010 May. Available from: <https://ota.org/sites/files/2018-06/G12%20-%20Bone%20Grafts%20%20Subs%20JTG%20rev%2010-17-10%20%5BCompatibility%20Mode%5D.pdf>
39. Fox JA, Freedman KB, Lee SJ, Cole BJ. Fresh osteochondral allograft transplantation for articular cartilage defects. *Oper Tech Sports Med.* 2002;10(3):168-73.
40. Khan SN, Cammisa FP Jr, Sandhu HS, Diwan AD, Girardi FP, Lane JM. The biology of bone grafting. *J Am Acad Orthop Surg.* 2005;13:77-86. PMID: 15712985.
41. Pederson WC, Person DW. Long bone reconstruction with vascularized bone grafts. *Clin Orthop North Am.* 2007;38:23-35.

42. Capanna R, Campanacci DA, Belot N, et al. A new reconstructive technique for intercalary defects of long bones: the association of massive allograft with vascularized fibular autograft. Long-term results and comparison with alternatives. *Clin Orthop North Am.* 2007;38:51-60.
43. Kotsougiani D, Hundepool CA, Willems JI, Friedrich PF, Shin AY, Bishop AT. Surgical angiogenesis in porcine tibial allotransplantation: a new large animal bone vascularized composite allotransplantation model. *J Vis Exp.* 2017 Aug 13;(125):55238. doi:10.3791/55238.
44. Caldwell PE III, Shelton WR. Indications for allografts. *Orthop Clin North Am.* 2005;36:459-67.
45. Yeoh JC, Taylor BA. Osseous healing in foot and ankle surgery with autograft, allograft, and other orthobiologics. *Orthop Clin North Am.* 2017;48(3):359-69.
46. Shin AY, Dekutoski MB. The role of vascularized bone grafts in spine surgery. *Orthop Clin North Am.* 2007;38:61-72.
47. Mayo Clinic. Microvascular surgery: the evolving role of vascularized bone grafts for challenging scaphoid nonunions [Internet]. Rochester (MN): Mayo Clinic; c2025 [cited 2025 Oct 8]. Available from: <https://www.mayoclinic.org/medical-professionals/clinical-updates/orthopedic-surgery/microvascular-surgery-evolving-role-vascularized-bone-grafts-challenging-scaphoid-nonunions>
48. Wood MB. Free vascularized fibular grafting—25 years' experience: tips, techniques, and pearls. *Orthop Clin North Am.* 2007;38:1-12.
49. Menger MD, Vollmar B. Role of microcirculation in transplantation. *Microcirculation.* 2000;7:291-306.
50. Muramatsu K, Doi K, et al. Results of vascularized joint allograft under immunosuppression with cyclosporine. *J Microsurg.* 1993;14:527-36.
51. Goetz A, Giessler M, Zobitz M, Friedrich PF, Bishop AT. Transplantation of a vascularized rabbit femoral diaphyseal segment: mechanical and histologic properties of a new living bone transplantation model. *J Orthop Res.* 2008 Mar 27. Available from: [www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)
52. Goetz A, Giessler M, Zobitz M, Friedrich PF, Bishop AT. Host-derived neoangiogenesis with short-term immunosuppression allows incorporation and remodeling of vascularized diaphyseal allogeneic rabbit femur transplants. *J Orthop Res.* 2009 Jun;27(6):763-70.
53. Kotsougiani D, Willems JI, Shin AY, Friedrich PF, Hundepool CA, Bishop AT. A new porcine vascularized tibial bone allotransplantation model: anatomy and surgical technique. *Microsurgery.* 2018;38(5):539–546. doi:10.1002/micr.30299.

54. Leonard DA, et al. Vascularized composite allograft tolerance across MHC barriers in a large animal model. *Am J Transplant*. 2014;14(2):343-55.
55. Smith CA, Board TN, Rooney P, Eagle MJ, Richardson SM, Hoyland JA. Human decellularized bone scaffolds from aged donors show improved osteoinductive capacity compared to young donor bone. *PLoS One*. 2017 Nov 2;12(11):e0187969.
56. Garreta E, Oria R, Tarantina C, Pla-Roca M, Prado P, Fernández-Avilés F, Campistol JM, Samitier J, Montserrat N. Tissue engineering by decellularization and 3D bioprinting. *Res*. 2017 May;20(4):587-96.
57. Chandra P, Atala A. Engineering blood vessels and vascularized tissues: Technology trends and potential clinical applications. *Clin Sci*. 2019;133(9):1115–35.
58. Vorotnikova E, McIntosh D, Dewilde A, Zhang J, Reing JE, Zhang L, et al. Extracellular matrix-derived products modulate endothelial and progenitor cell migration and proliferation in vitro and stimulate regenerative healing in vivo. *Matrix Biol*. 2010;29(7):690–700.
59. Badylak SF, Freytes DO, Gilbert TW. Extracellular matrix as a biological scaffold material: structure and function. *Acta Biomater*. 2009;5(1):1-13.
60. Houben RH, Thaler R, Kotsougiani D, Friedrich PF, Shin AY, Wijnen AJ, et al. Neo-angiogenesis, transplant viability, and molecular analyses of vascularized bone allotransplantation surgery in a large animal model. *J Orthop Res*. 2020;38(2):288–96.
61. De Pace R, Molinari S, Mazzoni E, Perale G. Bone regeneration: a review of current treatment strategies. *J Clin Med*. 2025;14(6):1838. doi:10.3390/jcm14061838
62. Korompilias AV, Soucacos PN. Vascularized bone grafts in trauma and reconstructive microsurgery, part 2. *Microsurgery*. 2011;31(3):169–70.
63. University of Michigan. Guidelines on Anesthesia and Analgesia in Rabbits. Unit for Laboratory Animal Medicine. “Approval date: April 18, 2025” [Internet]. Available from: <https://az.research.umich.edu/animalcare/guidelines/guidelines-anesthesia-and-analgesia-rabbits>.
64. University of Texas. Rabbit-Specific Anesthesia. Available from: [https://research.utexas.edu/wp-content/uploads/sites/7/2020/02/Rabbit\\_Anesthesia\\_guidance\\_ARC.pdf](https://research.utexas.edu/wp-content/uploads/sites/7/2020/02/Rabbit_Anesthesia_guidance_ARC.pdf).
65. Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 2. *Laboratory Animals*. 1997;31(1):1-32.
66. Page MJ, McKenzie JE, Bossuyt PM, Boutron I, Hoffmann TC, Mulrow CD, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *BMJ*. 2021;372:n71. doi:10.1136/bmj.n71.

67.Gage J, Liporace A, Egol A, McLaurin M. Management of bone defects in orthopedic trauma. *Bull Hosp Jt Dis.* 2018 Mar;76(1):4-8. PMID: 29537950.

68.Dallari D, Fini M, Stagni C, Torricelli P, Nicoli Aldini N, Giavaresi G, et al. In vivo study on the healing of bone defects treated with bone marrow stromal cells, platelet-rich plasma, and freeze-dried bone allografts, alone and in combination. *J Orthop Res.* 2006 May;24(5):877-88. doi: 10.1002/jor.20112. PMID: 16609976.

69.Lasanianos NG, Kanakaris NK, Giannoudis PV. Current management of long bone large segmental defects. *Trauma.* 2010 Apr;24(2):149-63. doi: 10.1016/j.mporth.2009.10.003.

70.Siemionow M. Vascularized composite allotransplantation: a new concept in musculoskeletal regeneration. *J Mater Sci Mater Med.* 2015 Dec;26(12):266. doi: 10.1007/s10856-015-5601-5. Epub 2015 Oct 27. PMID: 26507199.

71.Hoffman MD, Xie C, Zhang X, Benoit DS. The effect of mesenchymal stem cells delivered via hydrogel-based tissue-engineered periosteum on bone allograft healing. *Biomaterials.* 2013 Nov;34(35):8887-98. doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.08.005. Epub 2013 Aug 16. PMID: 23958029.

72.Horner EA, Kirkham J, Wood D, Curran S, Smith M, Thomson B, et al. Long bone defect models for tissue engineering applications: criteria for choice. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010 Apr;16(2):263-71. doi: 10.1089/ten.TEB.2009.0224. PMID: 19925211.

73.Giessler GA, Friedrich PF, Shin RH, Bishop AT. Einheilung vaskularisierter Knochenallografte: Optimierung durch Kurzzeit-Immunsuppression und der empfangerbasierten Neovaskularisation. *Unfallchirurg.* 2009 May;112(5):479-86. German. doi: 10.1007/s00113-008-1525-6. PMID: 19280168.

74.Muramatsu K, Bishop AT. Cell repopulation in vascularized bone grafts. *J Orthop Res.* 2002 Jul;20(4):772-8. doi: 10.1016/S0736-0266(01)00173-5. PMID: 12168666.

75.García JR, Clark AY, García AJ. Integrin-specific hydrogels functionalized with VEGF for vascularization and bone regeneration of critical-size bone defects. *J Biomed Mater Res A.* 2016 Apr;104(4):889-900. doi: 10.1002/jbm.a.35626. Epub 2016 Jan 4. Erratum in: *J Biomed Mater Res A.* 2016 Jul;104(7):1845. PMID: 26662727; PMCID: PMC5106804.

76.Ring A, Tilkorn DJ, Goertz O, Langer S, Schaffran A, Awakowicz P, Hauser J. Surface modification by glow discharge gas plasma treatment improves vascularization of allogenic bone implants. *J Orthop Res.* 2011 Aug;29(8):1237-44. doi: 10.1002/jor.21358. Epub 2011 Mar 4. PMID: 21381095.

77.Țîmbalari T, Lozan O, Nacu V. **Istoricul dezvoltării transplantului de țesuturi și celule = History of tissue and cell transplantation's development.** *Mold J Health Sci.*

2017;14:108-122. Romanian, English. [cited 2020 Aug 9]. Available from: [https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare\\_articol/59538](https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/59538)

78. Moore JR, Phillips TW, Weiland AJ, Randolph MA. Allogenic transplants of bone revascularized by microvascular anastomoses: A preliminary study. *J Orthopaedic Res.* 1982;1(4):352-360. <https://doi.org/10.1002/jor.1100010403>

79. Jian M, Cobzac V, Moghildea I, Popescu V, Nacu V. **Techniques of liver decellularization.** *Mold Med J.* 2018;61(4):21-24. doi: 10.5281/zenodo.2222303.

80. Pelzer M, Larsen M, Chung Y, Ohno T, Friedrich P, Bishop A. Long-Term Survival of Living Bone Allografts without Immunosuppression or Tolerance Induction Using Host-Derived Neoangiogenesis. *J Reconstr Microsurg.* 2006;22: A007. DOI: 10.1055/s-2006-955127

81. Pavlovschi E, Stoian A, Veregea G, Nacu V. **In vivo experimental study of the arterial supply of the rabbit posterior limb.** *Moldovan Med J.* 2021;64(6):26-32. ISSN 2537-6373. DOI: 10.52418/moldovan-med-j.64-6.21.05

82. Stoian A, Pavlovschi E, Caproş N, Veregea G, Nacu V. **Effectiveness of Tissue Engineering in Obtaining the Extracellular Composite Vascularized Bone Matrix.** In: Sontea V, Tiginyanu I, Railean S, eds. *6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2023. IFMBE Proceedings, vol 91.* Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-42775-6\\_39](https://doi.org/10.1007/978-3-031-42775-6_39)

83. Innis PC, Randolph MA, Paskert JP, et al. Vascularized bone allografts: in vitro assessment of cell-mediated and humoral responses. *Plast Reconstr Surg.* 1991 Feb;87(2):315-325. PMID: 1989024.

84. Pavlovschi E, Stoian A, Veregea G, Nacu V. **The Critical Size Bone Defects - In-Vivo Experimental Method of the Treatment with the Decellularized Vascularized Bone Allografts.** In: Sontea V, Tiginyanu I, Railean S, eds. *6th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2023. IFMBE Proceedings, vol 91.* Springer, Cham. [https://doi.org/10.1007/978-3-031-42775-6\\_37](https://doi.org/10.1007/978-3-031-42775-6_37)

85. Bray PW, Neligan PC, Bowen CV, Boyer MI. Survival of microvascular physal allograft transplants following withdrawal of short-term postoperative immunosuppression. *J Bone Joint Surg Am.* 2004 Feb;86(2):281-9. doi: 10.2106/00004623-200402000-00010. PMID: 14960672.

86. Xie C, Reynolds D, Awad H, Rubery PT, Pelled G, Gazit D, Guldberg RE, Schwarz EM, O'Keefe RJ, Zhang X. Structural bone allograft combined with genetically engineered mesenchymal stem cells as a novel platform for bone tissue engineering. *Tissue Eng.* 2007 Mar;13(3):435-45. doi: 10.1089/ten.2006.0182. PMID: 17518596.

87. Ohno T, Pelzer M, Larsen M, Friedrich PF, Bishop AT. Host-derived angiogenesis maintains bone blood flow after withdrawal of immunosuppression. *Microsurgery*. 2006;27(8):657-663. <https://doi.org/10.1002/micr.20427>

88. Pelzer M, Larsen M, Chung G, Ohno T, Platt JL, Friedrich PF, Bishop AT. Short-term immunosuppression and surgical neoangiogenesis with host vessels maintains long-term viability of vascularized bone allografts. *J Orthop Res*. 2007;25(3):370-377. <https://doi.org/10.1002/jor.20313>

89. Kotsougiani D, Hundepool CA, Bulstra LF, Friedrich PF, Shin AY, Bishop AT. Bone vascularized composite allotransplantation model in swine tibial defect: Evaluation of surgical angiogenesis and transplant viability. *Microsurgery*. 2019 Feb;39(2):160-166. doi: 10.1002/micr.30310. Epub 2018 Mar 5. PMID: 29504151.

90. **Jian M, Cobzac V, Mostovei A, Nacu V. The procedure of bone cells obtaining, culture and identification. In: Tiginyanu I, Sontea V, Railean S, eds. ICNBME 2019: 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, Proceedings of ICNBME-2019, 18-21 Sept 2019, Chisinau, Moldova. IFMBE Proceedings 77; 2020. p. 595–599. doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-31866-6\\_106](https://doi.org/10.1007/978-3-030-31866-6_106)**

91. Struckmann V, Schmidmaier G, Ferbert T, Kneser U, Kremer T. Reconstruction of extended bone defects using massive allografts combined with surgical angiogenesis: A case report. *JBJS Case Connect*. 2017 Jan-Mar;7(1):e10. doi: 10.2106/JBJS.CC.16.00098. PMID: 29244692.

92. Diefenbeck M, Nerlich A, Schneeberger S, Wagner F, Hofmann GO. Allograft vasculopathy after allogeneic vascularized knee transplantation. *Transpl Int*. 2011 Jan;24(1):e1-5. doi: 10.1111/j.1432-2277.2010.01178.x. Epub 2010 Oct 20. PMID: 20958796.

93. **Malcova T, et al. Mechanical and morphological characterization of decellularized umbilical vessels as tissue engineering scaffolds. In: Tiginyanu I, Sontea V, Railean S, eds. ICNBME 2019: 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, Proceedings of ICNBME-2019, 18-21 Sept 2019, Chisinau, Moldova. IFMBE Proceedings 77; 2020. p. 589–593. doi: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-31866-6\\_105](https://doi.org/10.1007/978-3-030-31866-6_105)**

94. Li J, Wang Z, Pei GX, Guo Z. Biological reconstruction using massive bone allograft with intramedullary vascularized fibular flap after intercalary resection of humeral malignancy. *J Surg Oncol*. 2011 Sep 1;104(3):244-9. doi: 10.1002/jso.21922. Epub 2011 Apr 1. PMID: 21462190.

95. Schuind, F. Transplantation de main et allotransplantations vascularisées composites en Orthopédie-Traumatologie. *Rev Chir Orthop Traumatol*. 2010;96(3):331-338. doi: 10.1016/j.rcot.2009.02.008.

- 96.Mankin HJ, Gebhardt MC, Jennings LC, Springfield DS, Tomford WW. Long-term results of allograft replacement in the management of bone tumors. *Clin Orthop Relat Res.* 1996 Mar;(324):86-97. doi: 10.1097/00003086-199603000-00011. PMID: 8595781.
- 97.Iske J, Nian Y, Maenosono R, Maurer M, Sauer IM, Tullius SG. Composite tissue allotransplantation: opportunities and challenges. *Cell Mol Immunol.* 2019 Apr;16(4):343-349. doi: 10.1038/s41423-019-0215-3. Epub 2019 Mar 6. PMID: 30842628; PMCID: PMC6462029.
- 98.Delloye C, de Nayer P, Allington N, Munting E, Coutelier L, Vincent A. Massive bone allografts in large skeletal defects after tumor surgery: a clinical and microradiographic evaluation. *Arch Orthop Trauma Surg.* 1988;107(1):31-41. doi: 10.1007/BF00463522. PMID: 3278701.
- 99.Yu L, Wei Q, Li J, Wang H, Meng Q, Xie E, Li Z, Li K, Shu WW, Wu J, Yang L, Cai Y, Han F, Li B. Engineered periosteum-diaphysis substitutes with biomimetic structure and composition promote the repair of large segmental bone defects. *Compos Part B Eng.* 2023;252:10505. doi: 10.1016/j.compositesb.2023.110505.
- 100.Han J, Wu J, Xiang X, Xie L, Chen R, Li L, Ma K, Sun Q, Yang R, Huang T, Tong L, Zhu L, Wang H, Wen C, Zhao Y, Wang J. Biodegradable BBG/PCL composite scaffolds fabricated by selective laser sintering for directed regeneration of critical-sized bone defects. *Mater Des.* 2022;225:111543. doi: 10.1016/j.matdes.2022.111543.
- 101.Wang X, Ma Y, Chen J, Liu Y, Liu G, Wang P, Wang B, Taketo MM, Bellido T, Tu X. A novel decellularized matrix of Wnt signaling-activated osteocytes accelerates the repair of critical-sized parietal bone defects with osteoclastogenesis, angiogenesis, and neurogenesis. *Bioact Mater.* 2023;21:110-128. doi: 10.1016/j.bioactmat.2022.07.017.
- 102.Fekrazad S, Sohrabi M, Fekrazad R. Angiogenetic and anti-inflammatory effects of photobiomodulation on bone regeneration in rat: A histopathological, immunohistochemical, and molecular analysis. *J Photochem Photobiol B.* 2022;238:112599. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2022.112599.
- 103.Samson S, Nacu V. **Techniques of Dental Pulp Decellularization.** In: **Tiginyanu I, Sontea V, Railean S, editors. 5th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2021. IFMBE Proceedings, vol 87. Springer, Cham; 2022. p. 350–357. doi: 10.1007/978-3-030-92328-0\_53.**
- 104.Malcova T, Globa L, Vascan A, Țugui E, Stoian A, Nacu V. **Mechanical and Morphological Characterization of Decellularized Umbilical Vessels as Tissue Engineering Scaffolds.** In: **Tiginyanu I, Sontea V, Railean S, editors. 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2019. IFMBE Proceedings, vol 77. Springer, Cham; 2020. p. 589–593. doi: 10.1007/978-3-030-31866-6\_105.**

105. Grosso A, Burger MG, Lunger A, Schaefer DJ, Banfi A, Di Maggio N. It Takes Two to Tango: Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis for Bone Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol.* 2017;5:68. doi: 10.3389/fbioe.2017.00068.
106. Shin AY, Dekutoski MB. The role of vascularized bone grafts in spine surgery. *Orthop Clin North Am.* 2007;38:61–72, vi. doi: 10.1016/j.ocl.2006.10.011.
107. Schindeler A, McDonald MM, Bokko P, Little DG. Bone remodeling during fracture repair: The cellular picture. *Semin Cell Dev Biol.* 2008;19:459–466.
108. Pan Z, Jiang P, Xue S, Wang T, Li H, Wang J. Repair of a critical-size segmental rabbit femur defect using bioglass- $\beta$ -TCP monoblock, a vascularized periosteal flap and BMP-2. *J Biomed Mater Res.* 2018;106:2148–2156. doi: 10.1002/jbm.b.34018.
109. Andrzejowski P, Giannoudis PV. The “diamond concept” for long bone non-union management. *J Orthop Traumatol.* 2019;20:21. doi: 10.1186/s10195-019-0528-0.
110. Goorah S. Therapeutic use of vascularized bone transfer for bone reconstruction. *Asian J Biomed Pharm Sci.* 2013;3:39–44.
111. Menger MD, Vollmar B. Role of microcirculation in transplantation. *Microcirculation.* 2000;7:291–306. Available: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11079248>.
112. Korompilias AV, Paschos NK, Lykissas MG, Kostas-Agnantis I, Vekris MD, Beris AE. Recent updates of surgical techniques and applications of free vascularized fibular graft in extremity and trunk reconstruction. *Microsurgery.* 2011;31:171–175. doi: 10.1002/micr.20848.
113. Malcova T, Nacu V, Rojnoveanu Gh, et al. **Evaluation of Ultrasound Application for the Decellularization of Small Caliber Vessels. In: Tiginyanu I, Sontea V, Railean S, editors. 5th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering. ICNBME 2021. IFMBE Proceedings, vol 87. Springer, Cham; 2022. p. 350–357. doi: 10.1007/978-3-030-92328-0\_49.**
114. Cobzac V, et al. **Assessment of ionic and anionic surfactants effect on demineralized osteochondral tissue. 5th International Conference on Innovative Research (ICIR 2019), Iasi, Romania; 2019. p. 122. ISSN 2601-4580.**
115. Jian M, et al. **Obtaining a suitable osteochondral graft for articular cartilage engineering. 7th International Medical Congress for Students and Young Doctors, MedEspera 2018. Chişinău, 2018, p. 202. ISBN 978-9975-47-174-9.**
116. Mapara M., Thomas B.S., Bhat K.M., Rabbit as an animal model for experimental research. *Dental Research Journal*, Jan 2012, Vol 9, Issue 1.
117. Hai Gua, Chuab A., et al. Nonlinear finite element simulation to elucidate the efficacy of slit arteriotomy for end-to-side arterial anastomosis in microsurgery. *Journal of Biomechanics*, 39 (2006): 435–443.

118. Balduino F., Fausto V., et al. Submerged vascular anastomosis: A technique for vascular suturing in experimental microsurgery. *Acta Cir Bras.* 2021;36(8):e360807, <https://doi.org/10.1590/ACB360807>.

119. Yuan Y., Ye Jin J., et al. Rabbit Surgery Protocol for End-to-End and End-to-Side Vascular Graft Anastomosis. *Methods Mol Biol*, 2022;2375:177-189. doi: 10.1007/978-1-0716-1708-3\_15.

120. Ghali MGZ. Microsurgical technique for femoral vascular access in the rat. *MethodsX*, Vol. 4, 2017, 498-507, <https://doi.org/10.1016/j.mex.2017.11.005>.

121. Aithal HP, Pal A, Kinjavdekar P, Pawde AM. *Textbook of Veterinary Orthopaedic Surgery*. Singapore: Springer; 2023.

122. **Gh. Croitor, A. Bețisor. "GHDUL PACIENTULUI CU ENDOPROTEZĂ TOTALĂ DE ȘOLD", MINISTERUL SĂNĂTĂȚII REPUBLICII MOLDOVA, UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „N. TESTEMIȚANU” Catedra ortopedie-traumatologie a facultății de rezidențiat și secundariat clinic, Serviciul ortopedie al Spitalului Clinic Municipal de Urgență, Chișinău 2004.**

123. FEGHIU, Leonid. Lambourile perforante: aspecte de clasificare și nomenclatură. **Discuții și controverse. In: Curierul Medical, 2011, nr. 1(319), pp. 56-63. ISSN 1875-0666.**

124. FEGHIU, Leonid. **Reconstrucția defectelor regiunii distale a membrului inferior cu lambouri perforante peroneale propeller. In: Sănătate Publică, Economie și Management în Medicină, 2012, nr. 3(42), pp. 142-146. ISSN 1729-8687.**

125. Chen L, Deng H, Cui H, Fang J, Zuo Z, Deng J, Li Y, Wang X, Zhao L. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*. 2017 Dec 14;9(6):7204-7218. doi: 10.18632/oncotarget.23208. PMID: 29467962; PMCID: PMC5805548.

126. Kayem G., Batteux F., *Immunologie de la grossesse*, La Presse Médicale, Volume 37, Issue 11, 2008, Pages 1612-1619, ISSN 0755-4982, <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2008.07.006>.

127. Moraschini V, de Almeida DCF, Calasans-Maia MD, Kischinhevsky ICC, Louro RS, Granjeiro JM. Immunological response of allogeneic bone grafting: A systematic review of prospective studies. *J Oral Pathol Med*. 2020 May;49(5):395-403. doi: 10.1111/jop.12998. Epub 2020 Feb 7. PMID: 31985847.

128. Ahmed A. An overview of inflammation: Mechanism and consequences. *Frontiers in Biology*, Aug. 2011, DOI:10.1007/s11515-011-1123-9.

129. Medzhitov R (2010). Inflammation 2010: new adventures of an old flame. *Cell*, 140(6): 771–776.

130. Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm). Transplantation d'organes / Greffe [Internet]. Paris: Inserm; c2025 [cited 2025 Oct 8]. Available from: <https://www.inserm.fr/dossier/transplantation-organes-greffe>

131. Wang W., Yeung K.W.K., Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review, *Bioactive Materials*, Vol.2, Issue 4, 2017, Pg. 224-247, ISSN 2452-199X, <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.05.007>.

132. Spicer, P., Kretlow, J., Young, S. et al. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc* 7, 1918–1929 (2012). <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.113>.

133. Albrektsson, T., Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J* 10 (Suppl 2), S96–S101 (2001). <https://doi.org/10.1007/s005860100282>.

134. Favier, A.-L.; Nikovics, K. Molecular and Cellular Mechanisms of Inflammation and Tissue Regeneration. *Biomedicines* 2023, 11, 1416. <https://doi.org/10.3390/biomedicines11051416>.

135. Ingulli E. Mechanism of cellular rejection in transplantation. *Pediatr Nephrol.* 2010 Jan;25(1):61-74. doi: 10.1007/s00467-008-1020-x. PMID: 21476231.

136. Rolvien T, Barbeck M, Wensch S, Amling M, Krause M. Cellular Mechanisms Responsible for Success and Failure of Bone Substitute Materials. *Int J Mol Sci.* 2018 Sep 23;19(10):2893. doi: 10.3390/ijms19102893. PMID: 30249051.

137. Richard A. McPetersen, Matthew R. Pincus. Biochemical Markers of Bone Metabolism. *Clinical Enzymology*. In *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods – Saunders Elsevier* 21-Ed 2007, 181, 255-257.

138. Khalid Mahmood, Muhammad Ubaid, Syeda Taliya Rizvi, "Multiple Osteolytic Lesions Causing Hypercalcemia: A Rare Presentation of Acute Lymphoblastic Leukemia", *Case Reports in Medicine*, vol. 2017, Article ID 2347810, 3 pages, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/2347810>.

139. Yamada M, Kojima N, Att W, et al. Improvement in the osteoblastic cellular response to a commercial collagen membrane and demineralized freeze-dried bone by an amino acid derivative: an in vitro study. *Clinical Oral Implants Research.* 2011;22(2):165-172.

140. Justin Ocksrider, Allison L. Boden, Dylan N. Greif, Roberto Hernández, Jean Jose, Juan Pretell-Mazzini, Ty Subhawong, Gregory B. Foremny, Adam Singer, Stephen M. Quinnan, Radiographic evaluation of reconstructive surgery for segmental bone defects: What the radiologist should know about distraction osteogenesis and bone grafting, *Clinical Imaging*, Volume 67, 2020, Pages 15-29, ISSN 0899-7071, <https://doi.org/10.1016/j.clinimag.2020.05.018>.

141. Whitehead, A. L., et al. (2016). "Estimating the sample size for a pilot randomised trial to minimise the overall trial sample size." *Statistical Methods in Medical Research*, 25(3), 1057-1073.

142. **Marin I. Aspecte de regenerare, consolidare și restructurare a alogrefoanelor osoase, implantate în defecte restante posttumorale ale aparatului locomotor. În: *Arta Medica*, 2009; 4 (37), 3-6.**

## ANEXA 1.

Analiza datelor literaturii de specialitate efectuată prin intermediul bazelor de date medicale Google Scholar, PubMed (Medline), Hinari cu stocarea lor - 653 de articole și rezumate în Paperpile-soft.

The screenshot displays the Paperpile web application interface. The browser address bar shows 'paperpile.com/app'. The main content area lists several research papers:

- Mechanical and Morphological Characterization of Decellularized Umbilical Vessels as Tissue Engineering Scaffolds** by Malcova T, Globa L, Vascan A, Tugui E, Stoian A, Nacu V. 4th International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, 2020 - Conference Paper. PDF not found.
- Techniques of Dental Pulp Decellularization** by Samson S, Nacu V. 2022 - Journal Article. PDF not found.
- Spontaneous immunomodulation and regulation of angiogenesis and osteogenesis by Sr/Cu-borosilicate glass (BSG) bone cement to repair critical bone defects** by Li S, Zhang L, Liu C, Kim J, Su K, Chen T, Zhao L, Lu X, Zhang H, Cui Y, Cui X, Yuan F, Pan H. *Bioact Mater*, 2023 - Journal Article. View PDF.
- Biomaterialized dipeptide self-assembled hydrogel with ultrahigh mechanical strength and osteoinductivity for bone regeneration** by Hao L, Wang A, Fu J, Liang S, Han Q, Jing Y, Li J, Li Q, Bai S, Seeburger PH, Yin J. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp*, 2023 - Journal Article. PDF restricted.
- A novel decellularized matrix of Wnt signaling-activated osteocytes accelerates the repair of critical-sized parietal bone defects with osteoclastogenesis, angiogenesis, and neurogenesis** by Wang X, Ma Y, Chen J, Liu Y, Liu G, Wang P, Wang B, Taketo MM, Bellido T, Tu X. *Bioact Mater*, 2023 - Journal Article. View PDF.
- Biodegradable BBG/PCL composite scaffolds fabricated by selective laser sintering for directed regeneration of critical-sized bone**

The right sidebar shows a summary of 653 papers found, with 20 shown and 0 selected. It includes sorting options (Date Added, Publication Date, Title, Journal, Author) and filter statistics: Has no PDF (358), Has PDF (294), PDF Restricted (235), Unsorted (30), Incomplete (21), Has Attachment (15), Duplicates (10), Notes (8). The 'Type' section lists: Journal Article (800), Review (165), Book Chapter (15), Website (14), Conference Paper (11), and More...

The left sidebar shows folder organization under 'ALL PAPERS (653)':

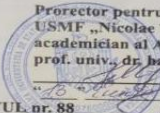
- STARRED (25)
- FOLDERS
  - <1990 (43)
  - 1990-1999 (98)
  - 2000-2009 (185)
  - 2010-2023 (270)
  - anestesia (4)
  - anatomie membru post NZWR (45)
    - alogrefaj vascul (81)
      - alogrefe osoase vascularizate prelinic (25)
    - chirurgie + micro (8)
    - experiment in vitro (15)
    - experiment in vivo (111)
      - alogrefa nevascul (36)
    - autogrefaj (16)
      - cazuri clinice (142)
    - metode de stimulare a osteogenezei (210)
    - os plati/scurte/articol/membru (27)
    - prisma+DECELUL (12)
    - teorie (5)
  - LABELS
    - revascularizare grefa (25)
    - imunosupresie (87)
    - fiziologia os (37)
    - info importanta (32)
    - neovascularizare (20)
    - demineralizare grefa (8)
  - SHARED FOLDERS
  - TRASH (0)

The bottom of the image shows the Windows taskbar with the search bar, system tray, and date/time (07:26, 06/12/2023).



### ANEXA 3.

### Acte de implementare a rezultatelor obținute.

INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA Institutul Național de Cercetare în Medicină și Sănătate		1/1
<b>APROB</b> Prorector pentru activitate de cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” din RM academician al ASM, prof. univ., dr. hab. șt. med.  Stanislav GROPPA 2023		
<b>ACTUL nr. 88</b> <b>DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI</b> (în procesul științifico-practic)		
<p>1. Denumirea ofertei pentru implementare: „METODĂ DE DECELULARIZARE PENTRU GREFELE OSOASE COMPOZITE VASCULARIZATE”</p> <p>2. <b>Autori:</b> STOIAN Alina, asist. univ., cercet. șt. stag., doctorandă, PAVLOVSCHI Elena, cercet. stag., doctorandă, VEREGA Grigore, dr. hab. șt. med., prof. univ., NACU Viorel, dr. hab. șt. med. prof. univ.</p> <p>3. Numărul inovației: Nr. 6058 din 24 mai 2023.</p> <p>2. <b>Unde și când a fost implementată:</b> rezultatele studiului experimental inițiat, stau la baza al studiu experimental <i>in vivo</i>. Astfel, preconizăm elaborarea indicațiilor metodice în tratamentul defectelor osoase largi, în cadrul USMF „Nicolae Testemițanu”, laboratorul de Inginerie Tisulară Culturii Celulare, Banca de țesuturi și celule umane cu aplicabilitate clinică ulterioară în cadrul clinicii de Chirurgie plastică reconstructivă și microchirurgia locomotorului, catedra Ortopedie traumatologie. Rezultatele obținute (protocolul de decelularizare a grefelor osoase compozite vascularizate) au fost prezentate în cadrul manifestărilor științifice naționale și internaționale perioada anilor 2019-2023. Rezultatele inovației au fost implementate și în cadrul proiectului de cercetare „Nanoarhitecturi în bază de GaN și matrici tridimensionale din materiale biologice pentru aplicații în microfluidică și inginerie tisulară” - 20.80009.5007.20 oferit de Agenția Națională de Cercetare Dezvoltare a Guvernului Republica Moldova.</p> <p>3. <b>Rezultatele:</b> Scopul de bază a ingineriei tisulare din ultimii ani este obținerea unui alotransplante vascularizat ce ar permite lipsa utilizării terapiei imunosupresoare. Elementul de bază al protocolului, fiind, că metoda propusă este utilizată pentru decelularizarea grefelor osoase țesutului osos de dimensiuni mici, astfel, cu ajutorul acestui protocol putem decelulariza grefelor osoase meta diafizare (os cortical + os spongios) compozite (os + periost) vascularizate (cu păstrarea pediculului vascular), favorizând obținerea unei matrici extracelulare osoase pe pediculul vascular. Rezultatul studiului dat, reprezintă un pas important în elaborarea noilor protocoale chirurgicale de tratament al pacienților cu defecte osoase masive de diferită genă la nivelul aparatului locomotor.</p> <p><i>Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.</i></p> <p>Șef departament, Departamentul Cercetare, dr. hab. șt. med., conf. univ.  Elena RAEVSCHI Director Clinica de Chirurgie plastică reconstructivă și Microchirurgie a aparatului locomotor, prof. univ., dr. hab. șt. med.  Grigore VEREGA</p>		

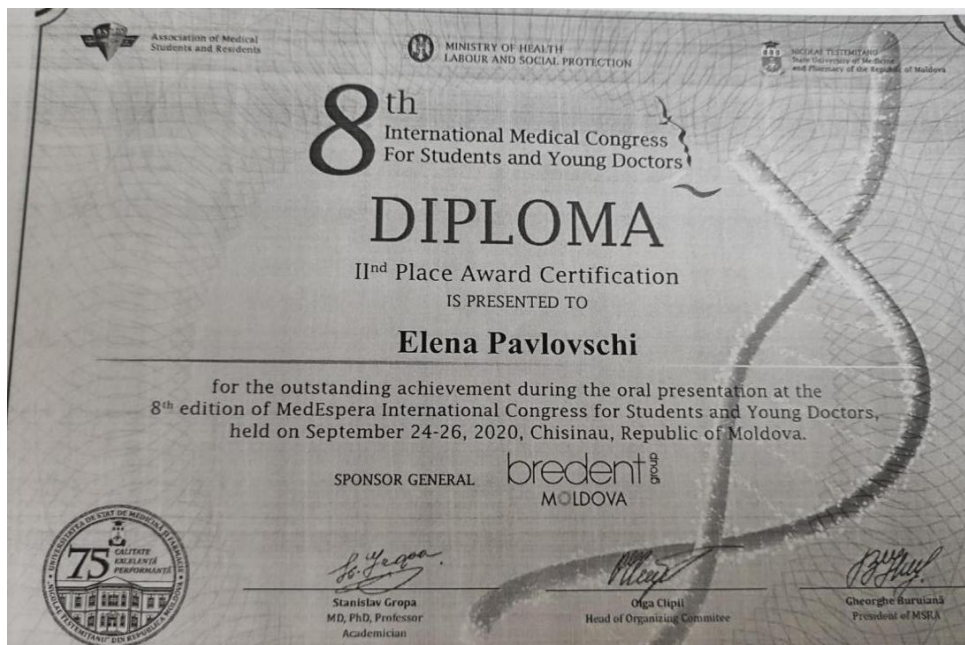
INSTITUȚIA PUBLICĂ UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA Institutul Național de Cercetare în Medicină și Sănătate		Pag. 1 / 1
<b>APROB</b> Prorector pentru activitate de cercetare, USMF „Nicolae Testemițanu” din RM academician al ASM, prof. univ., dr. hab. șt. med.  Stanislav GROPPA 2023		
<b>ACTUL nr. 82</b> <b>DE IMPLEMENTARE A INOVAȚIEI</b> (în procesul științifico-practic)		
<p>1. Denumirea ofertei pentru implementare: ALOGREFE OSOASE VASCULARIZATE CA METODĂ DE TRATAMENT A DEFECTELOR OSOASE CRITICE</p> <p>2. <b>Autori:</b> PAVLOVSCHI Elena, cercet. șt. stag., doctorandă, STOIAN Alina, cercet. șt. stag., doctorandă, NACU Viorel, dr. hab. șt. med., prof. univ., VEREGA Grigore, dr. hab. șt. med., prof. univ.</p> <p>3. Numărul inovației: Nr. 6052 din 16 mai 2023.</p> <p>4. <b>Unde și când a fost implementată:</b> Impactul practic al prezentului studiu constă în implementarea la etapa preclinică a unei noi tehnici de tratament al defectelor osoase vaste în cadrul Laboratorului de Inginerie Tisulară și Culturii Celulare, catedra Ortopedie și traumatologie al Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău, Republica Moldova. Rezultatele obținute (protocolul de prelevare, conservare și plastie osoasă ortotopică prin includere în circuitul sângvin gazdă al alogrefei osoase vascularizate decelularizate) au fost prezentate în cadrul ședințelor Laboratorului de Inginerie Tisulară și Culturii Celulare, catedrei Ortopedie și traumatologie perioada 2020-2023. Rezultatele inovației au fost implementate și în cadrul proiectului de cercetare „Nanoarhitecturi în bază de GaN și matrici tridimensionale din materiale biologice pentru aplicații în microfluidică și inginerie tisulară” - 20.80009.5007.20 oferit de Agenția Națională de Cercetare Dezvoltare a Guvernului Republica Moldova.</p> <p>5. <b>Eficacitatea implementării:</b> Protocolare a metodei experimentale de tratament, în faza preclinică, a plastiei defectelor osoase vaste prin implementarea unei tehnici noi de utilizare a alogrefelor osoase vascularizate decelularizate. Această inovație rezumă o serie de abordări unice ale managementului experimental al Defectelor Osoase Vaste. Astfel se va forma posibilitatea de a propune spre examinare metoda de tratament experimental descris în testele clinice pentru plastia defectelor osoase vaste la pacienți.</p> <p>6. <b>Rezultatele propunerii:</b> Utilizarea transplantului osos a fost un pas de succes în tratamentul unui număr mare de boli ale sistemului osteoarticular. Transplantul osos este o procedură chirurgicală care înlocuiește osul lipsă sau bolnav și devine al doilea cel mai transplantat țesut, după transfuzia de sânge. Modalitățile contemporane ale ingineriei tisulare permit obținerea unei matrici extracelulare ale țesutului osos fără impact imunogen. Rezultatul inovației constă în a descrie pas cu pas protocolul operator <i>in-vivo</i> al plastiei defectelor osoase vaste cu alogrefă osoasă vascularizată decelularizată.</p> <p><i>Prezenta inovație este implementată conform descrierii în cerere.</i></p> <p>Șef departament, Departamentul Cercetare, dr. hab. șt. med., conf. univ.  Elena RAEVSCHI Director Clinica de chirurgie plastică, reconstructivă și microchirurgie a aparatului locomotor, prof. univ., dr. hab. șt. med.  Grigore VEREGA</p>		

**ANEXA 4 .**  
**Certificate de inovație**



## ANEXA 5.

### Diplome și distincții



## LISTA PUBLICAȚIILOR LA TEMA TEZEI.

de doctor în științe medicale „**Plastia defectelor osase tubulare prin alogrefaj inclus în circuitul vascular adoptiv**”, studiu experimental, specialitatea 321.18 Ortopedie și traumatologie.

### I. Articole în reviste științifice:

· Articole în lucrările conferințelor științifice internaționale desfășurate în Republica Moldova:

**1. 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).

**2. 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).

**3. 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). (IF: 0.38)

### Articole în reviste științifice naționale acreditate:

- articole în reviste de categoria B+

**4. 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.

Autor:

Secretar științific al Senatului,  
dr. filoz. Didina Nistreanu



*Pavlovschi Elena*  
*Apus*

**- articole în reviste de categoria C+**

**5. Pavlovschi E., Verega Gr., Nacu V., Capros N., Cociug A.** Decellularized bone allografts-premises for bone defect repair in dentistry. In: *Stomatological medicine*, 2024; 69(4) , pp. 41-49, ISSN 1857-1328, DOI: <https://doi.org/10.53530/1857-1328.24.4.05>

**II. Teze în lucrările conferințelor științifice:**

✓  **internaționale - desfășurate peste hotare**

**6. Soian A., Pavlovschi E., Verega Gr., Nacu V., Andree B., Hilfiker A.** Experimental study in non/imunogen 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.

**7. 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.

**8. Pavlovschi E., Stoian A., Cobzac V., Verega Gr., Nacu V.** The vascularized bone allotransplantation - can it be without an immunosuppression? In vivo experimental study. In: *Program book of National Congress Of "Romtransplant " Association*. 2020, România, p.11, on-line version.

**9. Pavlovschi E., Stoian A., Verega Gr.** Vascularized allotransplant, successful alternative for massive bone defects. In: *Abstract book of National Congress for Ortopedics*. Sibiu, România, 3-5 octombrie 2018, abstract book, p. 83

✓  **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 20 for Students and Young Doctors*. Chișinău, 2018, pp. 143-144. DOI: [ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/114348](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/114348).

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

Autor:

Secretar științific al Senatului,  
dr. filosof. Didina Nisteanu



*Paulosebi Elena*

*Ahuc -*

12. Mihaluta V., Stoian A., **Pavlovschi E.**, Verega Gr. RECONSTRUCTION OF THE SCALP DEFECT WITH THE TRAPEZIUS MUSCLE FLAP (CLINICAL CASE) In: *Abstract book of VII-th International Medical Congress for Students and Young Doctors MedEspera 2018*. pp.32-33 [https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare\\_articol/112824](https://ibn.idsi.md/ro/vizualizare_articol/112824)

✓ **naționale cu participare internațională**

13. **Pavlovschi E.**, Stoian A., Gardikiotis I., Verega Gr., Nacu V., Cernei G. The vascularized bone allotransplantation after decellularization process, in vivo testing. Abstract Book. Conferința Științifică Anuală. Cells and tissues transplantation. Actualities and Perspectives. Chișinău: 2023, p. 37. DOI: [repository.usmf.md/handle/20.500.12710/24267](https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/24267).

14. Stoian A., **Pavlovschi E.**, Verega Gr., Birgit A., Hilfiker A., Nacu V. Experimental study in obtaining of a vascularised composite bone extracellular matrix. In: Abstract Book. Conferința științifică anuală. Cells and tissues transplantation. Actualities and Perspectives. Chișinău: 2023, pp. 40. DOI: [repository.usmf.md/handle/20.500.12710/24272](https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/24272).

✓ **naționale**

15. **Pavlovschi E.**, Stoian A., Malcova T., Iordăchescu R., Verega Gr. Decelularizarea combinată a allogrefei osoase vascularizate. etapă de studiu experimental in vivo. În: Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”, Chișinău. Chișinău: CEP „Medicina”, 2020, p. 519. DOI: [ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/126485](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/126485).

16. Stoian A., Nacu V., **Pavlovschi E.**, Macagonova O., Malcova T., Mihaluta V. Perspectiva de viitor a alotransplantului osos vascularizat. În: Congresul consacrat aniversării a 75-a de la fondarea Universității de Stat de Medicină și Farmacie „Nicolae Testemițanu”. R, 21-23 octombrie 2020, Chișinău. Chișinău: CEP „Medicina”, 2020, p. 525. [https://ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/126554](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/126554)

17. **Pavlovschi E.**, Verega Gr., Stoian A., Nacu V. Surgery protocol of vascularized bone allotransplant. The next stage of in vivo experimental study. In: Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. (R), 20-22 octombrie 2021, Chișinău. Chișinău: CEP „Medicina”, 2021, p. 333. ISBN 978-9975-82-223-7. [https://ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/144671](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/144671)

18. Stoian A., **Pavlovschi E.**, Nacu V., Sladic S., Andree B., Hilfiker A. Principles of

Autor:

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



*Pavlovschi Elena*

*Ajuz*

decellularization for composite vascularized bone graft. În: Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. (R), 20-22 octombrie 2021, Chișinău. Chișinău, Republica Moldova: 2021, p. 337. ISBN 978-9975-82-223-7. [https://ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/144677](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/144677)

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

**19. Pavlovschi E.,** Stoian A., Nacu V., Verega Gr., „Alogrefele osoase vascularizate decelularizate ca metodă de tratament a defectelor osoase critice”. Certificat de inovație nr. 6052 din 16 mai 2023.

**20. Stoian A., Pavlovschi E.,** Verega Gr., Nacu V., „Metodă de decelularizare pentru grefele osoase compozite vascularizate”. Certificat de inovație nr. 6058 din 24 mai 2023

**21. Fici A., Nacu V., Oprea O. C., Spoiala A., Motelica, L., Fosa D., Jian M., Pavlovschi E.** - ”Nanostructured bone grafts with predetermined properties”, Proiect bilateral, Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare - USMF „Nicolae Testemițanu și Centrul de medicină personalizată - Univ. de Știință și Tehnologie POLITEHNICA din București, România. În: Expoziția Europeană a Creativității și Inovării EUROINVENT 2025, ed. a XVII-a, **Medalie de Aur.**

### **IV. Cursuri educaționale și programe de burse**

**22.** Bursa de cercetare doctorală a Agenției Francofone Universitare ”Eugen Ionescu” 2021 - 15.09.2021-15.02.2022 laboratorul de microchirurgie a CEMEX UMF „G.T.Popa” Iași, România

**23.** 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.

**24.** Proiect bilateral: Nanostructured bone grafts with predetermined properties 2024-2026 - Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare - USMF „Nicolae Testemițanu și Centrul de medicină personalizată - Univ. de Știință și Tehnologie POLITEHNICA din București, România.

### **V. Participări cu comunicări la forumuri științifice naționale și internaționale**

#### **✓ forumuri științifice internaționale:**

**26.** Pavlovschi E., Stoian A., Verega Gr. Vascularized allotransplant, successful alternative for massive bone defects. In: Abstract book of National Congress for Orthopedics, Sibiu, România, 3-5 octombrie 2018.

Autor:

Secretar științific al Senatului,  
dr. filosof. Didina Nisteanu



*Pavlovschi Elena*

*Spicu*

**27.** 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. ClujNapoca, Romania, May 9-11, 2019.

**28.** **Pavlovschi E.**, Stoian A., Cobzac V., Grigore V., Nacu V. The vascularized bone allotransplantation - can it be without an immunosuppression? In vivo experimental study. In: Romtransplant National Congress 11th Edition, exclusively online, via ZOOM, September 23-26, 2020. Nov 16, 2020.

**29.** **Pavlovschi E.**, Stoian A., Verega Gr., Nacu V. The vascularized bone allotransplantation - In Vivo experimet. Preliminary report. In: International european conferince on interdisciplinary scientific research. Warsaw, Poland, August 8-9, 2021.

**30.** Stoian A., **Pavlovschi E.**, Verega Gr., Nacu V., Andree B., Hilfiker A. Experimental study in non-imunogen vascularized bone allograft. In: The 19th National Congress of the Romanian Association of Plastic Surgeons, 14th National Congress of the Romanian Society of Reconstructive Microsurgery, 13th National Congress of the Romanian Society for Surgery of the Hand. Timișoara, România, April 28-30, 2022.

**31.** 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. Chișinău, September 20-23, 2023.

**32.** **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 - ICNBME-2023. Chișinău, September 20-23, 2023.

✓ **forumuri științifice naționale:**

**33.** **Pavlovschi E.**, Stoian A., Mihaluta V. The vascularized allotransplant– successful alternative for massive bone defects. In: Abstract book of Med Espera International Medical Congress 20 for Students and Young Doctors. Chișinău. Republica Moldova, 2018: pp. 143-144. ISBN 978-9975-151-11-5. DOI: [ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/114348](https://doi.org/10.26907/ibn.idsi.md/vizualizare_articol/114348).

**34.** **Pavlovschi E.**, Verega Gr., Stoian A., Nacu V. Surgery protocol of vascularized bone

Autor:

Secretar științific al Senatului,  
dr. filosof., Didina Nistreanu



*Pavlovschi Elena*

*Ștefan*

allograft. 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. ISBN 978-9975-82-223-7. [https://ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/144671](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/144671).

**35. Stoian A., Pavlovschi E., Verega Gr., Birgit A., Hilfiker A., Nacu V.** Experimental study in obtaining of a vascularised composite bone extracellular matrix. In: Cells and tissues transplantation. Actualities and Perspectives. Chișinău: 2023, p. 40. ISBN 978-9975-82-313-5. DOI: [repository.usmf.md/handle/20.500.12710/24272](https://repository.usmf.md/handle/20.500.12710/24272).

**36. Pavlovschi E., Stoian A., Gardikiotis I., Verega Gr., Nacu V., Cernei G.** The vascularized bone allotransplantation after decellularization process, in vivo testing. In: Cells and tissues transplantation. Actualities and Perspectives. Chișinău: 2023, pp. 37. CZU: 616-089.57.085. DOI: 20.500.12710/24267.

**37. Pavlovschi E., Stoian A., Malcova T., Iordăchescu R., Verega Gr.** Decelularizarea combinată a allogrefei osoase vascularizate. Etapă de studiu experimental in vivo. In: Abstract Book. Congresul Consacrat aniversării a 75-a de la fondarea USMF „Nicolae Testemițanu”. Chișinău: CEP „Medicina”, 2020, p. 519. DOI: [ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/126485](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/126485).

**38. Pavlovschi E., Verega Gr., Stoian A., Nacu V.** Surgery protocol of vascularized bone allotransplant. The next stage of in vivo experimental study. In: Abstract book. Conferința Științifică Anuală. Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. Chișinău: CEP „Medicina”, 2021. p. 333. ISBN 978-9975-82-223-7 DOI: [ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/144671](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/144671).

**39. Pavlovschi E., Stoian A.,** The vascularized bone allotransplantation - in a rabbit model, preliminary report. In: MedEsperaInternational Medical Congress for Students and Young Doctors. 8, 24-26 septembrie 2020, Chișinău. Chisinau, 2020. ISBN 978-9975-151-11-5.

**40. Stoian A., Pavlovschi E., Nacu V., Sladic S., Andree B., Hilfiker A.,** Principles of decellularization for composite vascularized bone graft. In: Abstract book. Conferința Științifică Anuală. Cercetarea în biomedicină și sănătate: calitate, excelență și performanță. Chișinău: CEP „Medicina”, 2021, p 337. ISBN 978-9975-82-223-7 (PDF). DOI: [ibn.idsi.md/vizualizare\\_articol/144677](https://ibn.idsi.md/vizualizare_articol/144677).

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

### ✓ Internaționale:

Autor:

Secretar științific al Senatului,  
dr. filoz. Didina Nisteanu



*Pavlovschi Elena*

*Spus*

41. 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:**

42. 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.

43. Pavlovschi E., Stoian A., Malcova T., Iordăchescu R., Verega Gr., 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

Autor:

Secretar științific al Senatului,  
dr. filos.. Didina Nisteanu



*Pauloveci Elena*

*Apus*

## DECLARAȚIA PRIVIND ASUMAREA RĂSPUNDERII

### DECLARAȚIE

#### de conformitate asupra originalității lucrării

Subsemnata, Elena PAVLOVSCHI, absolventă a programului de doctorat 321.18 Ortopedie și traumatologie, conducător de doctorat Grigore VEREGA, dr. hab. șt. med., prof. univ., prin prezenta declar pe propria răspundere că teza de doctor în științe medicale cu titlul ”**Plastia defectelor osoase tubulare cu allogrefă inclusă în circuitul vascular adoptiv**” a fost elaborată de mine ca rezultat al propriei cercetări și documentări și nu a mai fost prezentată niciodată la o altă instituție de învățământ superior din țară sau străinătate.

De asemenea, declar că toate sursele bibliografice utilizate, inclusiv cele de internet, sunt indicate în lucrare cu respectarea regulilor de evitare a plagiatului/autoplagiatiului:

reformularea în cuvinte proprii a textelor scrise de către alți autori indică sursa bibliografică din care s-a inspirat;

rezumarea ideilor altor autori deține referința precisă a textului original;

prezentările grafice care nu-mi aparțin au indicată sursa bibliografică exactă;


în cazul în care, în calitate de (co)autor am prezentat deja o parte din această lucrare în cadrul unor manifestări științifice (congrese, conferințe, colocvii, mese rotunde) din țară și de peste hotare, am folosit autocitarea;

calculele sunt efectuate de mine în totalitate, iar comentariul rezultatelor obținute este unul original.

Prin prezenta îmi asum în totalitate originalitatea lucrării elaborate.

Numele și prenumele Pavlovschi Elena

Semnătura

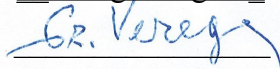
Pavlovschi Elena 

#### Conducător de doctorat:

Nume și prenume

Verega Grigore

Semnătura

Gr. Verega 

Chișinău, 2026

**ADNOTARE**  
**Pavlovschi Elena**

**„Plastia defectelor oaselor tubulare cu alogrefă inclusă în circuitul vascular adoptiv”**  
**Teză de doctor în științe medicale, Chișinău, 2026.**

Lucrarea este expusă pe 136 pagini de text electronic și include: Introducere, III capitole, concluzii generale și recomandări practice. Indicele bibliografic citează 142 surse literare. Materialul ilustrativ este reprezentat în 17 tabele și 32 figuri. Rezultatele obținute sunt publicate în 5 lucrări științifice.

**Cuvinte-cheie:** defect osos critic, alogrefă osoasă vascularizată, experiment *in-vivo*

**Scopul:** cercetarea premiselor de plastie a defectelor osoase tubulare cu alogrefe compozite decelularizate incluse în circuitul vascular gazdă prin metodă experimentală *in vivo* pentru aprecierea fezabilității.

**Obiective:**

1.Cercetarea anatomică a vascularizării membrului posterior la animal de laborator (NZWR) și stabilirea segmentului osos tubular lung cu pedicul vascular optim.

2.Elaborarea procedurii de prelevare și conservare a segmentului osos tubular lung cu pedicul vascular optim pentru conservare, decelularizare

3.Elaborarea protocolului de anestezie și intraoperator pentru plastia ortotopică *in-vivo* a defectului osos tubular lung cu alogrefă vascularizată compozită decelularizată

4.Cercetarea și testarea *in-vivo* a vaselor decelularizate prin metodă mixtă (compatibilă pentru grefele osoase integrale compozite - os +vas), pentru studierea rezistenței mecanice la sutura microchirurgicală, TA, undă de puls în circuitul gazdă la animal de laborator șobolani Wistar.

5.Cercetarea prin testarea *in-vivo* a țesutului osos decelularizat prin metodă mixtă (compatibilă pentru grefele osoase integrale compozite - os +vas) revascularizat prin studierea manifestărilor clinice și paraclinice ale plastiei defectelor osoase tubulare.

**Noutatea și originalitatea cercetării:** combinarea în premieră a decelularizării alogrefelor vascularizate osoase cu tehnicile microchirurgicale, pentru includerea lor în circuitul vascular gazdă sau adoptiv, ar permite obținerea unei grefe ortotopice ce nu ar necesita imunosupresie, ar păstra integral vascularizarea, proprietățile biologice ale osului pentru consolidare și o funcție reparatorie eficientă. **Semnificația teoretică:** cercetarea literaturii de specialitate a permis trasarea vectorului studiului spre tacticile de tratament experimental ale defectelor osoase tubulare prin alogrefe osoase vascularizate ortotopice, ce nu ar necesita imunosupresie postgrefare, testate *in-vivo* în premieră după procesul de decelularizare.

**Valoarea aplicativă a lucrării:** Elaborarea unui algoritm de prelevare și plastie a defectelor osoase tubulare *in-vivo* cu alogrefe osoase vascularizate decelularizate reincluse microchirurgical în circuitul adoptiv. **Implementarea rezultatelor științifice:** rezultatele studiului experimental obținute au fost implementate în cadrul Laboratorului de Inginerie Tisulară și Culturi Celulare, Catedra Ortopedie și Traumatologie a USMF N. Testemițanu. **Rezultatele obținute** au fost implementate în cadrul proiectelor de cercetare: 1. „Nanoarhitecturi în bază de GaN și matrici tridimensionale din materiale biologice pentru aplicații în microfluidică și inginerie tisulară” - 20.80009.5007.20 oferit de Agenția Națională de Cercetare Dezvoltare a Guvernului Republica Moldova. 2.” Nanostructured bone grafts with predetermined properties” 2024-2026, Proiect bilateral-Laboratorul de inginerie tisulară și culturi celulare - USMF „Nicolae Testemițanu și Centrul de medicină personalizată - Univ. de Știință și Tehnologie POLITEHNICA din București, România (29ROMD/20.05.2024).

## SUMMARY

Pavlovschi Elena

### „Plasticity of tubular bone defects with Allografts Included in the adoptive vascular circuit” PhD Thesis of Medical Sciences, Chişinău 2026

The work is presented on 136 pages of electronic text and includes an Introduction, three chapters, general conclusions, and practical recommendations. The bibliographic index cites 142 literary sources. Illustrative material comprises 17 tables and 32 figures. The results obtained have been published in 5 scientific works.

**Key words:** critical bone defect, vascularized bone allograft, *in vivo* experiment.

**Main aim of the work:** An experimental *in vivo* study on the feasibility of critical-sized tubular bone defect reconstruction using decellularized vascularized composite allografts integrated into the host circulatory system.

**Research objectives:**

1. Review of specialized literature to evaluate contemporary methodologies for the treatment of critical bone defects;
2. Anatomical research of hind limb vascularization in laboratory animals (NZWR) to establish the bone segment with the optimal vascular pedicle;
3. Development of a procedure for harvesting bone segments with a vascular pedicle for preservation, decellularization, and subsequent integration into the recipient vascular circuit;
4. *In vivo* testing of vessels decellularized via a mixed method within composite bone grafts (bone+vessel), to study mechanical resistance to microsurgical suturing, blood pressure (BP), and pulse waves;
5. Investigation of local and systemic postoperative manifestations following the placement of the vascularized bone allograft in the recipient organism compared to control groups;

**Novelty and originality of the research:** Combining the decellularization of vascularized bone allografts with microsurgical techniques by integrating them into the host vascular circuit. This approach allows for obtaining a graft that does not require immunosuppression while fully preserving vascularization, biological properties for bone consolidation, and effective reparative function.

**Theoretical significance:** The need for orthotopic vascularized bone allografting that does not require post-grafting immunosuppression is a highly relevant and current topic in reconstructive surgery.

**Applicative value of the work:** Development of an algorithm for the sampling and reconstruction (plasty) of critical *in vivo* bone defects using decellularized vascularized bone allografts.

**Implementation of scientific results:** The results of this experimental study were implemented within the Laboratory of Tissue Engineering and Cell Cultures, Department of Orthopedics and Traumatology of USMF “Nicolae Testemiţanu”. Furthermore, the results were integrated into the research project "GaN-based nanoarchitectures and three-dimensional matrices of biological materials for applications in microfluidics and tissue engineering" (20.80009.5007.20), funded by the National Agency for Research and Development of the Government of the Republic of Moldova. Nanostructured bone grafts with predetermined properties (2024-2026) – Laboratory of Tissue Engineering and Cell Cultures – Nicolae Testemiţanu State University of Medicine and Pharmacy (Republic of Moldova) and the Personalized Medicine Center – National University of Science and Technology POLITEHNICA Bucharest, Romania (29ROMD/20.05.2024).