

Invenția se referă la medicina regenerativă și ingineria tisulară, și poate fi utilizată pentru restabilirea defectelor osteocondrale.

Este cunoscută utilizarea grefei osteocartilaginoase perforate pe toată lungimea [1].

Dezavantajul grefei cunoscute constă în aceea că osul prezent în grefă nu este demineralizat, cartilajul nu este decelularizat și conține puține orificii perforate pe toată lungimea, ceea ce face imposibilă îmbogățirea normală a grefei cu celule condroprogenitoare, nu se asigură pătrunderea bună a celulelor-gazdă și vaselor sangvine în grefă. Aceasta în final se soldează cu integrarea parțială sau lipsa integrării grefei.

Un alt tip de grefă utilizată cu același scop este țesutul osteocondral demineralizat [2]. Dezavantajul grefei cunoscute constă în aceea că cartilajul prezent nu este decelularizat, se păstrează celule care pot fi vizualizate la o eventuală scanare microelectronică sau examen histologic. Astfel, în această grefă mai este prezent material genetic alo- sau xenogen care poate duce la rejetele transplantului și fibrozarea acestuia.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în obținerea unei grefe osteocondrale alo- sau xenogene demineralizate, decelularizate și perforate pe toată lungimea care permite o integrare mai bună a țesutului în organismul-gazdă, fără risc de rejeț al transplantului. De asemenea, datorită perforării grefei pe toată lungimea crește posibilitatea de îmbogățire mai uniformă a transplantului cu celule condroprogenitoare, totodată prezintă o suprafața de contact mai mare pentru celulele-gazdă și vasele sangvine, aceasta în final asigurând o integrare mai rapidă a transplantului.

Conform invenției, grefa pentru restabilirea defectului osteocondral include cartilaj decelularizat, os subcondral și os spongios demineralizate. Grefa poate fi de origine alo- sau xenogenă, are o formă regulată sau neregulată cu înălțimea de 4...20 mm și diametrul de 3...30 mm, totodată prin toate straturile grefei sunt perforate multiple canale longitudinale străpuse paralele cu diametrul de 50...800  $\mu$ m.

Avantajele grefei revendicate constau în aceea că aceasta poate fi alo- sau xenogenă, cu capacitate rapidă de integrare în țesutul-gazdă și risc minim de rejeț datorită cartilajului decelularizat. Poate fi utilizată atât cu celule condroprogenitoare cât și fără, asigură o suprafață de contact mai mare cu celulele gazdei și o pătrundere mai bună a vaselor sangvine.

Rezultatul constă în aceea că respectiva metodă: eficientă, sigură, calitativă și economică permite obținerea unei grefe osteocondrale ce poate fi utilizată cu scop de reparare a defectului de țesut cartilajinos sau osteocondral.

Modelul grefei de formă cilindrică cu repartizare uniformă și densă a canalelor este ilustrat în fig. 1, iar fig. 2 reprezintă o grefă de formă cuboidă cu repartizare neuniformă a canalelor și cu o densitate mică a lor, în care: a - orificii perforate pe suprafața cartilajului; b - canale paralele care străbat grefa pe toată lungimea; c - cartilaj articular decelularizat; d - os subcondral demineralizat; e - os spongios demineralizat.

Procedeele de obținere a grefei osteocondrale perforate demineralizate și decelularizate constă în demineralizarea țesutului osteocondral în HCl (Болтрукевич С.И., Богданович И. П., Калугин А.В., Першукевич А.В., Чешик С.Л. Заготовка, хранение трупного материала для консервации, МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ, Гродно, 2000), după care se spală în  $H_2O_2$ , timp de 8...24 ore, cu schimbarea soluției de 3...4 ori, apoi timp de 60...90 min în ser fiziologic sau apă distilată cu schimbarea soluției de 3...4 ori. La necesitate, cu un instrument se secționează din țesutul osteocondral demineralizat o porțiune de dimensiunea dorită, după care grefa se supune desecării prin centrifugare timp de 5...20 min. Grefa se perforază pe toată lungimea, de la cartilaj până la osul spongios, cu un ac având grosimea de la 50 până la 800  $\mu$ m. În final suprafața articulară trebuie să aibă aspect de sită, de densitatea dorită și cu repartizare uniformă sau neuniformă a canalelor. Cu scop de decelularizare a cartilajului, grefa se introduce pentru 3...4 zile în soluție de sodiu duodecil sulfat (SDS). După decelularizare grefa se spală de 3 ori în ser fiziologic a câte 30...120 min. Grefa poate fi ulterior liofilizată și sterilizată cu raze gama sau se supune desecării prin centrifugare la 4000 rpm și se sterilizează prin metode medicamentoase sau chimice, cu păstrarea ulterioară în criocongelator. Înainte de utilizare grefa se introduce în ser fiziologic sau într-un mediu de nutriție pentru 5...15 min, după care se supune desecării prin centrifugare la 1000...4000 rpm, timp de 5...10 min. În timpul preparării grefei se admite utilizarea băștelor ultrasonore sau a vibratoarelor cu scop de a stimula procesul de spălare, demineralizare sau decelularizare.

#### *Exemplul 1*

După demineralizarea țesutului osteocondral, acesta se spală în  $H_2O_2$ , timp de 16 ore, cu schimbarea soluției de 3 ori, apoi timp de 60 min în ser fiziologic cu schimbarea soluției de 4 ori. Cu o trefină se secționează din țesutul osteocondral demineralizat o porțiune de 3,7 mm în diametru cu lungimea de 4 mm, care se supune desecării prin centrifugare la 4000 rpm timp de 5 min. După desecare cu un ac cu diametrul de 600  $\mu$ m se perforază 32 de canale ce trec paralel pe toată lungimea grefei de la cartilaj până la osul spongios cu o dispunere uniformă și densă a orificiilor pe suprafața cartilajului articular. Grefa se introduce în soluție SDS 0,5% pentru 3 zile la temperatura camerei cu schimbarea zilnică a soluției. După extragerea din SDS, grefa se spală de 3 ori cu ser fiziologic timp de 90 min fiecare. Apoi grefa se supune desecării la 4000 rpm, timp de 5 min, după care timp de 24 ore se decontaminează în soluție medicamentoasă. Ulterior grefa este preluată în condiții sterile și spălată timp de 60 min în ser fiziologic, după care se supune desecării la 4000 rpm 5 min și se criocongelează la temperatura de -84°C. Înainte de utilizare grefa se introduce într-un mediu de nutriție pentru 5 min, după care se supune desecării prin centrifugare la 4000 rpm, timp de 5 min.

*Exemplul 2*

După demineralizarea țesutului osteocondral de formă cuboidă cu dimensiunile de 10x10x20 mm, acesta se spală în H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, timp de 24 ore, cu schimbarea soluției de 3 ori, apoi timp de 90 min în ser fiziologic cu schimbarea soluției de 4 ori. Ulterior, grefa se supune desecării prin centrifugare la 4000 rpm, timp de 10 min. După desecare cu un ac cu diametrul de 300 μm s-au perforat 200 de canale ce trec paralel prin toată lungimea grefei de la cartilaj până la osul spongios, orificiile canalelor au o densitate mică și sunt dispuse neuniform pe suprafața cartilajului. Grefa se introduce în soluție SDS 0,5% pentru 3 zile la temperatura camerei cu schimbarea zilnică a soluției. După extragerea din SDS, grefa se spală de 3 ori cu ser fiziologic timp de 90 min fiecare, ulterior se supune desecării la 4000 rpm timp de 5 min. Apoi grefa se decontaminează cu soluție medicamentoasă timp de 24 ore. Grefa este preluată în condiții sterile și spălată timp de 60 de min în ser fiziologic, după care este desecată prin centrifugare la 4000 rpm 10 min și criocongelată la temperatura de -84°C. Înainte de utilizare grefa se introduce într-un mediu de nutriție pentru 10 min, apoi se supune desecării prin centrifugare la 2000 rpm, timp de 5 min.

Astfel de grefe au fost utilizate în Laboratorul de Inginerie Tissulară și Culturi Celulare pentru tratarea defectelor osteocondrale pe 16 modele animale cu rezultate mai bune comparativ cu lotul martor, unde au fost utilizate grefe osteocondrale alogene native.