

# INGINERIA TISULARĂ ÎN OBTINEREA GREFELOR PENTRU SUBSTITUIREA DEFECTELOR OSOASE (Articol de sinteză)

Viorel Nacu

Laborator Inginerie tisulară și culturi celulare, catedra Chirurgie operatorie și anatomie topografică USMF "Nicolae Testemițanu"

## Summary

### *The tissue engineered grafts for bone defects recovering*

Biological methods for bone regeneration are needed to reverse bone loss caused by diverse agents. Regenerative therapies could use traditional autogenous, allogeneous bone grafting or composite grafts including resorbable 3D scaffolds and differentiated or no differentiated cells. As cells grafts could be: autogenous bone marrow cells or allogeneous cord blood stem cells. Also gene expression systems will be combined with cells seeded in precise three-dimensional configurations on synthetic scaffolds to control both temporal and spatial distribution of regenerative factors. The natural processes of bone formation and repair require the coordinated expression of many molecules; including growth factors, bone morphogenetic proteins, and specific transcription factors. Current knowledge related to bone and fracture repair describes how tissue engineering, may mimic critical aspects of these natural processes.

## Actualitatea temei

După sânge, țesutul osos este cel mai frecvent transplantat țesut în secolul nostru. Totodată, crește numărul de pacienți de la care nu poate fi colectată grefa osoasă sau calitatea acesteia este proastă, sau masa osoasă este insuficientă, mai ales în cazul intervențiilor chirurgicale multiple sau în cazul copiilor, la care colectarea autogrefei este limitată [11].

Pentru satisfacerea cerințelor clinice în tratamentul maladiilor osoase, chirurgia reconstructivă necesită metode performante în restabilirea scheletică. Medicina regenerativă este un domeniu al biotehnologiei, reprezentantă de tehnici care prevede restabilirea structurii anatomice a țesuturilor deteriorate sau degenerate [8].

Medicina regenerativă are la bază înțelegerea proceselor biologice implicate în regenerarea și funcția țesuturilor normale. Medicina regenerativa are ca bază datele acumulate de embriologie, organogeneză, factori de creștere, biologia celulei, știința biomaterialelor și întrunește două strategii: terapia celulară, care reprezintă implantarea de celule pentru restabilirea țesuturilor deteriorate și ingineria tisulară, care realizează *in vitro* substituenți biologici utilizați pentru substituția țesuturilor nefuncționale.

Regenerarea țesuturilor scheletice reprezintă una din direcțiile prioritare de dezvoltare ale ingineriei tisulare, aplicabilitatea lor clinică fiind deja un fapt împlinit [6].

Ortopedia-traumatologia este considerată una dintre specialitățile chirurgicale care evoluează cel mai rapid, datorită colaborării cu alte specialități (chirurgia plastică, chirurgia vasculară, cea maxilo-facială, neurochirurgia) care tind spre refacerea structurilor afectate. Totodată se fac studii în domeniile medicina care se ocupă de refacerea țesuturilor (chirurgia vasculară, plastică și reparatorie sau neurochirurgia) dar și cu ramuri specializate ale metalurgiei, chimiei polimerilor, biomaterialelor pentru elaborarea și perfecționarea implanturilor ortopedice și prepararea de noi substituenți tisulari și menținerea lor funcționale.

Inginerie tisulară include șase domenii de cooperare: 1. biomaterialele - reprezintă suportul fizic, de natură organică sau sintetică, pentru ghidarea refacerii țesutului de către celulele specifice; 2. celulele necesare pentru refacerea țesutului specific; 3. biomecanica – studiază proprietățile native ale țesuturilor și semnalele mecanice locale necesare pentru diferențierea; 4. biomoleculele, (factori de creștere, hormoni locali, semnale intercelulare, morfogene) care orientează diferențierea celulară și expresia anumitor gene pentru sinteza proteinelor specifice; 5. informatica, care generează analiza datelor despre expresia și secvențialitatea genelor și a proteinelor, modelajul tisular și celular computerizat, sistemele de

control a calității, baze de date; 6. designul ingineresc, destinat proiectării sistemelor 2D și 3D, bioreactoare, stocarea și transportul țesuturilor obținute [21].

Pentru a asigura consolidarea fragmentelor osoase este necesar să se ia în considerare și să se facă asocieră multiplilor factori implicați în acest proces complicat: anturajul celular, factorii de creștere, matricea osoasă și stabilitatea mecanică în focar – așa-numitul *Diamond Concept* (conceptul de diamant). Întrunirea tuturor acestor condiții asigură consolidarea fermă a fragmentelor osoase [14].

Pentru a înțelege cum poate fi dirijat procesul de regenerare a țesutului osos stagnat, este foarte important să cunoaștem cum are loc formarea țesutului osos în ontogeneză, adică procesul fiziologic de reparație osoasă și factorii externi și interni care îl influențează. Procesul de formare a țesutului osos pe parcursul ontogenezei se realizează pe etape.

Distingem osteohistogeneza embrionară și postembrionară. La embrion țesutul osos se dezvoltă din mezenchim prin două modalități: direct din mezenchim (osteohistogeneza directă) și prin modelul cartilagos al osului primar cu substituirea lui ulterioară în țesut osos (osteohistogeneza indirectă). Acest mecanism stă la baza formării majorității oaselor scheletului.

Dezvoltarea postembrionară (osteogeneza postnatală) asigură formarea osului în perioada de creștere a organismului și continuă ulterior la organismul adult în condiții fiziologice (remodelarea) sub influența diverselor modificări în homeostaza lui. Remodelarea osoasă este un proces complex, care include două activități totalmente opuse – resorbția țesutului osos și formarea țesutului osos nou. Aceste mecanisme asigură funcția metabolică a osului (eliberarea de minerale) și acomodarea arhitecturală a țesutului osos la schimbarea condițiilor mecanice. Acest remodelaj constituie anual 25% pentru osul spongios și numai 3% pentru țesutul osos compact [3, 14, 29, 30].

Sinteza matricei extracelulare este asigurată de osteoblaste și parțial de osteocite, iar resorbția este realizată de către osteoclaste. Fiind diferite după structură și funcție, aceste celule în ansamblu fac același lucru – remodelarea osoasă. Evident că ele interacționează reciproc [5].

### **Rezultate și discuții**

Celulele stem pot să se diferențieze spontan în mai multe tulpini celulare la transplantare *in vivo*, și doar o cantitate mai mică dintre ele se diferențiază în tipul de celule necesare pentru obținerea țesutului dorit. Acest fapt poate reduce eficacitatea transplantării pe care o dorim. Din aceste considerente se recomandă efectuarea diferențierii *in vitro*, pentru a avea un număr mai mare de celule osteoblastice necesare în diferențierea osteogenică. În acest scop, *in vitro*, am utilizat anumite substanțe care dirijează diferențierea în acest tip de celule: acidul ascorbic, dexametazona, glicerofosfatul. Dexametazona este un glicoproteid sintetic, care are un efect anabolic asupra celulelor UFC-F. A fost demonstrat că în celulele osoase dexametazona acționează la nivelul de expresie a mai multor proteine și enzime, inclusiv colagenul, fosfataza alcalină, G 11, subunitățile 2 și 4 ale integrinelor, N-caderinul, interleuchinele 6 și 11.

Acidul ascorbic (Vitamina C) este o vitamină esențială implicată în convertirea procolagenului în colagen și secreția ulterioară. Glicerofosfatul reprezintă un fosfat organic și substrat pentru enzima alcalinofosfataza, prezența în mediu asigură creșterea formării matricei mineralizate *in vitro*.

Pentru diferențierea osteoclastelor din liniile celulare macrofago-monocitare, prezente în grefa obținută din măduva osoasă, sunt necesari anumiți inductori, care diferă absolut de cei implicați în procesul de formare a osteoblastelor, dintre care cei mai eficienți la etapa actuală sunt RANKL și CSF1, în prezența cărora diferențierea aceluiași celule obținute din măduvă osoasă se realizează în direcția formării osteoclastelor. Triada moleculară *OPG/RANK/RANKL* orchestrează remodelarea osoasă patofiziologică [27]. Astfel, diferențierea aceluiași biotip celular din măduvă osoasă se realizează în două direcții diferite – în celule care îndeplinesc funcții diferite: osteoclastele resorb osul, iar osteoblastele participă la crearea țesutului osos.

Morfologia osteoclastelor obținute în cultură celulară se deosebește de cea a osteoclastelor din os. Deoarece ele se află pe plastic, celulele au o formă aplatizată, ocupând un

spațiu mai mare. Creșterea *in vitro*, în prezența discurilor de dentină, le dă o caracteristică morfologică aproape de cea pe care o au *in vivo*. Pe discurile de dentină celulele pot forma lacune de resorbție. S-a observat că celulele obținute *in vivo* sunt mai fragile în timpul manipulării lor, fixării, colorării. Acest lucru indică asupra faptului că eficacitatea, activitatea celulelor diferențiate *in vivo* ar putea fi mai mică comparativ cu celulele aflate în organismul viu. Totodată acest lucru este dificil de demonstrat, cu atât mai mult că nici sursele bibliografice studiate nu oferă informații în acest sens.

În experimentele noastre, efectuate cu osteoclastele obținute din măduvă osoasă de la șoareci transgenici cu osteomielită cronică multifocală în prezența RANKL și CSF1, a fost apreciată o altă particularitate a dezvoltării celulelor. Osteoclastele obținute din măduva osoasă de la șoarecele cu OCM se dezvoltă mai rapid, fiind la ziua a 3-a mai multe decât în cultura obținută din măduva osoasă a șoarecelui cu fenotip normal. Experimentele prin utilizarea supernatantului obținut din mediul de cultivare a celulelor osteomedulare din măduvă osoasă de la șoareci cu OCM care a fost adăugat în mediul de cultură al celulelor obținute din șoarece sănătos au arătat că acesta nu influențează creșterea celulelor în raport cu lotul-martor.

Astfel, presupunem existența unui mecanism intrinsec, intracelular care dirijează viteza de diferențiere și activitatea celulelor. Probabil și în cazul regenerării osului s-ar putea presupune existența intracelulară a unor factori care împiedică proliferarea necesară a celulelor osteogene și formarea calusului osos necesar consolidării fracturii. Această ipoteză urmează să fie investigată în continuare.

Tabloul remodelării osoase se realizează în felul următor: celulele bordante se retrag, eliberând suprafața osului, și oferă spațiu de activitate osteoclastelor. În faza de resorbție osteoclastele dizolvă progresiv matricea extracelulară osoasă și formează un defect lacunar. În faza următoare osteoclastele sunt înlocuite de celule precursorale ale osteoblastelor, care se diferențiază pe suprafața lacunei și produc matrice osoasă nouă până la completarea defectului. Apoi remodelarea trece în ultima fază – de reconstrucție.

Dirijarea moleculară a acestui proces nu este încă pe deplin cunoscută, cu toate că se cunosc substanțele care pot diferenția CMO în osteoclaste și osteoblaste *in vitro*. Explicația rezidă în faptul că în os reacțiile chimice sunt perturbate și este uneori dificil să estimezi rezultatele obținute.

Trei grupe de factori influențează procesul de reparație osoasă:

1. substanțele hormonale (parathormonul; hormonul de creștere; estrogenii; 1,25 dihidrocholecalciferol, IGF 1 și 2);
2. moleculele produse local și activate prin acțiune autocrină sau paracrină (IGF 1 și 2; proteina morfogenetică osoasă (BMP), prostoglandinele E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), IL-1, TNF $\alpha$ , GM-CSF, TGF $\beta$ , FGF 2);
3. moleculele prezente în matricea osoasă extracelulară (FGF2, TGF $\beta$ , GM-CSF, IGF 1 și 2) sunt inactivate, dar se activează de către celulele osteogene.

Se consideră că sub acțiunea factorilor osteoresorbanți, parathormonului, 1,25 dihidrocholecalciferol și prostoglandinei E<sub>2</sub> osteoblastele părăsesc suprafața osului și permit accesul osteoclastelor. Totodată parathormonul și prostoglandina E<sub>2</sub> stimulează acțiunea colagenazei și plasminogenei, care conduc la degradarea periostului, descoperind matricea osoasă [17].

În faza resorbției osoase moleculele anumitor substanțe (PGE<sub>2</sub>, IL-1, TNF $\alpha$ , IL-6, GM-CSF, M-CSF, IGF1) favorizează proliferarea celulelor precursorale osteoclastice din măduva osoasă. TGF  $\beta$ , contrar celorlalte, diminuează proliferarea celulelor precursorale, dar stimulează maturizarea lor în osteoclaste. Interferonul  $\gamma$  inhibă diferențierea precursorilor în celule mature prin blocarea fuziunii lor.

Calcitonina și PGE<sub>2</sub> fixează receptorii membranei osteoclastelor, conducând la creșterea AMP (*adenosine mono-phosphate*), care provoacă inhibiția resorbției osoase. Se consideră că în caz de osteopetroză este diminuată activitatea osteoclastelor.

Stimularea proliferării osteoblastelor este asigurată de un număr impunător de molecule (PTH, FGF2, IGF1 și 2, TGF  $\beta$ , BMP, GM-CSF, IL-1, TNF $\alpha$  și mai puțin participă PGE2), după care estrogenii, 1,25 dihidrocalciferolul, FGF2, TGF $\beta$ , IGF1 și 2, BMP stimulează producerea matricei extracelulare, dar IL1 și TNF $\alpha$  o inhibă (J. Poirier, J. R. Dumas., 1999) [25].

Pentru obținerea osteoblastelor noi am utilizat dexametazonă, care este un steroid sintetic și promovează diferențierea osteoblastică a celulelor stem mezenchimale embrionare și a celor din măduvă osoasă [8]. Glicerofosfatul și vit. C sunt substanțe care induc diferențierea celulelor stem mezenchimale în osteoblaste și ulterior în osteocite.

Procesele de osteogeneză reparatorie se activează brusc în caz de traumatism (osteogeneză reparatorie). În cazul dat, ca răspuns la distrugerea osului și moartea celulelor osoase, are loc autoreproducerea lor și restabilirea populației celulare [1].

Repararea osoasă se caracterizează printr-un șir (cascadă) de evenimente: inițial în focar are loc concentrarea celulelor stem mezenchimale, care este dirijată prin atracție chimică (hemotaxis); urmează proliferarea celulelor sub acțiunea semnalelor mitogene în direcție osoasă, cartilaginoasă și se activează angiogeneza. Procesul reparator osos este ajutat de elementele matricei osoase demineralizate, din care au fost izolate 8 proteine osteogenetice (BMP 1-8) care aparțin superfamiliei TGF $\beta$ . BMP asigură diferențierea osteoblastică, concomitent BMP asigură și condrogeniza. Ca exemplu BMP4 micșorează catabolismul condrocitelor și stimulează sinteza proteoglicanilor; BMP 7 asigură chondrogeniza [25].

În ingineria tisulară sunt utilizate două strategii de bază:

- 1) Creșterea celulelor *in vitro* pe transplant și inocularea grefei compozite în defectul osos;
- 2) Implantarea matricei și umplerea ei ulterioară cu celulele-gazdă.

Mecanismele de diferențiere a osteoblastelor din celule stem mezenchimale necesită interfață biomimetică, stimulenți mecanici, factori solubili intracelulari și extracelulari și contact intercelular.

CSM și UFC-F (unitățile de formare a coloniilor fibroblastice) pot fi induse *in vivo* pentru a prolifera și a se diferenția în linii osteoblastice, utilizând dexametazonă, acid ascorbic și glicerofosfat. În aceste condiții celulele cresc, se diferențiază și se maturizează.

Creșterea (proliferarea) celulelor se realizează prin multiplicarea de câteva ori a numărului de celule; diferențierea se manifestă prin producerea de colagen tip I, fosfatază alcalină și maturizarea și formarea unor noduli în mai multe straturi, secreția osteocalcinei, mineralizarea matricei extracelulare.

Cu toate că a fost arătată posibilitatea diferențierii CSM în osteoblaste în cultură celulară și că se produce matricea extracelulară, nu s-a ajuns la stadiul de maturizare în osteocite cu alungiri membranoase care mediază contactul intercelular caracteristic, de aceea materialul produs *in vitro* este considerat ca fiind „asemănător țesutului osos”.

*Interfața biomimetică:* în țesuturi și organe celulele individuale aderă la matricea extracelulară, care constă din proteine, polizaharide și factori de creștere. Celulele interacționează individual prin intermediul receptorilor cu aceste componente, care asigură ancorarea și stimulatorii proprii pentru menținerea identității celulare (fenotipul). Odată scoase din mediul obișnuit, aceste celule vor căuta această matrice celulară, pentru a avea stimulii proprii și a-și menține funcția.

Interfața biomimetică imită matricea extracelulară și poate fi construită prin imobilizarea proteinelor adezive și alți factori stimulatori (secvențe polipeptidice și polizaharide sau secvențe apropiate de acești factori) la substratul biomaterial. Factorii care asigură integrarea cu osul includ: proteinele colagenice ale matricei extracelulare, fibronectina, sialoproteina osoasă; factori de creștere BMP-2,4,7, FGF-2, IGF-1,2, VEGF și minerale ca tricalcium fosfat și hidroxiapatita [18].

Aproape toate celulele pacientului sunt subiecți ai stimulării fizice cauzate de circuitul sangvin, respirație, mers care stimulează o largă și variată gamă de răspuns biochimic. Stimulii mecanici acționează printr-o cale mecanotransductivă puțin cunoscută, care conduce la schimbări în morfologia celulară și orientare, expresia genică și interacțiunea intercelulară prin secreție de

factori solubili sau contact direct între ele. Osteoblastele răspund la stimulii mecanici prin creșterea secreției de prostoglandine și oxid nitric, care ajustează activitatea osteoclastelor care resorb osul deteriorat și recrutarea osteoblastelor noi. Stimularea mecanică, de asemenea, sporește comunicarea intercelulară prin conexiuni gap.

Factorii solubili care se acumulează în microanturajul tisular joacă un rol semnificativ în modularea comportamentului celular prin căi de mediere a receptorilor. Printre acestea celulele osteoprogenitoare și cele osteoblastice expandează și se diferențiază ca răspuns la acțiunea diverșilor hormoni (glucocorticoizi, hormonii paratiroidieni și prostaglandine), factori de creștere (BMPs, FGFs, IGFs). Sub acțiunea stimulatoarelor mecanici osteoblastele secretă o varietate de factori, care includ prostoglandina E2, oxidul nitric, interleuchinele 1 și 6. Acești factori reglează comportamentul celulelor secretorii și al celor învecinate. În particular interleuchinele și prostoglandinele pot stimula resorbția osoasă de către osteoclaste *in vivo*.

Un factor important care vizează regenerarea osului îl reprezintă particularitățile de structură anatomică a diferitor regiuni, care au un grad diferit de dezvoltare a rețelei arteriale. În caz de fractură se rup vasele sangvine, iar cele rămase nu pot asigura o vascularizare suficientă și ca rezultat survine hipoxia [2, 24].

Hipoxia afectează diferențierea și proliferarea celulelor stem mezenchimale. A fost arătat că după hipoxie timp de 48 ore la  $\leq 1\%$  O<sub>2</sub> nu a influențat capacitatea de supraviețuire a CSM, dar a rezultat într-o acțiune persistentă cu durata de 14 zile, de *down-regulation* a *cbfa-1/Runx2*, osteocalcină și tipul I collagen și permanent, mai mult de 28 zile, *up-regulation* a osteopontinei și expresiei mRNA. De asemenea, a crescut de două ori expresia VEGF la nivelul proteinelor și mRNA. bFGF, TGFβ1 și IL-8 nu au fost modificate după hipoxie. Aceste rezultate indică o stimulare limitată a secreției factorului angiogenic, dar o persistență de micșorare la câțiva markeri osteoblastici care relevă că hipoxia afectează potențialul de formare a osului [11].

Formarea, regenerarea și remodelarea țesutului osos reprezintă un proces fiziologic dependent de crearea unei vascularizări adecvate, asigurate de procesul de angiogeneză (creștere de vase noi) care formează un suport considerabil pentru progresul în formarea țesutului nou și regenerarea organelor.

Spre deosebire de alte țesuturi, care regenerează prin formarea de cicatrice, osul regenerează totalmente cu formarea țesutului osos. Această specificitate este condiționată de caracteristicile osului: existența în structura osului normal a endostului și periostului care tapetează fața externă a osului, fața internă (endostul) și canalele haversiene și existența în structura osului a componentului spongios și celui compact.

Ca și în cazul plăgilor țesuturilor moi, vindecarea osoasă poate avea loc prin reparare osoasă primară și secundară. Vindecarea osoasă secundară se produce prin înmugurire vasculară, care pornește de la fragmentele osoase viabile, formând o masă granulară în care sunt încorporate fragmentele osoase. Țesutul granular se formează din elementele celulare ale endostului, periostului și sistemului haversian. Celulele cambiale periostale se diferențiază în osteoblaști și conduc la formarea osului spongios. Din stratul fibros superficial al periostului se formează țesut cartilagos [9]. Instabilitatea fragmentelor osoase, lipsa unei irigații arteriale adecvate [28] determină formarea excesivă de cartilaj și țesut fibros, care produce o dereglare în procesul normal de regenerare osoasă și poate cauza stagnarea osteogenezei, atenuarea procesului de regenerare sau formarea pseudartrozei. Osul nou-format are punți extraosoase și intraosoase de o calitate inferioară. Restabilirea osului este un proces de durată și se poate prelungi luni de zile, finalizându-se cu remodelarea osoasă prin formarea de os lamelar, care-l înlocuiește pe cel spongios. La copii viteza de regenerare este mai sporită și în oasele plate datorită vascularizării abundente și unui număr impunător de celule predecesorii [9].

Cercetările noastre, care au avut la bază utilizarea matricei osoase demineralizate cu celule autologice osteomedulare în tratamentul defectului osului radial, au demonstrat experimental posibilitatea scurtării perioadei de vindecare comparativ cu inocularea numai a mediului nutritiv DMEM.

Autocelele sunt considerate actualmente unul dintre materialele cu cea mai mare perspectivă pentru terapia celulară și ingineria tisulară. Spre deosebire de cele embrionare, ele dispun de capacități de proliferare și diferențiere mai limitate, dar, fiind autologice, nu provoacă reacții ale sistemului imun al gazdei față de transplant și pot fi considerate cel mai bun material pentru tratamentul celular.

O sursă sigură de celule predecesorii este măduva osoasă, care este bogată în celule de acest tip. Mulți autori cercetează posibilitatea utilizării lor în optimizarea și activizarea procesului reparator în diferite țesuturi, în caz de afectare.

Avantajele utilizării autocelelelor, după cum am menționat anterior, sunt evidente prin lipsa conflictului imun (rejetul grefei) și reducerea la minimum a posibilității de contaminare a pacientului cu maladii hematotransmisibile [22].

Utilizarea măduvei osoase pentru stimularea regenerării osului este argumentată prin existența celulelor predecesorii în ea. Din celulele stem mezenchimale localizate în stroma măduvei osoase se pot dezvolta în anumite condiții osteoblaste, fibroblaste, condroblaste și adipocite. Deși măduva osoasă este principalul rezervor de celule stem mezenchimale, există lucrări care menționează prezența acestora într-o varietate de alte țesuturi. Acestea sunt periostul, țesutul conjunctiv muscular, măduva fetală, curentul sangvin, ficatul, sângele periferic, cordonul ombilical. Se pot izola celule cu potențial MSC-like din placentă și amnion. Coastele și corpurile vertebrale sunt mai greu accesibile și măduva lor nu prezintă o densitate celulară suficient de mare pentru recoltare, în special la adult [12].

Celulele fetale, ca și țesuturile embrionare, nu au un sistem imun dezvoltat, ceea ce micșorează probabilitatea complicațiilor după transplantare. La acest tip de celule pot fi atribuite și celulele obținute din sângele ombilical. Ele dispun de un grad mare de proliferare și sunt capabile să formeze colonii de celule care participă la regenerarea organului. Concomitent cu celulele stem se administrează și un complex de citochine și factori de creștere care stimulează regenerarea țesuturilor. Anume aceste capacități ale țesutului fetal și sistemul imun imatur asigură un efect terapeutic adecvat, fără agresivitate imună a celulelor transplantate față de recipient.

VEGF (*Vascular endothelial growth factor*) constituie o subfamilie a factorilor de creștere, mai specific a platelet-derived growth factor. Ele sunt proteine semnalizante importante implicate în vasulogeneză. Studiile sugerează că VEGF este extrem de important în tratamentul defectelor critice osoase și că acest factor de creștere poate avea un efect direct asupra celulelor progenitoare prin promovarea diferențierii în osteoblaste și prin creșterea mineralizării regeneratului osos.

Materialele suport pentru celule, citochine, factori de creștere pot fi repartizate în cinci grupe mari: os demineralizat; materiale din colagenă; polimeri resorbabili (biodegradabili) sintetici; materiale din calciu fosfat și alte materiale care mai pot servi ca suport tridimensional.

Principiile fundamentale de reglare a proceselor regenerării sunt: consecutivitatea, specificitatea fiecărui organ și ereditatea. Au fost determinate și mecanismele care stau la baza proceselor de regenerare: morfolaxisul – reorganizarea, restructurarea și diferențierea țesuturilor și celulelor; epimorfoza – proliferarea celulelor de la marginea internă sau externă a răni; hipertrofia regenerativă – creșterea în volum și masă a celulelor și unităților structurale din porțiunea organului rămas; regenerarea inductorie, prin care procesul de regenerare este indus de un factor bine determinat.

Stimularea osteogenezei în focar reprezintă elementul-cheie în tratamentul pseudartrozelor, deoarece aceasta reprezintă relansarea osteoformării, fără de care nu poate exista o evoluție spre consolidarea pseudartrozei.

În cercetările experimentale efectuate de noi am utilizat grefe celulare recolate din măduvă osoasă și grefe celulare ombilico-placentare care au fost inoculate în defecte critice ale oaselor plate, scurte și lungi.

Ca urmare a studiului comparativ, se poate spune că matricea osoasă demineralizată cu cultura celulară autologică osteomedulară, celulele ombilico-placentare și autoosul spongiform

din osul iliac stimulează formarea țesutului osos în spațiul interfragmentar al osului lung (radiusul). Totodată, folosirea aloosului morcelizat demineralizat în combinație atât cu celule autologice, cât și cu cele ombilico-placentare au un efect regenerativ mai pronunțat comparativ cu utilizarea numai a celulelor măduvei osoase. Reprezentând o structură tridimensională, osul demineralizat și morcelizat este un bun suport pentru grefele celulare, asigurând creșterea celulelor în interiorul spongiei într-un anturaj aproape de cel obișnuit pentru creșterea și dezvoltarea celulelor osteoblastice. MOD reprezintă o spongie de collagen de tip I, care tocmai este carcasa osoasă.

Plasarea grefelor compozite în defectul critic al osului din spațiul interfragmentar asigură creșterea nestingherită, activă a vaselor în grefă, iar celulele și citochinele care se administrează concomitent cu aceste grefe asigură decurgerea normală a procesului reparativ, permițând pătrunderea în regiunea defectului a celulelor predecesorii autologice transportate în această regiune prin patul sanguin. În cazurile oaselor lungi are loc formarea regeneratului și elementelor celulare ale lojei recipiente, care în urma procesului de remodelare își recapătă structura caracteristică acestor oase. Inocularea, între fragmentele osoase, a materialului osos demineralizat și a grefei complexe din matrice demineralizată și culturi celulare osteomedulare autologice și a celor ombilicale, în cazul procesului reparativ de substituție, face posibilă stimularea elementelor conjunctive ale regeneratului și lojei recipiente în vederea formării unui regenerat calitativ în regiunea afectată. Utilizarea grefei complexe care conține componentul autocelular sau a celulelor ombilicale asigură o activizare a proceselor de substituție în regiunea inoculării. Stimularea procesului reparativ este indicată în cazul existenței defectelor osoase primare, când procesul decurge lent. Stimularea poate fi utilizată și în cazurile când se prognozează o dereglare a procesului de reparare a osului (fracuri deschise cu defect osos, deperiostări masive etc.), pentru a asigura o osteogeneză relativ normală în regiunea afectată.

Studiul experimental demonstrează că capacitatea osteoinductivă a preparatelor celulare compozite, plasate în defectul osului radial, asigură o osteogeneză activă pe tot traiectul defectului, prin suplینirea totală a defectului osos cu țesut nou-format. La combinarea lor capacitățile osteoconductive și osteoinductive se completează reciproc, asigurând angiogeneza și decurgerea mai reușită a procesului reparativ.

În lotul unde s-a utilizat numai grefă celulară osteomedulară autologică procesul reparativ decurge activ, dar la finele termenului de supraveghere în regiunea de mijloc a regeneratului se determină o depresiune, care reprezintă o persistență a unui defect minor de os.

În cazul defectului critic al osului parietal rezultatele au fost comparative cu cele obținute în celelalte grupe experimentale. Culturile celulare inoculate în regiunea defectului critic al osului parietal la iepure dispun de efecte evidente de inducție a regenerării oaselor craniene, care în mod normal posedă capacități modeste de regenerare.

În mecanismul de acțiune al culturilor celulare utilizate în procesul de regenerare sunt probabile două căi: 1. celulele inoculate stimulează celulele patului matern al recipientului spre diferențiere osteoblastică; 2. încadrarea nemijlocită a celulelor inoculate în procesul de osteogeneză prin proliferare și diferențiere în celulele osteoprogenitoare care la rândul lor se pot diferenția în osteoblaste.

În lotul în care s-a utilizat spongia de collagen cu CMO defectul este suplinit totalmente cu refacerea deplină a osului, cu un grad mai avansat comparativ cu loturile III și IV.

Proliferarea celulelor în țesuturile ce se reînnoiesc este coordonată de diferite mecanisme care acționează la nivel de celulă, țesut și organism. Ele susțin o anumită intensitate de proliferare, diferențiere și eliminare a celulelor care asigură homeostaza, adică constanțele mediului intern al organului. Toate aceste procese sunt strict reglementate în timp și se manifestă prin anumită viteză de parcurgere a etapelor de viață a celulei și numărului de celule care proliferază. Organizarea în timp a activității de proliferare presupune totodată coordonarea procesului de producere a factorilor reglatori ai multiplicării celulelor organismului și a proceselor ce au loc la nivelul ciclului mitotic celular. Ieșirea în masă a celulelor în faza mitotică de proliferare sub acțiunea factorilor reglatori ai mitozei formează un val de proliferare, care

sincronic traversează toate etapele de dezvoltare, asigurând ritmul necesar al mitozelor și apoi diferențierea finală. Acest sistem necesită o reglare perfectă, deoarece cea mai mică dereglare a echilibrului în numărul celulelor proliferative și al celor ce se diferențiază poate conduce la schimbări patologice în structura și funcția organului [19].

Cu toate că actualmente există multiple posibilități de cercetare histochimice, imunologice, imunoenzimatice etc., care permit determinarea moleculelor care influențează procesul de regenerare osoasă, trebuie să ținem cont de faptul că reacțiile chimice în os sunt deseori perturbate de diferiți factori, ceea ce face ca histologia moleculară să fie dificilă sub aspectul interpretării metodologice pentru a determina cascada de reacții chimice, imunologice, care au loc în acest proces de regenerare [23].

Multiplele lucrări care deduc că anumite celule produc anumite substanțe *in vitro* nu înseamnă că aceste celule produc exact aceeași substanță *in vivo*, deci rezultatele obținute experimental *in vitro* nu pot fi automat extrapolate pe ființele vii.

Culturile celulare autologice și alogene au un efect osteostimulator dovedit experimental. Este cunoscută capacitatea autocelulelor osteomedulare de a induce formarea osului la plasarea lor în afara țesuturilor scheletice, inclusiv în camere de difuzie [10]. Cu atât mai mult își manifestă caracteristicile osteoinducției la inocularea în regiunea osului. Inocularea în caz de osteogeneză suprimată activează regenerarea osoasă, stimulând celulele lojei recipiente spre dezvoltare osteogenică. Datorită caracterului de suspensie al culturilor celulare ele nu se mențin toate nemijlocit plasate în locul inoculării, ceea ce face dificilă utilizarea lor în substituția defectelor osoase de dimensiuni mai mari.

Grefele combinate (compozite), osteomatricea demineralizată cu celulele osteomedulare sau ombilico-placentare, fiind o asociere a două grefe cu capacități osteoinducției pronunțate, permit completarea reciprocă a capacităților lor și obținerea unei grefe noi. Această grefă compozită se menține în regiunea inoculării și activează procesul de regenerare stagnat.

Indiferent de metoda utilizată pentru stimularea formării regeneratului osos, succese în această direcție pot fi obținute numai asigurând următoarele condiții de bază:

1. imobilitatea (osteosinteza) stabilă a fragmentelor osoase;
2. alimentarea, vascularizarea suficientă a grefelor; de aceea grosimea transplanturilor corticale nu trebuie să depășească 2 cm;
3. lipsa în alotransplant a elementelor medulare osoase, purtătoare ale unor capacități antigenice pronunțate, care poate provoca reacția gazdă contra transplant, se produce prin demineralizarea și decelularizarea țesuturilor.

Rezultatul clinic al grefării osoase depinde atât de fixarea în lojă, cât și de starea patului-gazdă. Grefa îndeplinește două funcții primordiale – este o sursă de celule osteogenice și reprezintă un suport mecanic.

Autogrefa spongioasă și corticală este implantată proaspătă și dispune de proprietăți osteogenice ca sursă de celule osteoprogenitoare cu efect osteoconductiv și osteoinductiv. Țesutul transplantat induce celulele mezenchimale ale recipientului să se diferențieze în celule osteoblastice. Toate grefele autologice sau alogene se resorb: osul spongios este complet substituit, în timp ce grefa corticală rămâne un amestec de os viu și necrotic pentru o lungă perioadă de timp.

Alogrefele proaspete sunt mai încet și incomplet substituite de osul gazdei, deoarece provoacă un răspuns sistemic imun local și general, care poate deregla procesele osteoinductive și osteoconductive.

Deși grefele congelate și cele liofilizate micșorează răspunsul imun, rata insuccesului rămâne înaltă, deoarece procesele de integrare sunt influențate de vascularizarea și compoziția patului - gazdă, interacțiune între recipient și grefă.

Încorporarea grefelor osoase spongioase se realizează în mai multe etape. Prima etapă depinde de particularitățile patului recipient, care este responsabil într-o măsură sau alta de reușita transplantării, mai bine zis este nevoie de o lojă recipientă viabilă, bine vascularizată. În cazul unui pat recipient prost vascularizat, grefa va fi ca o piesă inertă, care nu se va integra în



organismul-gazdă, nu-și va îndeplini funcția preconizată, cu particularități caracteristice unei proteze.

Porozitatea caracteristică osului spongios face ca suprafața de contact a grefei cu osteoclastele să permită o resorbție mai rapidă a acesteia, eliberarea unei cantități impunătoare de factori de creștere, citochine, ceea ce provoacă o invadare mai rapidă cu celulele predecesorii care stimulează formarea neovaselor. Această situație aduce la rândul său la formarea neosului, care determină încorporarea mai rapidă a acestuia în loja recipientă comparativ cu grefa corticală.

Bineînțeles că integrarea osoasă depinde și de volumul grefei transplantate. Utilizarea alogrefelor masive, integre necesită o perioadă îndelungată pentru refacerea și substituția transplantului cu țesuturile recipientului. Persistă pericolul de rejeț al grefei în caz de răspuns agresiv al sistemului imun al organismului contra ei. În cazurile absenței unei sensibilizări preliminare nu se observă un răspuns imun prompt. Conform datelor prezentate de V. M. Goldberg et al. (1984), se ajunge la revascularizarea grefei în proporție de 50-100% prin inhibiția reacției imune sau absența ei. Mai târziu tromboza parțială a rețelei vasculare capilare poate aduce la resorbție osoasă și formarea țesutului osos nou, care determină integrarea progresivă a grefei în regiunea implantării. *In vitro* s-a observat că aproximativ 75% din suprafața alogrefei trabeculare era acoperită de țesut osos nou-format crescut apozitional, dar numai în cazurile când grefa nu era de dimensiuni mari și când nu se evidenția o reacție imună majoră contra grefei [15].

Este important că într-o greșă masivă pot fi observate diferite faze evolutive ale acesteia în procesul de integrare: zone de regenerat osos nou-format viabil, iar osul în renovare poate fi succedat de zone cu necroză a țesutului osos. În cazurile clinice integrarea alogrefelor masive este mai lentă și mai incompletă comparativ cu loturile experimentale, de exemplu, integrarea unei grefe cotiloidiene are loc în 12-18 luni, având o structură „mozaic” – zone de țesut necrotizat sunt succedate de regenerat osos nou viabil și bine vascularizat [24].

O condiție obligatorie pentru grefele osoase, substituenți osoși o reprezintă nu numai proprietățile mecanice și volumul grefei, dar și capacitatea acesteia de a stimula osteogeneza. Această proprietate este asigurată de existența în grefele respective a elementelor biologice active, morfoinductive – factori ce influențează creativ osteogeneza reparatorie.

La unii pacienți apar devieri reparatorii osoase și în cazul osteosintezei stabile, lucru care se produce fiindcă nu întotdeauna rezervele sistemice și metabolice se includ integral în procesul regenerativ, astfel rămânând rezerve care mai pot fi incluse în acest sistem. Acțiunea benefică asupra procesului regenerativ nu poate fi apreciată drept stimulare, activizare, ci drept crearea unor condiții optime pentru realizarea procesului de regenerare.

Cantitatea impunătoare de grefe osoase necesare în chirurgia reconstructivă motivează cercetările ulterioare pentru găsirea substanțelor sintetice cu capacități regeneratorii apropiate de cele ale osului. Se caută un substrat ideal de substituție a țesutului osos, care implică o bună toleranță a recipientului față de el, fără risc de transmitere a infecției, cu proprietăți mecanice suficiente pentru a suporta presiunea exercitată pe această regiune, o integrare bună în loja osoasă recipientă, servind drept suport pentru a fi înlocuit ulterior de țesut osos propriu de bună calitate. Cu alte cuvinte, este nevoie de un bun osteoconductor.

Coralul este un derivat al coralului nativ, compus din carbonat de calciu cu porozitatea asemănătoare cu cea a osului uman – 100-500  $\mu\text{m}$ , cu bune proprietăți mecanice, mai ales rezistente la compresie. Problemele inflamatorii locale sunt legate de substanțele reziduale rămase în substituent după prelucrare. Ceramizarea coralului permite substituția carbonaților prin fosfatul de calciu, păstrându-i porozitatea inițială. Aceste grefe au fost utilizate și în combinație cu factori de creștere pentru suplinirea defectelor osoase [7].

Preparatul osteomatrix forte, folosit în cercetările noastre anterioare, conține o mare cantitate de matrice osoasă demineralizată și material embrionar. Matricea, după demineralizare, fiind lipsită de substanțe minerale, reprezintă o structură densă de fibre colagenice cu o arhitectonică determinată, care nu-și schimbă esențial structura în procesul preparării. Ea constituie o carcasă excelentă naturală și suport pentru țesuturile regeneratorii, concomitent

păstrându-și capacitățile morfofuncționale specifice. În matricea osoasă demineralizată, de asemenea, se păstrează proteinele morfoinductive și capacitatea lor de a induce osteogeneza [30]. Structura lacunară a matricei osoase demineralizate condiționează îmbibarea ei cu alte substanțe morfoinductive, în cazul nostru cu grefe celulare autologice sau alogene COP.

Preparatul osteomatrix forte reprezintă un material bioplastic tisular combinat sub formă de suspensie, păstrat în soluție de ser fiziologic (0,9% NaCl) sau soluție de trisamină, ce conține particule de os compact demineralizat de la donatori adulți și țesut embrionar osteoid, cartilagos, conjunctiv și osos demineralizat. În clinică materialul a fost utilizat sub formă de osteomatrix forte – pastă și osteomatrix forte – placă.

Grefele compozite, cercetate în lucrarea dată, ca și osteomatrix forte, au proprietăți adezive, depozitându-se în locul administrării. Astfel, biomaterialul acționează nemijlocit asupra focarului patologic.

Transplantarea numai a matricei osoase demineralizate în clinică, în 12% cazuri, s-a finisat cu pseudartroză, ceea ce confirmă necesitatea combinării matricei cu alte materiale bioactive [6].

Conform studiului experimental-comparativ efectuat de noi, capacitățile morfoinductoare ale materialelor compozite sunt mai pronunțate decât ale matricei osoase demineralizate și culturilor celulare utilizate separat. Fiind bogate în elemente morfogenetice care diferă în ambele materiale, la combinarea lor, acțiunea fiecăruia din ele se completează reciproc și efectul stimulator asupra procesului osteogenetic reparator devine mai pronunțat. Rezultatele obținute în experiență pe animale denotă că după 3 săptămâni de la administrarea grefelor compozite în defectul critic al osului radial (os lung), în defectul critic al osului parietal (os plat) și al celui cuboid (os scurt) zona limitrofă cu cea a osului recipientului este invadată de țesut conjunctiv lax și vase sangvine. În jurul acestor particule apar multiple capilare și celule osoase predecesorii, care în ansamblu constituie țesutul osos nou-format. Ulterior, conform procesului evolutiv de resorbție, particulele de material osteomatrix forte vor fi suplinite totalmente cu țesut osos nou-format.

Rezultatele experimentale ne-au convins că anume grefele compozite – grefa celulară bogată în substanțe bioactive, citochine, factori de creștere și suportul lor MOD – sunt optime pentru activizarea procesului osteoreparator stagnat. Regiunea periostală, endostală și țesutul conjunctiv paraosal conțin multiple celule predecesorii, din care se dezvoltă aparatul locomotor și care au un potențial regenerativ vădit, mai ales datorită substanțelor morfogenetice osteoinductive.

Investigațiile radiologice și scintigrafice ale oaselor, executate periodic pentru a supraveghea și aprecia activitatea procesului de regenerare, denotă convingător că procesele osteoinductive evoluează activ la nivelul amplasării grefelor. Astfel, dacă pe scintigrama efectuată până la inoculare acumularea radiofarmaceuticului este diminuată în regiunea afectată, apoi după 2 luni tabloul se schimbă evident prin formarea unei zone de captare intensă a acestui preparat, indicând o vasculogeneză activă la acest nivel.

Caracterul omogen al procesului de osteogeneză în grefele compozite este determinat de faptul că revascularizarea transplanturilor morfoinductive demineralizate cu component celular se desfășoară difuz și uniform între grefă și loja recipientă. Probabil acest proces este favorizat și de consistența laxă a grefei care favorizează creșterea vaselor dinspre osul recipientului în profunzimea defectului. Un rol hotărâtor, desigur, îl are și captarea etanșă a grefoanelor la suprafața defectului osos, fapt care facilitează procesul de vascularizare și regenerare. În consecință, pe toată suprafața grefonului se creează condiții favorabile pentru o regenerare activă, eficientă.

Utilizarea grefelor compozite în pseudartroze ale scafoidului carpian determină păstrarea lungimii și formei scafoidului carpian. Citochinele din grefa celulară și alți factori morfoinductivi secretați de celulele implantate activează procesul de regenerare și de neovascularogeneză, care tocmai favorizează consolidarea acestui os capricios. Din numărul total

de 7 pacienți, în 6 cazuri a fost obținută consolidarea fragmentelor cu rezultate anatomice și funcționale satisfăcătoare.

Metoda de inoculare a grefelor compozite celulare și MOD în tratamentul ortopedic al pseudartrozelor a fost injectarea transcutanată a materialului bioplastic în focarul patologic însoțită de imobilizarea ulterioară a segmentului afectat în aparat ghipsat în cazul când fragmentele nu erau stabilizate prin alte metode sau fixatoare.

Mecanismul de acțiune a celulelor transplantate rămâne în mare măsură neelucidat până la sfârșit și, deseori, folosirea practică a metodei anticipează argumentarea științifică.

S-a observat că după transplantarea celulară se activează proliferarea celulelor lojei recipiente și restabilirea parțială sau integrală a structurii și funcției organului. Acțiunea morfoinductivă este argumentată prin eliminarea citochinelor de către celulele transplantate și interacțiunea intercelulară cu celulele-gazdă. Totodată, celulele embrionare de la donator formează colonii în organele afectate ale recipientului și, proliferând, înlocuiesc celulele deteriorate ale organismului, formând țesut funcțional morfologic corespunzător regiunii afectate [13, 18, 20].

Este încă în curs de apreciere a durată de timp în care acționează grefa celulară după transplantare. Totodată sunt păreri diverse referitoare la eficacitatea folosirii factorilor de creștere sau a grefelor celulare. Se consideră că la utilizarea BMP pentru tratamentul întârzierilor de consolidare efectul optimal se obține după patru luni de la inoculare. Studiul efectuat de noi a confirmat că la utilizarea grefelor celulare durată activă a procesului este aproximativ de 2-3 luni, dacă până la trei luni nu apar semne de activizare a procesului de regenerare, este necesară o grefare repetată cu celule sau utilizarea unei alte metode de tratament.

Tehnologia ingineriei tisulare și celulare include mai multe etape:

1. obținerea materialului autologic destinat separării din el a celulelor mezenchimale necesare pentru transplantare;
2. cultivarea celulelor *in vitro* pentru obținerea cantității necesare de celule și diferențierea lor în direcția respectivă prin utilizarea factorilor de creștere;
3. alegerea suportului adecvat, spongie sau șablon care servește drept matrice pentru celule și le permite să crească în direcția necesară;
4. transplantarea celulelor sau materialului mixt (compozit) fără risc de rejeț al grefei.

Ingineria tisulară combină discipline cum ar fi biologia, știința materialelor, inginerie și medicină care are ca scop elaborarea de noi materiale și terapii pentru tratamentul maladiilor sau al țesuturilor deteriorate (os, cartilaj, malformații cardiace, vasculare, nervi periferici, ficat, pancreas).

Ingineria osoasă: osul este un organ al suportului, asigurării funcției normale a organismului și este al doilea, cel mai frecvent, organ supus transplantării după transfuziile de sânge. Contactul intercelular: atunci când interfața biomimetică poate stimula biochimia matricei extracelulare, iar stimulii mecanici pot transporta nutrienți și stimula secreția diversilor factori autocrini sau paracrini proprii funcționării normale a anumitor celule (cardiomiocite, hepatocite, osteoblaste și celule endoteliale), este necesară o interactivitate directă celulă-celulă prin intermediul proteinelor *caderin* și *connexin*. Rolul *caderin*ului este de a mediatiza un contact mecanic robust intercelular, care poate susține formarea de joncțiuni gap. Aceste conexiuni permit un transport rapid de semnale așa ca valvele de calciu care sincronizează contracția mușchiului cardiac. Rolul joncțiunilor gap în țesuturi este actualmente necunoscut, dar se consideră a fi important în reglarea depozitării mineralului în matricea osoasă (țesutul osos conține 99% din totalul de calciu al organismului, 85% din totalul de fosfor și 40-60% din totalul de sodiu și magneziu).

Folosind celule stem mezenchimale de iepure, îmbibate în suport din polimer și transduse cu un vector retroviral codat pentru gena marker lacZ, celule β-lactoz pozitive au fost depistate pe durată de opt săptămâni după implantare în defecte osteocondrale ale femurului. Într-un experiment *ex-vivo*, Grande și coautorii au folosit celule proprii de periost, transduse retroviral cu BMP-7, pentru a repara defecte osteocondrale la iepuri. O reconstrucție rapidă a osului

subcondral cu țesut asemănător hialinei a fost detectată în exemplare implantate cu celule transduse de periost [16].

În ingineria tisulară sunt utilizate două strategii de bază:

- creșterea celulelor *in vitro* pe transplant;
- implantarea matricei și regenerarea (umplerea) cu celulele-gazdă.

Biofuncționalitatea unui material este în funcție de capacitatea lui de reacție și integrare în regiunea recipientă a organismului.

Modestele cercetări experimentale și clinice elucidate în această lucrare nu pretind la soluționarea multiplelor aspecte ale acestei probleme apărute în ultimele decenii. Ne dăm bine seama că multe întrebări mai necesită cercetare, aprofundare, mai ales în plan experimental, până când terapia celulară va deveni o metodă acceptabilă în tratamentul nu numai al consecințelor traumatismelor, dar și al altor maladii ale corpului uman. După părerea noastră, evoluția cercetărilor ulterioare trebuie să fie realizată prin următoarele căi: 1) determinarea mecanismului de acțiune a celulelor transplantate la inocularea în organism, acțiunea lor asupra țesuturilor adiacente și a organismului în întregime; 2) modalitatea optimă de administrare a grefelor celulare – intravenoasă, intraoasă, locală etc.; 3) aprecierea cantității de celule necesare pentru transplantare în diferite maladii, frecvența inoculării și intervalul de timp necesar între ele; 4) stabilirea grefelor celulare optime, care să fie utilizate în tratamentul diferitor maladii, și a gradului de diferențiere; 5) obținerea unui grad înalt de securitate în transplantare – excluderea posibilităților de transmitere a maladiilor hematotransmisibile, evitarea răspunsului imun sever și securitatea oncogenă; 6) determinarea maladiilor, în care transplantarea celulară este necesară și are pondere semnificativă în tratament; stabilirea indicațiilor și a contraindicațiilor.

Rezultatele studiului experimental pe animale, practica noastră în utilizarea biopreparatelor compozite celulare autologice și alogene în tratamentul pacienților cu deficiențe osoase ne permit să constatăm că aceste grefe posedă proprietăți osteoinductive înalte.

Dezvoltarea biotehnologiilor, biologiei moleculare și celulare a fost și este influențată de transplantarea celulară, actualmente fiind una dintre disciplinele biologiei și medicinei care cunoaște o dezvoltare foarte intensivă. Acest curent își găsește reflectarea și în tratamentul diferitor afecțiuni ale aparatului locomotor.

În acest sens este extrem de importantă nu numai posibilitatea pacienților traumatizați de a-și relua cât mai curând activitatea, ceea ce are un impact economic considerabil asupra societății, dar și starea emoțională, mentală echilibrată a omului. Viitorul apropiat va fi dedicat cercetărilor ce se referă la grefe morfoinductive în direcțiile de studiu al utilizării celulelor stem; transferul genic și găsirea de suport pentru substanțele biologice active – structuri tridimensionale bioabsorbabile.

Multitudinea preparatelor bioplastice propuse pentru ameliorarea regenerării osoase reflectă starea actuală a lucrurilor: până în prezent nu există o grefă unanim acceptată, care ar satisface cerințele medicinei. Pe lângă anumite avantaje, fiecare din aceste metode comportă și deficiențe.

Probabil, transplantarea celulară are avantaje în raport cu terapia genică și cea peptidică, din considerente că celulele au o acțiune mai fină asupra țesuturilor. Celula este cea care dispune de proprietatea de a controla nivelul optimal necesar al factorilor de creștere pe care-i secretă pentru a acționa în focarul patologic [4].

Ingineria tisulară este viitorul științei medicale și baza medicinei regenerative. Confirmarea experimentală a imunogenității scăzute a celulelor stem embrionare deschide o largă perspectivă în utilizarea lor pentru transplantare [26].

Cercetările de viitor vor stabili combinația perfectă între suporturi, matrice, celule și factori de creștere, pentru a repara osul și cartilajul articular. Combinarea tehnicilor de transfer genic și inginerie tisulară este o strategie promițătoare pentru tratamentul leziunilor osteocondrale. Transferul genic în celule condrogene se bazează pe nivelul crescut de factori de creștere, care poate fi atins prin expresia transgenică *in situ*.

Maladiile degenerative osteoarticulare, tind să ocupe primul loc la nivel mondial în dizabilitatea motorie și durere. Creșterea longevității populației reprezintă unul dintre motivele pentru care afecțiunile musculo-scheletale măresc an de an costurile sistemelor de sanatate.

### Concluzii

Medicina regenerativă ofera oportunitatea tratării unor afecțiuni traumatice sau degenerative, evitând evoluția invalidantă. Dezvoltarea acestui domeniu poate avea un efect economico-sociale regional.

Dezvoltarea cadrului legal și susținerea financiară a cercetării, în domeniul terapiei celulare și ingineriei tisulare, formarea de specialiști în domeniu, sunt condiții absolut necesare pentru implementarea acestor tehnologii în medicina mileniului.

Aceste cercetări au fost efectuate cu suportul financiar obținut în cadrul proiectul instituțional 06.420.049A și granturile 09.819.09.02F; 08.819.09.01F.

### Bibliografie

- 1) Abbott A. Biology's New Dimension. 2003, Nature 424: p. 870–872.
- 2) Augustin G., Antabak A., Davila S., The periosteum. Part 1: Anatomy, histology and molecular biology, *Injury* 38 (2007), pp. 1115–1130
- 3) Baciuc C. Aparatul locomotor. Edit. Medicală, București, 1981, p.602
- 4) Benekli M., Anderson B., Wentling D. et al. Severe respiratory depression after dimethylsulphoxide – containing autologous stem cell infusion in a patient with AL amyloidosis. *Bone Marrow Transplant* 2000; 25/12, p. 1299.
- 5) Blair H.C., Zaidi M., Schlesinger P.H. Mechanisms balancing skeletal matrix synthesis and degradation. *Biochem J* 2002;364:329–341.
- 6) Bolander M.E. Balian G. The Use of Demineralised Bone Matrix in the Repair of segmental Defects. Augmentation with extracted matrix proteins and a comparison with autologous grafts. *The Journal of Bone and Joint Surgery* 1986. Vol.68-A N 8 October.p.1264-1275.
- 7) Bucholz R.W, Carlton A., Holmes R.E. Interporous hydroxyapatite as a bone graft substitute in tibial plateau fractures. *Clin Orthop. Related Results* 1989; 240, p. 53-62.
- 8) Buttery L.D., Bourne S., Xynos J.D., et al. Differentiation of osteoblasts and *in vitro* bone formation from murine embryonic stem cells. *Tissue Eng*, (2001) 7:p. 89–99.
- 9) Chen F., Chen S., Tao K. et al. Marrow-derived osteoblasts seeded into porous natural coral to prefabricate a vascularised bone graft in the shape of a human mandibular ramus : experimental study in rabbits. *Br. J.Oral. Maxillofac. Surg.* 2004. Vol. 42, 6. p. 532-537.
- 10) Ciobotaru A., Alogrefe umane și ingineria tisulară în tratamentul chirurgical al malformațiilor cardiace congenitale, *Curierul medical*, Nr 6(282), p. 51-54
- 11) Farge D. Les greffes. *Traité de Médecine* 4 edition, Paris, 2004, p.3086-3145
- 12) French A., Wood S. & Trounson A. Human therapeutic cloning (NTSC): Applying research from mammalian reproductive cloning. *Stem Cell Reviewers*, 2006 Dec ;2 (4):p. 265-276
- 13) Faulkner A., Geesink I., Kent J., Fitzpatrick D., Human tissue engineered products, drugs or devices?, *BMJ* 200, 326: p.1159-1160
- 14) Giannoudis P. V., Einhorn T. A., Marsh D. Fracture healing: the diamond concept. *Injury* 2007 (Sep); 38(Suppl 4): p. 3–6
- 15) Gouin F., Delecrin J., Passuti N. et al. Compléments osseux par ceramique phosphocalcic biphasse macroporeuse. A propose de 23 cas. *Rev Chir Orthop* 1995, 81, p. 59-65
- 16) Grade D., Sindh I., Pugh J. Healing of experimentally produced lesion in articular cartilage following chondrocyte transplantation. *Anat. Rec.*, 1987, Vol. 218, № 2, p. 142-148.
- 17) Jilka R. L. Molecular and cellular mechanisms of the anabolic effect of intermittent PTH. *Bone* Volume 40, Issue 6, June 2007, p. 1434-1446.
- 18) Kaplan J.-C., Deplech M. Biologie moléculaire et médecine. *Medecine –Sciences*, Flammarion, Paris, 2007, 815p.
- 19) Kuh S.U., Cho Y.E., Yoon D.H. et al. Functional recovery after human umbilical cord blood

- cells transplantation with brain-derived neurotrophic factor into the spinal cord injured rat. *Acta Neurochir. (Wien)* 2005, 147: p.985-992.
- 20) Lee R.H., Kim B., Choi I. *et al.*, Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue, *Cell Physiol Biochem* 14 (2004), pp. 311–324.
  - 21) Luyten F.P., Del’Accio F., Bari C., Skeletal tissue engineering, opportunities and challenges. *Best Practice and Research, Clin. Rheumatology*, Vol 15, No. 5, 759-770, 2001
  - 22) Mageed A.S., Pietryga D.W., DeHeer D.H. *et al.*, Isolation of large numbers of mesenchymal stem cells from the washings of bone marrow collection bags: characterization of fresh mesenchymal stem cells, *Transplantation* 83 (2007), p. 1019–1026.
  - 23) Maillet M., *Biologie cellulaire*, Masson, Paris, 2002, p.10-31.
  - 24) Masquelet Alain-Charles *Chirurgie orthopédique*. Paris, 2004, pp. 69-79; 219-253; 363-369.
  - 25) PHILLIPS A. T. M., BROWN D. T., ORAM T. Z., HOWIE C. R., USMANI A. S. The elastic properties of morsellised cortico-cancellous bone graft are dependent on its prior loading, *Journal of biomechanics* 2006, vol. 39, Nr.8, p.1517-1526.
  - 26) Popescu Negreanu T. Utilizarea bioceramicilor și materialelor compozit pe bază de biovitroceramică și colagen în ortopedie. *Revista de ortopedie și traumatologie* Vol.11, 2001, nr. 1-2. p. 3 - 13.
  - 27) Theoleyre S., Wittrant Y., Tat S. K. *et al.* The molecular triad OPG/RANK/RANKL: Involvement in the orchestration of pathophysiological bone remodeling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2004;15: p. 457–475.
  - 28) Trueta J. Blood supply and the rate of healing of tibial fractures. *Clin Orthoped Related Research*, 1974, 105: p. 11 – 26.
  - 29) Топор Б. М. Комбинированные пластические материалы из костного матрикса и эмбриональных тканей. Дис. Д-ра хабилитата мед.наук. – М., 1991, 354 с.
  - 30) Фриденштейн А. Я., Лалыкина К. С. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники. *М. Медицина*, 1973, - 224 с.

**CERCETAREA COMPATIBILITĂII BIOLOGICE ȘI PROPRIETĂȚILOR  
FUNCȚIONALE A IMPLANTELOR DIN MATERIALE MODERNE PE BAZĂ DE  
ALIAJE DIN TITAN**

**Gheorghe Croitor, Nacu Viorel, Alexandru Bețîșor, Roman Croitor**

Catedra Traumatologie, ortopedie și chirurgia de campanie, Catedra de anatomie topografică și  
chirurgie operatorie USMF „Nicolae Testemițanu”

**Summary**

*The research of biocompatibility and functional properties of implants  
from modern materials made from titanium alloys*

Our study established the biocompatibility of the nitinol implants in the embryonic cultures, for the first time. On the basis of the positive result obtained, the morphological changes in living tissues and bones at their contact region with the implants have been determined. Thus any presence of citotoxicity and of the negative effect upon reparatory osteogenesis was not detected. Our next step was to determine the anthropometric and physicommechanical properties of the coraco-clavicular ligaments in fresh cadavers. Finally, we suggested a brand new nitinol implant having similar to coraco-clavicular ligaments properties. Our innovation has been patented.

**Rezumat**

În acest studiu pentru prima dată a fost determinată biocompatibilitatea implantelor de nitinol cu ajutorul culturilor celulare embrionare. Obținînd un rezultat pozitiv, s-a efectuat