

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
„CAROL DAVILA”, BUCUREȘTI
ȘCOALA DOCTORALĂ
MEDICINĂ**



*Optimizarea procesului de regenerare osteocondrală a
genunchiului, prin utilizarea unor noi materiale compozite
pe bază de collagen, hidroxiapatită și cheratină*

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Conducător de doctorat:

Prof. Univ. Dr. BARBILIAN Adrian Gheorghe

Student-doctorand:

DR.POPESCU FLORIN

2025

CUPRINSUL TEZEI DE DOCTORAT

INTRODUCERE	10
I. PARTEA GENERALĂ - STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	14
1. TRATAMENTUL DEFECTELOR OSTEOCONDRALE: CONSIDERAȚII GENERALE, CLASIFICARE, METODE DE RECONSTRUCȚIE ȘI COMPATIBILITATEA BIOLOGICĂ A IMPLANTURILOR.....	15
Preambul.....	15
1.1. Fundamente anatomice, fiziologice și embriologice.....	16
1.1.1. Anatomia cartilajului articular și a osului subcondral.....	16
1.1.2. Fiziologia cartilajului articular și a osului subcondral	17
1.1.3. Embriologia articulației genunchiului.....	18
1.2. Etiopatogenia defectelor osteocondrale ale genunchiului	19
1.2.1. Clasificarea defectelor osteocondrale	19
1.2.1.1. După profunzime (condral, osteocondral, osteoparticular)	19
1.2.1.2. După localizare (genunchi, gleznă, alte localizări).....	20
1.2.1.3. După etiologie.....	20
1.2.1.4. După clasificări standardizate: ICRS, OUTERBRIDGE, ANDERSON	22
1.3. Osteocondrita disecantă (OCD)	23
1.4. Etiopatogenia defectelor osteocondrale ale genunchiului	25
1.4.1. Factori de risc de mediu.....	25
1.4.2. Factori anatomici și biomecanici	25
1.4.3. Factori hormonalți	27
1.4.4. Factori de risc genetici, ereditari	27
1.5. Diagnosticul leziunilor osteocondrale.....	28
1.5.1. Anamneză și examen clinic	28
1.5.2. Diagnosticul diferențial.....	29
1.5.3. Diagnosticul imagistic	30
1.6. Istoricul natural.....	32
1.7. Principii de tratament ale defectelor osteocondrale	34
1.7.1. Tratamentul conservator	34
1.7.2. Tratamentul chirurgical.....	36
1.7.2.1. Tehnici chirurgicale clasice	37
1.7.2.1.1. Condroplastia și metode de debridare	37
1.7.2.1.2. Microfractura și variantele moderne	38
1.7.2.1.3. Fixarea fragmentului	39

1.7.2.2.	Tehnici reconstructive osteocondrale	41
1.7.2.2.1.	Autogrefe osteocondrale (OAT/mozaicplastia)	41
1.7.2.2.2.	Transplantul de alogrefă osteocondrală (OCA)	46
1.8.	Tehnici celulare și regenerative.....	50
1.8.1.	Implantare condrocitelor autologe (ACI/MACI).....	50
1.8.2.	Condrogeneza indusă de matrici autologe AMIC.....	52
1.9.	Compozite biocompatibile.....	53
1.10.	Inovații emergente	54
1.10.1.	Imprimarea 3D personalizată.....	54
1.10.2.	Terapiile biologice cu celule stem.....	54
1.10.3.	Biotehnologii avansate	55
1.11.	Tehnici chirurgicale specifice și principii de recuperare și tratament.....	55
1.11.1.	Abordarea artroscopică vs. deschisă	55
1.11.2.	Plasarea și integrarea grefei osteocondrale	57
1.11.3.	Fixarea grefei osteocondrale	57
1.11.3.1.	Fixarea cu șuruburi de interferență.....	57
1.11.3.2.	Fixarea cu pini bioabsorbabili	59
1.11.3.3.	Configurații complexe de fixare	60
1.11.4.	Reabilitarea după intervenția de reconstrucție a defectelor osteocondrale.....	60
1.11.4.1.	Principii și etape ale reabilitării	60
1.11.4.2.	Instrumente de evaluare funcțională postoperatorie.....	61
1.12.	Complicațiile chirurgiei defectelor osteocondrale	62
1.12.1.	Factori de risc pentru apariția complicațiilor	62
1.12.2.	Clasificarea complicațiilor	62
1.12.3.	Pierderea sau limitarea mobilității articulare	63
1.12.4.	Tromboza venoasă profundă și embolia pulmonară.....	64
1.12.5.	Infecțiile postoperatorii.....	65
1.13.	Chirurgia de revizie a defectelor osteocondrale	65
1.13.1.	Considerații tehnice în chirurgia de revizie osteocondrală artroscopică.....	67
1.13.2.	Evaluarea rezultatelor după chirurgia de revizie.....	68
1.14.	Perspective actuale și direcții viitoare în regenerarea osteocondrală.....	69
1.14.1.	Limitările tratamentelor actuale	69
1.14.2.	Biomaterialele compozite - soluții emergente.....	72
1.14.2.1.	Rolul hidroxiapatitei și al derivaților săi în regenerarea osteocondrală.....	74
1.14.2.2.	Colagenul - suport structural și biologic integrator	77

1.14.2.3.	Cheratina - proteină structurală emergentă cu valențe regenerative.....	79
1.15.	Model experimental de evaluare preclinică a biomaterialelor compozite	80
1.16.	Concluzii și direcții viitoare	81
II.	PARTEA SPECIALĂ - CONTRIBUȚII PERSONALE	83
1.	Scopul și obiectivele studiului.....	84
1.1.	Preambul	84
1.2.	Scopul studiului	84
1.3.	Obiectivele studiului	86
1.	Dezvoltarea Noilor Materiale Compozite pe bază de Colagen, Hidroxiapatită și Cheratină	89
1.1.	Introducere.....	89
1.2.	Materiale și metode.....	90
1.2.1.	Obținerea biocompozitelor	90
1.2.1.1.	Materiale utilizate: cheratină, hidroxiapatită, colagen.....	90
1.2.1.2.	Caracterizarea morfologică a materialelor precursorare, prin microscopie electronică de baleiaj (SEM).....	91
1.2.1.3.	Etapele de obținere a compozitelor	92
1.2.1.3.1.	Reticularea chimică	93
1.2.1.3.2.	Liofilizarea	93
1.2.1.3.3.	Obținerea și pregătirea finală a materialelor compozite.....	93
1.2.2.	Caracterizare fizico-chimică a compozitelor.....	95
1.2.2.1.	Absorbția de apă a biocompozitelor	95
1.2.2.2.	1.2.2.2. Stabilitatea biologică a biocompozitelor	95
1.2.2.3.	Microscopia electronică de baleiaj (SEM) a biocompozitelor - descrierea morfologică preliminară.....	95
1.2.2.4.	Spectroscopia în infraroșu (FTIR).....	96
1.2.2.5.	Spectroscopia Raman în stare uscată.....	97
1.2.3.	Caracterizarea biologică	97
1.2.3.1.	Evaluare pe culturi de celule	97
1.2.3.2.	Evaluarea viabilității prin XTT.....	99
1.2.3.3.	Evaluarea capacității biocompozitelor de a sprijini colonizarea si diferențierea MSC-urilor.....	100
1.2.3.4.	Colorare prin imunofluorescență (IF).....	101
1.2.4.	Analiză statistică.....	101
1.3.	Rezultate și discuții.....	102
1.3.1.	Caracterizarea morfologică a componentelor individuale (hidroxiapatită și cheratină) și a amestecului acestora prin microscopie electronică de baleiaj (SEM)	102
1.3.1.1.	Hidroxiapatită (HA).....	103

1.3.1.2.	Cheratină.....	104
1.3.1.3.	Amestec hidroxiapatită-cheratină (1:1 v/v).....	106
1.3.1.4.	Analiza morfometrică și interpretare statistică a datelor SEM.....	107
1.3.2.	Caracterizare fizico-chimică a compozitelor.....	108
1.3.2.1.	Absorbția de apă a compozitelor	108
1.3.2.2.	Stabilitatea biologică a compozitelor	109
1.3.2.3.	Microscopia electronică de baleiaj (SEM) a compozitelor - descrierea morfologică preliminară.....	110
1.3.2.4.	Spectroscopia în infraroșu (FTIR).....	113
1.3.2.5.	Spectroscopia Raman in stare uscată.....	114
1.3.3.	Caracterizarea biologică.....	115
1.3.3.1.	Evaluarea viabilității prin XTT.....	116
1.3.3.2.	Evaluarea capacității biocompozitelor de a sprijini colonizarea si diferențierea MSC-urilor.....	116
1.3.4.	Discuții	120
1.4.	Concluzii.....	121
2.	Evaluarea in Vivo a Compozitelor Obținute din Colagen, Hidroxiapatită și Cheratină, pe Modelul Experimental Animal	123
2.1.	Introducere.....	123
2.2.	Materiale și metode.....	126
2.2.1.	Selecția materialelor compozite testate.....	126
2.2.2.	Modelul experimental animal.....	127
2.2.3.	Protocol chirurgical și monitorizarea postoperatorie	129
2.2.4.	Examenul radiologic	130
2.2.5.	Evaluarea histologică	130
2.2.6.	Analiza statistică.....	131
2.3.	Rezultate și discuții.....	131
2.3.1.	Monitorizarea greutății.....	131
2.3.2.	Rezultate radiologice.....	132
2.3.3.	Rezultate histologice.....	140
2.3.4.	Corelări imagistic-histologice.....	146
2.4.	Discuții.....	148
2.5.	Concluzii.....	149
3.	EVALUAREA CONVERGENTĂ IMUNOLOGICĂ, HISTOLOGICĂ ȘI IMAGISTICĂ IN VIVO A COMPOZITELOR.....	152
3.1.	Introducere.....	152
3.2.	Materiale și metode.....	154
3.2.1.	Justificarea designului experimental	154
3.2.2.	Modelul experimental animal.....	155

3.2.3.	Etapele-cheie și raționamentul fiecărei metode.....	155
3.2.3.1.	Testele preoperatorii	155
3.2.3.2.	Teste preoperatorii de obiectivare prin spectroscopie FTIR	156
3.2.3.3.	Teste preoperatorii de obiectivare prin spectroscopie RAMAN	157
3.2.4.	Protocol chirurgical.....	158
3.2.5.	Testele postoperatorii	159
3.2.5.1.	Monitorizarea greutateii	159
3.2.5.2.	Teste postoperatorii: analiza serologică in vivo a markerilor serici inflamatori și osteogenici	160
3.2.5.3.	Evaluări imagistice	161
3.2.5.3.1.	Examenul Radiologic	161
3.2.5.3.2.	Examenul Micro-CT.....	162
3.2.5.4.	Evaluare histologică	163
3.2.6.	Analiza statistică.....	164
3.2.7.	Cronologia intervențiilor experimentale	165
3.3.	Rezultate.....	166
3.3.1.	Monitorizarea greutateii.....	166
3.3.2.	Teste preoperatorii	169
3.3.2.1.	Hemocompatibilitatea In Vitro	169
3.3.2.2.	Profilul Inflamator In Vitro.....	169
3.3.2.3.	Teste preoperatorii de obiectivare prin spectroscopie RAMAN	171
3.3.3.	Teste postoperatorii serologice: analiza serologică in vivo, a markerilor serici, inflamatori și osteogenic	173
3.3.4.	Rezultate imagistice.....	176
3.3.4.1.	Rezultate radiologice	176
3.3.4.2.	Rezultate Micro-CT.....	181
3.3.5.	Rezultate histologice.....	188
3.4.	Discuții.....	194
3.5.	Concluzii.....	203
	Concluziile generale ale părții speciale.....	205
	Bibliografie.....	212

1. Scopul și obiectivele studiului

1. Problema fundamentală a cercetării:

Defectele osteocondrale ale genunchiului, care implică concomitent cartilajul articular și osul subcondral, constituie o provocare complexă în ortopedie și medicina sportivă, având un impact semnificativ asupra funcționalității articulare și calității vieții pacienților(1,2). Aceste leziuni se pot dezvolta ca urmare a traumelor, proceselor degenerative (precum osteoartrita) sau a malformațiilor congenitale și pot evolua rapid către degenerare articulară severă, în special în cazul articulațiilor portante(3,4). Lipsa unor soluții biomateriale eficiente și clinic translabile impune necesitatea unor noi strategii regenerative care să vizeze refacerea sinergică a cartilajului și a osului subcondral(5,6).

2. Ipoteza de cercetare:

Se presupune că dezvoltarea unor compozite biomimetice inovatoare, bazate pe collagen (COL), hidroxiapatită (HA) și cheratină (CHER/K), poate duce la obținerea unor materiale capabile să susțină eficient regenerarea tridimensională a unității osteocondrale(7,8). Prin îmbinarea proprietăților osteoconductive ale hidroxiapatitei, capacității structurale și imunomodulatoare ale cheratinei, și biocompatibilității collagenului, ipoteza centrală este că aceste compozite pot stimula diferențierea celulară, integrarea tisulară și regenerarea osteo-cartilaginoasă eficientă(9,10).

3. Obiectivele cercetării:

Obiectivele cercetării au vizat obținerea unor compozite biomimetice pe bază de collagen, hidroxiapatită și cheratină (COL:HA:K), utilizând metode reproductibile de sinteză prin reticulare chimică și liofilizare, adaptate procesării materialelor naturale. Compozitele rezultate au fost supuse unei caracterizări fizico-chimice riguroase prin microscopie electronică de baleiaj (SEM), spectroscopie FTIR și Raman, precum și prin teste de absorbție și biodegradabilitate, pentru a evalua stabilitatea și comportamentul lor în mediu biologic. În etapa in vitro, a fost testată biocompatibilitatea și capacitatea osteoinductivă folosind celule stem mezenchimale umane (MSC)(11,12), prin teste de viabilitate celulară (XTT) și colorări imunofluorescente pentru markeri specifici. Pe baza

rezultatelor, cele mai promițătoare formulări au fost selectate pentru testare in vivo pe model animal (șobolan Wistar), în vederea validării performanței biologice în condiții fiziologice. Monitorizarea postoperatorie a inclus evaluări imagistice (radiografii, micro-CT)(13), analize histologice și determinări serologice ale citokinelor (IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α)(14) și markerilor osteogenici (ALP, CRP)(15), pentru a analiza integrarea tisulară și profilul imunologic al compozitelor testate.- Identificarea unei formulări optime (ex. F6) cu proprietăți regenerative și imunologice superioare, care să ofere potențial de translație clinică în tratamentul defectelor osteocondrale.

4. Metodologia de cercetare:

Cercetarea a fost structurată în trei etape majore, urmărind o abordare progresivă și integrativă, de la sinteza materialelor până la testarea lor in vivo.

Etapa I – Sinteza și caracterizarea compozitelor

Formulările biomimetice au fost obținute prin reticulare chimică cu glutaraldehidă, urmată de liofilizare, pentru a genera structuri poroase, stabile și adecvate pentru regenerarea tisulară. Caracterizarea fizico-chimică a inclus:

- Microscopie electronică de scanare (SEM), utilizată pentru analiza morfologiei și porozității structurii;
- Spectroscopie FTIR și Raman, pentru identificarea compoziției chimice și a interacțiunilor moleculare dintre componente;
- Teste funcționale privind absorbția de apă, stabilitatea în medii enzimactice (colagenază) și biodegradabilitatea scaffoldurilor.

Etapa II – Studii in vitro

Biocompatibilitatea compozitelor a fost testată utilizând celule stem mezenchimale umane (MSC), evaluate prin:

- Testul XTT, pentru determinarea viabilității celulare;
- Colorări Eozină-Hoechst și imunofluorescență, cu evidențierea markerilor specifici vimentină (citoschelet) și fibronectină (matrice extracelulară);
- Analiza aderenței și proliferării celulare, urmărită prin examinarea comportamentului celulelor pe suprafața scaffoldurilor.

Etapa III – Studii in vivo (model animal)

Două experimente preclinice au fost desfășurate pe șobolani Wistar pentru evaluarea funcționalității regenerative a compozitelor selectate (F1, F2, F5, F6). Etapa a inclus:

- Implantare bilaterală femurală și urmărire a integrării tisulare;
- Monitorizare imagistică prin radiografii standardizate și micro-CT pentru analiza morfologică tridimensională a regenerării osoase;
- Analize histologice și imunohistochimice, pentru evaluarea calitativă a regenerării;
- Analize serologice la 30 și 60 de zile post-implantare (IL-6, IL-8, IL-10, TNF- α , CRP, ALP), pentru caracterizarea răspunsului inflamator și osteogenic;
- Testarea hemocompatibilității, realizată conform standardului ASTM F756-00.

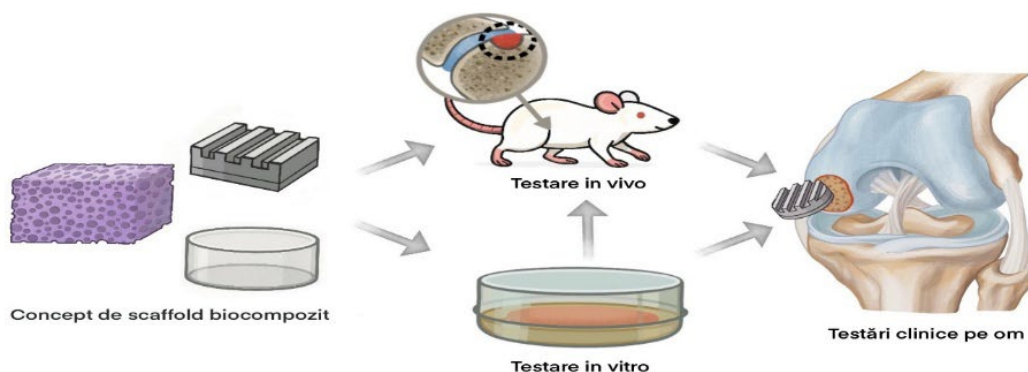
Analiza integrativă

Datele obținute din caracterizarea fizico-chimică, testările in vitro și evaluările in vivo au fost corelate statistic, pentru a valida formularea cea mai performantă – F6. O corelație puternică a fost identificată între scorurile histologice și media intensității pixelilor din radiografii (coeficient Pearson $r = 0.94$), confirmând validitatea metodologică și potențialul translational al compozitului F6.

În figura de mai jos este ilustrată sinteza conceptuală a etapelor desfășurate în cadrul studiului, care evidențiază abordarea translatională de la dezvoltarea scaffoldului compozit până la testările in vitro, in vivo și aplicațiile clinice vizate: În etapa de documentare desfășurată în cadrul părții generale a tezei, am urmărit o analiză sistematică și critică a literaturii de specialitate privind defectele osteocondrale ale genunchiului – o patologie complexă și încă insuficient rezolvată din punct de vedere terapeutic. Studiind surse bibliografice recente și relevante, inclusiv articole din jurnale internaționale de ortopedie, bioinginerie și medicină regenerativă, am aprofundat aspectele legate de anatomia și fiziologia unității osteo-cartilaginoase, precum și evoluția tratamentelor regenerative, de la tehnici celulare la biomateriale compozite. În acest context, am identificat nevoia unei abordări noi, care să combine proprietăți osteoconductive, biocompatibilitate structurală și un control eficient al răspunsului inflamator local.

Astfel, pe fondul unei documentări riguroase privind potențialul materialelor naturale, am remarcat că, deși este mai puțin utilizată în regenerarea osteocondrală, cheratina prezintă valențe importante prin capacitatea sa imunomodulatoare, proangiogenă și de susținere a organizării tisulare. În consecință, alegerea de a valorifica mai bine potențialul cheratinei în cadrul unor compozite biomimetice a reprezentat un demers cu justificare științifică solidă și caracter inovator, deschizând perspective promițătoare pentru dezvoltarea unor noi soluții terapeutice. Această etapă de documentare a fost esențială pentru definirea temei, formularea ipotezei și proiectarea ulterioară a experimentelor,

contribuind semnificativ la înțelegerea integrată a problematicii osteocondrale și a soluțiilor regenerative emergente.



2. Capitolele tezei

Premergător, în etapa de documentare desfășurată în cadrul Părții generale a tezei, am urmărit o analiză critică, sistematică și extensivă a surselor bibliografice de specialitate privind etiopatogenia, diagnosticul și opțiunile terapeutice actuale în tratamentul defectelor osteocondrale ale genunchiului. Studiind literatura de specialitate recentă și relevantă, inclusiv articole publicate în jurnale internaționale consacrate din domeniile ortopediei, bioingineriei și medicinei regenerative, am aprofundat aspecte legate de anatomia și fiziologia unității osteo-cartilaginoase, precum și de stadiul actual al tratamentelor regenerative – de la tehnicile celulare până la utilizarea biomaterialelor compozite.

Am identificat potentialul unui nou compozit biomimetic, care să combine proprietăți osteoconductive, osteoinductivitatea structurală și un control eficient al răspunsului inflamator local. Alegerea de a valorifica mai bine potențialul cheratinei în acest context, s-a conturat ca un demers justificat științific și inovator, susținut de datele și concluziile din literatura de specialitate. Această etapă inițială a fost importantă pentru definirea temei, formularea ipotezei și proiectarea ulterioară a experimentelor.

I. PARTEA SPECIALĂ - CONTRIBUȚII PERSONALE

1. Dezvoltarea Noilor Materiale Compozite pe bază de Colagen, Hidroxiapatită și Cheratină

Acest capitol descrie procesul de dezvoltare, caracterizare și validare in vitro a unor noi biocompozite pe bază de colagen, cheratină și hidroxiapatită (COL:K:HA), destinate regenerării osteocondrale. Pe fondul progreselor recente în ingineria tisulară și nanotehnologie, materialele propuse au fost concepute pentru a oferi proprietăți biomecanice și biologice superioare, răspunzând nevoilor regenerative ale defectelor osteo-cartilaginoase. În această lucrare, termenii ‘compozite’, ‘biocompozite’ și ‘schele (scaffolduri)’ se referă la aceleași structuri tridimensionale cu aplicabilitate în regenerarea osteocondrală.

Biocompozitele au fost obținute prin reticulare chimică cu glutaraldehidă și liofilizare, iar caracterizarea fizico-chimică a inclus analiza morfologică (SEM), absorbția de apă, stabilitatea enzimatică, spectroscopia FT-IR și Raman. Analizele SEM și morfometrice au demonstrat o structură poroasă optimă (50–200 μm) pentru aplicabilitate ca scaffold, cu dispersie eficientă a componentelor. Formularea F6, conținând 1% colagen, 0,5% cheratină și 1% hidroxiapatită, s-a remarcat printr-un echilibru optim între stabilitate, porozitate și integrare fizico-chimică a fazelor.

Testările biologice in vitro, folosind celule stem mezenchimale umane (MSC), au evidențiat o viabilitate crescută și o bună colonizare celulară pentru formulările F5 și F6, însoțite de expresia fibronectinei și vimentinei, markeri ai unei activități regenerative solide. Aceste rezultate indică potențialul compozitelor dezvoltate de a fi utilizate în medicina regenerativă ortopedică, în special pentru reconstrucția defectelor osteocondrale. Concluziile susțin superioritatea formulării F6 și rolul sinergic al celor trei componente în stimularea regenerării tisulare.

Concluziile generale ale studiului evidențiază potențialul promițător al compozitelor pe bază de colagen, hidroxiapatită și cheratină în optimizarea procesului de regenerare osteo-cartilaginoasă. În același timp, ele subliniază importanța continuării efortului de cercetare în domeniul biomaterialelor personalizate și a dezvoltării unor strategii terapeutice inovatoare, capabile să accelereze vindecarea, să reducă riscurile postoperatorii și să contribuie la scăderea costurilor asociate tratamentelor ortopedice moderne.

2. Evaluarea in vivo a compozitelor obținute din collagen, hidroxiapatită și cheratină, pe modelul experimental animal

Capitolul II al lucrării prezintă evaluarea in vivo a biocompozitelor pe bază de collagen (COL), hidroxiapatită (HA) și cheratină (K) utilizând modelul animal preclinic cu șobolani Wistar. Scopul principal al acestui studiu a fost testarea performanțelor biologice ale patru compoziții biomateriale: F1 (collagen simplu – control), F2 (collagen + cheratină), F5 (collagen + hidroxiapatită) și F6 (collagen + hidroxiapatită + cheratină), în contextul regenerării defectelor osteocondrale.

Introducerea subliniază provocările majore în tratamentul leziunilor osteo-cartilaginoase și importanța dezvoltării unor biomateriale biomimetice capabile să inducă regenerarea osului și cartilajului. Collagenul, hidroxiapatita și cheratina au fost deja investigate in vitro pentru proprietățile lor osteoinductive și biocompatibile. Combinarea acestor trei componente într-un compozit reprezintă o abordare inovatoare pentru substituția oso-cartilaginoasă.

În ceea ce privește metodologia, studiul a implicat 32 de șobolani Wistar masculi, fiecare animal primind implantul într-un singur femur, în timp ce femurul contralateral a fost păstrat ca martor intern. Implanturile au fost evaluate la 30 și 60 de zile după operație prin analize radiologice și histologice. Compozițiile au fost selectate pe baza performanțelor in vitro, iar intervențiile chirurgicale au urmat protocoale riguroase de anestezie, implantare și îngrijire postoperatorie.

Rezultatele au evidențiat diferențe semnificative între compoziții. Monitorizarea greutății corporale a arătat o toleranță sistemică bună pentru toate formulările, fără pierderi semnificative în greutate sau mortalitate. Grupurile F5 și F6 au prezentat o creștere susținută a greutății corporale, sugerând o interacțiune favorabilă între biomateriale și organism.

Analizele radiologice au utilizat parametri cantitativi precum media intensității pixelilor, deviația standard, asimetria (skewness) și kurtoza, obținuți cu software-ul ImageJ. Compoziția F6 s-a remarcat printr-o distribuție omogenă a densității osoase, o deviație standard scăzută și valori ridicate ale kurtozei, indicând o regenerare osoasă organizată și avansată. Grupul F5 a avut rezultate bune, dar inferioare comparativ cu F6, în timp ce F1 și F2 au prezentat o regenerare osoasă limitată.

Evaluarea histologică a confirmat aceste diferențe. Grupul F6 a prezentat trabecule groase și bine organizate, o densitate celulară ridicată, o vascularizație extinsă și o integrare excelentă cu țesutul gazdă, în timp ce inflamația reziduală a fost minimă. F5 a evidențiat o regenerare moderată cu trabecule bine formate și o vascularizație adecvată. F2 a arătat depuneri colagenice abundente și o mineralizare parțială, iar F1 a avut cea mai slabă performanță, cu formare osoasă limitată.

Corelațiile între datele imagistice și cele histologice au fost semnificative, cu un coeficient Pearson $r = 0.94$ între media intensității pixelilor și scorurile histologice totale. Aceasta sugerează că analiza radiologică poate fi un instrument fiabil pentru evaluarea semiquantitativă a regenerării osoase in vivo.

Discuțiile au evidențiat superioritatea compoziției F6, care combină beneficiile hidroxiapatitei (osteoconducție) cu cele ale cheratinei (biocompatibilitate, organizare celulară). Această formulare a demonstrat cea mai bună performanță în regenerarea osoasă și integrarea în țesutul gazdă. F2 și F5 au avut rezultate intermediare, iar F1, ca formulare de control, a arătat o capacitate limitată de inducere a regenerării.

În concluzie, studiul a demonstrat că integrarea hidroxiapatitei și cheratinei într-o matrice colagenică duce la obținerea unui biomaterial compozit (F6) cu performanțe regenerative superioare. Rezultatele radiologice și histologice au fost convergente și susțin continuarea cercetării asupra compozițiilor F5 și F6, în modele animale mai mari și cu metode de evaluare mai avansate, precum microCT și teste biomecanice. Formularea F6 se conturează astfel drept un candidat promițător pentru aplicații clinice în tratarea defectelor osteocondrale.

3. Evaluarea convergentă imunologică, histologică și imagistică in vivo a compozitelor

Capitolul III prezintă o evaluare detaliată in vivo a trei compozite biomateriale – F1 (colagen simplu), F5 (colagen + hidroxiapatită) și F6 (colagen + hidroxiapatită + cheratină) – utilizând un model preclinic pe șobolani Wistar, având ca scop investigarea capacității acestora de a regenera defectele osteocondrale. Selecția acestor formulări se bazează pe concluziile studiului in vivo din Capitolul II, unde au fost analizate inițial patru compoziții, iar F1, F5 și F6 s-au remarcat prin performanțe superioare. Alegerea lor pentru analiza aprofundată reflectă o decizie fundamentată științific, cu relevanță directă pentru dezvoltarea unor biomateriale eficiente și clinic aplicabile. Introducerea acestui capitol susține necesitatea unor abordări regenerative inovatoare, subliniind rolul colagenului ca suport structural, al hidroxiapatitei pentru osteoconductivitate și al cheratinei pentru efectele sale imunomodulatoare și proangiogenice.

Studiul a fost realizat pe 15 șobolani Wistar, organizați în trei grupuri experimentale. Evaluarea a fost efectuată pe o perioadă de 60 de zile și a inclus teste preoperatorii (hemoliză, spectroscopie FTIR și Raman), monitorizarea greutății corporale, analize serologice (citokine, CRP, ALP), radiografii, scanări micro-CT și examinări histologice.

Rezultatele au arătat că toate compozitele au fost bine tolerate sistemic, fără pierderi semnificative în greutate sau efecte adverse. F6 a demonstrat cel mai bun profil de biocompatibilitate și integrare, evidențiind o creștere constantă a greutății corporale concomitent cu niveluri crescute ale fosfatazei alcaline, indicând o activitate osteogenică sporită. Radiografiile și analiza imagistică digitală au arătat o mineralizare mai avansată și o distribuție osoasă mai uniformă în grupul F6, în timp ce micro-CT a confirmat o arhitectură trabeculară mai densă și mai organizată.

Histologic, compozitul F6 a prezentat densitate celulară ridicată, depuneri extinse de colagen, mineralizare avansată și vascularizație intensă, cu inflamație reziduală minimă. Scorurile histologice și graficele radar au confirmat superioritatea acestui compozit față de F1 și F5. Spectroscopia Raman și FTIR au indicat stabilitatea chimică a materialelor și o interacțiune favorabilă cu mediul biologic.

Profilul citokinic al compozitului F6 a fost caracterizat prin scăderi semnificative ale IL-6, IL-8 și TNF- α , concomitent cu o creștere a IL-10, evidențiind un răspuns imun antiinflamator favorabil regenerării tisulare. Nivelurile scăzute de CRP și creșterea activității ALP au întărit această concluzie.

Corelațiile dintre parametrii radiologici, histologici și cei obținuți prin micro-CT au fost puternic pozitive, sugerând coerență între metodele de evaluare. Compozitul F6 a fost evidențiat ca având cel mai mare potențial translational pentru aplicații clinice în reconstrucția defectelor osteocondrale, prin combinarea eficientă a suportului structural, capacității de integrare biologică și modulației răspunsului imun.

Concluzii și contribuții personale

În concluzie, studiul susține continuarea cercetării asupra compozitului F6 în modele animale de ordin superior, validarea biomecanică și extinderea aplicațiilor în medicina regenerativă ortopedică.

(i) Eficacitatea materialelor dezvoltate în cadrul studiului

Lucrarea a vizat dezvoltarea și testarea unor biocompozite inovatoare pe bază de collagen, hidroxiapatită (HA) și cheratină, cu potențial biomimetic pentru refacerea unității osteo-cartilaginoase. Aceste materiale, obținute prin omogenizare, reticulare chimică și liofilizare, au demonstrat o structură poroasă stabilă, compatibilă cu infiltrarea celulară și difuzia nutrienților. Testările *in vitro* și *in vivo* au arătat o capacitate osteoconductivă și osteoinductivă superioară în cazul compozitelor collagen-hidroxiapatită-cheratină, confirmând un efect sinergic favorabil regenerării osoase și cartilaginoase. Astfel, lucrarea contribuie la dezvoltarea biomaterialelor ortopedice cu potențial clinic real.

(ii) Evaluarea *in vivo* a biocompozitelor COL:HA:K pe model animal preclinic

Evaluarea compozițiilor F1, F2, F5 și F6 pe modelul șobolan Wistar a indicat superioritatea formulării F6 în ceea ce privește regenerarea oso-cartilaginoasă și integrarea implantului. Asocierea celor trei componente a favorizat osteointegrarea și a redus răspunsul inflamator. Rezultatele subliniază importanța selecției adecvate a biomaterialului și a tehnicii de implantare în succesul reconstrucției osteocondrale.

(iii) Rolul compozitelor COL:HA:K în regenerare și biocompatibilitate

Compozitele COL:HA:K s-au dovedit eficiente în stimularea diferențierii osteoblastice și condroblastice, având o structură poroasă favorabilă regenerării. Cheratina contribuie prin proprietăți imunomodulatoare și proangiogenice, collagenul susține adeziunea celulară, iar hidroxiapatita oferă osteoconductivitate. Această combinație asigură un suport biologic robust, accelerând vindecarea și reducând riscul de complicații.

(iv) Importanța studiului și perspective de cercetare

Studiul oferă o bază științifică solidă pentru utilizarea compozitelor COL:HA:K ca soluții regenerative avansate. Ele pot fi aplicate în ortopedie, implantologie dentară și ortoprotezare. Cercetările viitoare ar trebui să vizeze integrarea de agenți terapeutici activi și utilizarea tehnologiilor precum imprimarea 3D pentru personalizarea implanturilor. Validarea clinică, optimizarea structurii și stabilirea de protocoale standardizate sunt esențiale pentru tranziția către practica medicală. Colaborarea între cercetători, clinicieni și industrie este crucială pentru implementarea acestor soluții inovatoare în beneficiul pacientului.

BIBLIOGRAFIE

1. Wu AM, Bisignano C, James SL, Abady GG, Abedi A, Abu-Gharbieh E, et al. Global, regional, and national burden of bone fractures in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Healthy Longev.* 2021 Sep;2(9):e580–92.
2. Camarero-Espinosa S, Cooper-White J. Tailoring biomaterial scaffolds for osteochondral repair. *Int J Pharm.* 2017 May;523(2):476–89.
3. Camp CL, Stuart MJ, Krych AJ. Current Concepts of Articular Cartilage Restoration Techniques in the Knee. *Sports Health Multidiscip Approach.* 2014 May;6(3):265–73.
4. Edwards PK, Ackland TR, Ebert JR. Accelerated Weightbearing Rehabilitation After Matrix-Induced Autologous Chondrocyte Implantation in the Tibiofemoral Joint: Early Clinical and Radiological Outcomes. *Am J Sports Med.* 2013 Oct;41(10):2314–24.
5. Eckers F, Loske S, Ek ET, Müller AM. Current Understanding and New Advances in the Surgical Management of Reparable Rotator Cuff Tears: A Scoping Review. *J Clin Med.* 2023 Feb 21;12(5):1713.
6. Marin MM, Ianchis R, Leu Alexa R, Gifu IC, Kaya MGA, Savu DI, et al. Development of New Collagen/Clay Composite Biomaterials. *Int J Mol Sci.* 2021 Dec 30;23(1):401.
7. Salleh KM, Abd Rashid NF. Keratin-based biomaterials for biomedical applications. In: *Polymer Composites Derived from Animal Sources* [Internet]. Elsevier; 2024 [cited 2025 Apr 19]. p. 219–42. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780443224140000120>
8. Barajaa MA, Nair LS, Laurencin CT. Bioinspired Scaffold Designs for Regenerating Musculoskeletal Tissue Interfaces. *Regen Eng Transl Med.* 2020 Dec 1;6(4):451–83.
9. Carriero VC, Di Muzio L, Petralito S, Casadei MA, Paolicelli P. Cryogel Scaffolds for Tissue-Engineering: Advances and Challenges for Effective Bone and Cartilage Regeneration. *Gels.* 2023 Dec;9(12):979.
10. Bernhard JC, Vunjak-Novakovic G. Should we use cells, biomaterials, or tissue engineering for cartilage regeneration? *Stem Cell Res Ther.* 2016 Dec;7(1):56.
11. Tutuianu R, Rosca AM, Albu Kaya MG, Pruna V, Neagu TP, Lascar I, et al. Mesenchymal stromal cell-derived factors promote the colonization of collagen 3D scaffolds with human skin cells. *J Cell Mol Med.* 2020 Sep;24(17):9692–704.
12. Titorencu I, Jinga VV, Constantinescu E, Gafencu AV, Ciohodaru C, Manolescu I, et al. Proliferation, differentiation and characterization of osteoblasts from human BM mesenchymal cells. *Cytotherapy.* 2007;9(7):682–96.
13. Kim Y, Brodt MD, Tang SY, Silva MJ. MicroCT for Scanning and Analysis of Mouse Bones. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2021;2230:169–98.
14. R&D Systems, Inc. Rat IL-6 Quantikine ELISA Kit. 2025.
15. R&D Systems, Inc. Rat C-Reactive Protein (CRP) ELISA Kit Manual. 2025.

Publicații elaborate pe parcursul realizării tezei de doctorat

Popescu, F.; Titorencu, I.; Albu Kaya, M.; Coman Jr., A.E.; Ancuta, D.L.; Coman, C.; Barbilian, A.G. Development of Innovative Biocomposites with Collagen, Keratin and Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering. *Biomimetics* 2024, 9, 428 F.I. **2024, F.I. = –**, <https://doi.org/10.3390/biomimetics9070428>

Popescu, F.; Albu Kaya, M.G.; Miculescu, F.; Coman Jr., A.E.; Ancuta, D.L.; Coman, C.; Barbilian, A.G. Novel Collagenous Sponge Composites for Osteochondral Regeneration in Rat Knee Models: A Comparative Study of Keratin, Hydroxyapatite, and Combined Treatments. *Cureus* **2024**, 16(3), e59179. F.I. = Surgery. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, 25, 246. **F.I. = 4.9**, <https://doi.org/10.7759/cureus59179>

Popescu, Florin; Miculescu, Florin; Titorencu, Irina; Albu Kaya, Madalina; Tudor, Niculae; BIOCOMPATIBILITY AND REGENERATIVE POTENTIAL OF COLLAGEN-KERATIN-HYDROXYAPATITE SCAFFOLDS IN A BILATERAL OSTEOCHONDRAL DEFECT RAT MODEL
SCIENTIFIC BULLETIN, SERIES B, CHEMISTRY AND MATERIALS SCIENCE
ISSN 1454-2331

Acceptat la publicare în Revista “Buletinul UPB”.

Popescu, Florin; Albu Kaya, Mădălina; Ancuța, Diana-Larisa; Coman, Cristin; Bărbuceanu, Florica; Vuță, Vlad; Barbilian, Adrian.

EVALUAREA MULTIMODALĂ A STRUCTURILOR BIOMIMETICE PE BAZĂ DE COLAGEN ÎMBOGĂȚITE CU KERATINĂ ȘI HIDROXIAPATITĂ: INTEGRAREA ANALIZEI SEROLOGICE, IMUNOLOGICE ȘI HISTOLOGICE ÎNTR-UN MODEL DE ȘOBOLAN OSTEOCHONDRAL BILATERAL

În curs de publicare în Revista “FARMACIA”.
