
REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Opțiuni terapeutice moderne de reparare a leziunilor de cartilaj articular

Doctorand **Horea Rareș Ciprian Benea**

Conducător de doctorat Prof. Dr. **Gheorghe Tomoaia**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CUPRINS

INTRODUCERE	17
STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII	19
1. Cartilajul articular normal	21
1.1. Anatomie și histologie	21
1.1.1. Generalități	21
1.1.2. Tipuri de cartilaj	21
1.1.3. Compoziția cartilajului articular	22
1.1.3.1. Condrocitele	22
1.1.3.2. Matricea extracelulară a cartilajului articular	23
1.1.4. Structura histologică a cartilajului articular	26
1.2. Fiziologia țesutului cartilaginos	28
1.2.1. Condrogeneza	28
1.2.2. Metabolismul	28
1.2.3. Proprietățile mecanice ale cartilajului articular	29
1.2.4. Remodelarea matricei extracelulare	30
2. Fiziopatologia leziunilor de cartilaj	31
2.1. Răspunsul țesutului cartilaginos la apariția leziunii – reparația spontană	31
2.2. Leziuni traumatice	32
2.3. Leziuni ischemice	33
2.4. Factori asociați leziunilor de cartilaj	34
2.5. Leziuni iatrogene	35
2.6. Leziuni degenerative – fiziopatologia artrozei	36
3. Diagnosticul leziunilor de cartilaj	37
3.1. Elemente de diagnostic clinic	37
3.2. Investigații paraclinice	38
3.2.1. Radiologie	38
3.2.2. Ecografie	38
3.2.3. Tomografie computerizată	38
3.2.4. Artrografia prin tomografie computerizată și rezonanță magnetică	39
3.2.5. Imagistică prin rezonanță magnetică (IRM)	39
3.2.6. Markerii biologici	40
3.2.7. Artroscopia	40
4. Tratamentul leziunilor de cartilaj	41
4.1. Tratamentul conservativ	41
4.2. Tratamentul chirurgical	41
4.2.1. Tratamentul direct	42
4.2.1.1. Lavajul intraarticular și debridarea leziunii condrale	42

4.2.1.2. Ablajia prin radiofrecvență	42
4.2.1.3. Microfracturile (BMS - Bone Marrow Stimulation)	42
4.2.1.4. Transferul de autogrefă osteocondrală (OAT - Osteochondral Autograft Transfer)	43
4.2.1.5. Transplantul de alogrefă osteocondrală (Osteochondral Allograft Transplantation)	44
4.2.1.6. Xenogrefele	44
4.2.1.7. Transfer loco-regional de grefă osteocartilaginoasă pediculată	44
4.2.1.8. Implanturi protetice osteocartilaginoase bifazice	44
4.2.1.9 Artroplastia protetică	44
4.2.2. Noțiuni de inginerie tisulară	45
4.2.2.1. Implantarea de condrocite autologe (ACI - Autologous Chondrocyte Implantation)	45
4.2.2.2. Celule stem mezenchimale multipotente	46
4.2.2.3. Scaffold-uri utilizate în practică	47
4.2.3. Tratamentul corectiv al factorilor asociați	48
4.2.3.1. Rezolvarea instabilităților ligamentare	48
4.2.3.2. Osteotomiile de realiniere	48
4.2.3.3. Tratamentul factorilor protectivi	48
CONTRIBUȚIA PERSONALĂ	49
1. Ipoteza de lucru/obiective	51
2. Metodologie generală	53
3. Studiul 1. Comportamentul in vitro al celulelor stem mezenchimale pe diferite biomateriale	55
3.1. Introducere	55
3.2. Ipoteza de lucru	55
3.3. Material și metodă	55
3.3.1. Materialul biologic celular	56
3.3.2. Biomaterialele testate	56
3.3.3. Caracterizarea morfologică a suprafeței matricilor colagenice	57
3.3.4. Evaluarea adeziunii celulare, gradului de proliferare și capacității de migrare a celulelor mezenchimale pe implanturi de MatriBone Ortho demineralizate	57
3.3.5. Evaluarea adeziunii celulare și a citotoxicității pe biomateriale	58
3.4. Rezultate	59
3.4.1. Caracterizarea populațiilor celulare stem	59
3.4.2. Evaluarea gradului de proliferare și a capacității de migrare a celulelor mezenchimale pe implanturi de MatriBone Ortho demineralizate	61
3.4.3. Caracterizare morfologică a membranelor colagenice	62
3.4.4. Evaluarea comparativă microscopică pe placă a aderenței celulare pe biomateriale	66
3.4.5. Evaluarea prin microscopie electronică (SEM) a adeziunii celulare și a citotoxicității implicate pe biomateriale	66

3.5. Discuții	68
3.6. Concluzii	69
4. Studiul 2 . Utilizarea celulelor stem derivate din lipoaspiratul fluid pentru tratamentul defectelor de cartilaj. Studiu pilot pe model de iepure.	71
4.1. Introducere	71
4.2. Ipoteza de lucru	72
4.3. Material și metodă	72
4.3.1. Declarație etică	72
4.3.2. Implanturile	72
4.3.3. Izolarea celulelor	73
4.3.4. Însămânțarea celulelor pe membrane de colagen	73
4.3.5. Animalele și găzduirea lor	73
4.3.6. Tehnica chirurgicală	74
4.3.7. Evaluarea rezultatelor	75
4.3.8. Analiza datelor	76
4.4. Rezultate	76
4.4.1. Evaluarea macroscopică	77
4.4.2. Evaluarea histologică	78
4.4.3. Analiza expresiei genelor	78
4.4.4. Scanarea microCT	79
4.5. Discuții	79
4.6. Concluzii	80
5. Studiul 3. Evaluarea comparativă a vindecării leziunilor focale de cartilaj articular pe un model animal prin utilizarea celulelor stem din creasta iliacă versus celule stem din țesutul adipos	81
5.1. Introducere	81
5.2. Ipoteza de lucru/obiective	81
5.3. Material și metodă	82
5.3.1. Considerente etice	82
5.3.2. Lotul de animale și condițiile de desfășurare a experimentului	82
5.3.3. Randomizarea pe grupe	82
5.3.4. Pregătirea preoperatorie	83
5.3.5. Prelevarea, separarea, concentrarea și caracterizarea celulelor stem	84
5.3.5.1. Recoltarea BMC	84
5.3.5.2. Recoltarea ASC	86
5.3.5.3. Recoltarea PRP	86
5.3.6. Pregătirea implanturilor	86
5.3.7. Tehnica chirurgicală experimentală	87
5.3.8. Criterii de evaluare a rezultatelor	88
5.3.8.1 Evaluarea macroscopică	88

5.3.8.2. Evaluarea microscopică	88
5.3.8.3. Evaluarea imunohistochimică	89
5.3.8.4. Investigații imagistice	89
5.4. Rezultate	90
5.4.1. Evaluare macroscopică și microscopică	90
5.4.2. Evaluare imunohistochimică	94
5.4.3. Evaluare imagistică	94
5.4.3.1. Investigații radiologice	94
5.4.3.2. Tomografia computerizată CT	95
5.4.3.3. Imagistica prin rezonanță magnetică IRM	95
5.5. Discuții	96
5.6. Concluzii	97
6. Studiul 4. Analiză statică cu elemente finite la nivelul genunchiului de oaie tratat prin reconstrucție osteo-cartilaginoasă	99
6.1. Introducere	99
6.2. Evaluarea imaginilor CT	100
6.2.1. Metodologia	100
6.2.2. Rezultatele evaluării imaginilor CT	101
6.2.3. Concluzii generale de etapă	102
6.3. Reconstrucțiile 3D ale genunchiului	102
6.3.1. Condițiile analizelor statice FEA	103
6.3.2. Rezultatele simulărilor statice FEA	105
6.4. Concluzii	109
7. Studiul 5. Studiu retrospectiv observațional asupra leziunilor de cartilaj articular tratate în practica clinică	111
7.1. Introducere	111
7.2. Ipoteza de lucru/obiective	111
7.3. Material și metodă	112
7.4. Rezultate	114
7.4.1. Cazuri clinice particulare	117
7.5. Discuții	124
7.6. Concluzii	124
8. Concluzii generale (sinteză)	125
9. Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei	129
REFERINȚE	131
ANEXE	147

CUVINTE CHEIE: Cartilaj articular; Tratament; Reconstrucție; Celule stem mezenchimale; Implanturi osteocondrale; Colagen; Terapii biologice autologe; Transplant osteocondral; Model matematic; Element finit.

INTRODUCERE. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

În momentul actual, patologia și tratamentul leziunilor de cartilaj reprezintă un domeniu de cercetare intensă, atât la nivel de laborator, cât și clinic. Restaurarea cartilajului articular prin formarea de țesut de tip hialin reprezintă încă o provocare pentru chirurghi și cercetători. Nu există studii clinice sau preclinice pe loturi largi, prin care să se poată stabili concluzii obiective legate de cele mai bune metode terapeutice.

Particularitățile morfologice și metabolice ale țesutului cartilaginós au stârnit un viu interes, atât în rândul clinicienilor, cât și în rândul cercetătorilor. Eșecul metodelor clasice de tratament au dus la căutarea unor soluții biologice în încercarea de vindecare a leziunilor. Tot mai mult se pune accent pe necesitatea refacerii capitalului celular, și nu numai a celui de substanță fundamentală. Este creditat potențialul celulelor stem de dezvoltare spre linia cartilaginoasă, dar și spre refacerea osului subcondral, element esențial de suport și nutriție pentru cartilaj. Se încearcă și utilizarea directă a celulelor cartilaginoase care să prolifereze local la nivelul defectului sub influența diferiților stimuli biologici, fără a fi nevoie de cultivare în laborator.

De asemenea, se încearcă tot mai mult dezvoltarea implanturilor cu rol biologic în refacerea țesutului osteocondral, scaffolduri de suport, la care se pot adăuga și elemente celulare stem mezenchimale (celule precursori somatice multipotente localizate în zonele perivasculare ale stromei conjunctive a țesuturilor adulte), care să fie direcționate sub influența factorilor biologici, citokine, factori de creștere specifici, către refacerea celulelor cartilaginoase și osoase.

Cu aceste terapii intrăm deja în sfera medicinei regenerative, care reprezintă un domeniu cu o dezvoltare intensă care aduce o importantă contribuție la științele medicale. Aici ingineria tisulară a materialelor biocompozite a găsit un loc propice pentru o dezvoltare extensivă. Alături de biomateriale, celulele stem reprezintă punctele cheie ale medicinei regenerative, iar prin capacitatea lor de diferențiere și reînnoire ele sunt esențiale pentru repararea tisulară și regenerarea organelor din organismul viu.

Majoritatea procedurilor bazate pe utilizarea celule mezenchimale stem sunt consumatoare de timp, dificile din punct de vedere tehnic și necesită intervenții multiple și manipulare *ex vivo*, implicând astfel costuri mari, risc de contaminare și infecții locale. Procedura ideală ar trebui să fie o intervenție unică, cu manipulare tisulară minimă. În acest sens, celulele derivate din măduva osoasă (BMCs) și din țesutul adipos (ASCs) reprezintă o promisiune onorată, așa cum vom vedea mai departe.

CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Ipoteza de lucru/obiective

Am decis să dezvolt cercetarea într-un domeniu de actualitate științifică, și anume cel al terapiilor biologice autologe cu celule stem cu potențial de utilizare pentru vindecarea leziunilor de cartilaj articular. Aceste terapii sunt deja utilizate în practica curentă și au fost raportate rezultate încurajatoare.

Mi-am propus să dezvolt o metodă terapeutică, cât mai simplă din punct de vedere tehnic, cât mai rapidă și mai puțin agresivă, și care să fie cât mai eficace în tratamentul leziunilor osteocondrale articulare.

Obținerea unor rezultate bune printr-un studiu pe model animal ar crea premisa validării acestei metode "one step surgery". Acest lucru ar reprezenta o adevărată noutate în domeniul chirurgiei cartilajului articular și ar avea toate șansele să se bucure de implementare cu succes în practica curentă, fiind practic țelul multor cercetări ce se desfășoară actualmente pe plan mondial. De asemenea, impactul populațional ar fi imens, știut fiind că suferințele articulare afectează milioane de oameni.

În acest sens am conceput cinci studii ale căror obiective sunt următoarele:

- Evaluarea posibilităților de aplicare a tratamentelor bazate pe celule stem, atât pe model animal, cât și în clinică
- Evaluarea comportamentului celulelor stem pe anumite materiale ce ar putea fi folosite ca scaffold-uri
- Testarea fezabilității și aplicabilității unor procedee de reparare condrală cu ajutorul celulelor stem
- Evaluarea comparativă a rezultatelor acestor terapii prin metode de investigație histologică, moleculară, imagistică
- Testarea unor noi materiale și procedee de prelevare celulară
- Dezvoltarea unor modele matematice virtuale pentru analiză cu element finit
- Evaluarea incidenței și a rezultatului tratamentului patologiei condrale la pacienții tratați prin metode artroscopice
- Translatarea procedeelelor terapeutice din laborator, pe animal și apoi în clinica umană.

Studiul 1. Comportamentul *in vitro* al celulelor stem mezenchimale pe diferite biomateriale

Oiectivul principal al studiului nostru *in vitro* s-a axat pe izolarea celulelor stem mezenchimale din țesutul adipos și din măduva osoasă hematogenă, caracterizarea acestora, evaluarea biocompatibilității, adeviziunii celulare, citotoxicității și a capacității

de proliferare și migrare pe diferite biomateriale luate în studiu, printre care un biomaterial colagenic nou dezvoltat, aflat la primele testări *in vitro* și *in vivo*. Prin experimentările efectuate am dorit să demonstrăm că acest nou tip de scaffold colagenic este biocompatibil, nu prezintă citotoxicitate reziduală și permite o bună aderare și proliferare a celulelor stem mezenchimale.

În urma studiului nostru cu privire la izolarea celulelor stem mezenchimale (MSCs) de la nivelul măduvei osoase din creasta iliacă (BMC pe un model animal ovin) cu ajutorul kit-ului Concemo® și evaluarea funcționalității celulelor pe biomaterialul MatriBone Ortho demineralizat, se pot formula următoarele concluzii:

- celulele izolate de la nivelul măduvei osoase hematogene și de la nivelul țesutului adipos pot fi prelucrate ușor cu ajutorul kitului Concemo®, dar rezultatele imunofenotipice indică o variabilitate destul de largă între probele recoltate și analizate;
- până la prima subcultivare culturile au prezentat o heterogenitate accentuată, cu predominanța celulelor rotunde și a celor fusiforme, cu confluența culturii în medie după 14 de zile de la izolare;
- după primul pasaj s-a înregistrat pozitivitate pentru markerul mezenchimal CD44, analiza globală indicând o medie de $96.67 \pm 3.20\%$;
- gradul de atașare și proliferare pe MatriBone Ortho demineralizată a fost semnificativ mai mare comparativ cu cultura control;
- celulele prezintă la 3 zile un grad de atașare comparabil pe implantul B3 cu cel de pe implantul B4 (Chondro-Gide), care reprezintă un implant de referință la ora actuală pentru tratamentul defectelor de cartilaj articular;
- rezultatele evaluării potențialului de migrare pe MatriBone Ortho demineralizată indică rezultate semnificativ mai bune din punct de vedere statistic comparativ cu cultura control.
- Recomandăm cultivarea și transplantul celulelor stem mezenchimale pe implantul de MatriBone Ortho demineralizat, care este biocompatibil, nu prezintă citotoxicitate reziduală și permite o bună aderare și proliferare a celulelor stem mezenchimale.

Studiul 2. Utilizarea celulelor stem derivate din lipoaspiratul fluid pentru tratamentul defectelor de cartilaj. Studiu pilot pe model de iepure.

În ultima vreme s-a susținut ideea obținerii celulelor stem direct din fracțiunea lichidă a aspiratului adipos LAF (lipoaspirate fluid), prin proceduri mecanice relativ simple, și aceste celule ar putea fi, cel puțin teoretic, folositoare și valoroase pentru terapii bazate pe celule, la fel ca și cele obținute prin procesarea în laborator a lipoaspiratului PLA (processed lipoaspirate).

Scopul studiului a fost aprecierea și compararea proprietăților condro-regenerative ale celulelor din lichidul de lipoaspirat și cele din lipoaspiratul procesat în laborator, pe un model preclinic de defect de cartilaj la nivelul trohleei genunchiului, de 6 cm diametru, la iepuri. Ipoteza de studiu a fost aceea că LAF ar avea efecte trofice pe cartilajul de regenerare, datorită prezenței celulelor stem plastice alături de moleculele solubile.

Toate experimentele au fost conduse în concordanță cu ghidurile de practică actuale și au fost aprobate de Comitetul de Etică al UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, România, cu avizul nr. 340/05.06.2015 și în concordanță cu Directiva UE 63/2010 și cu Legea nr. 43/2014 din România. Pentru procedura chirurgicală de implantare au fost folosite membrane de colagen tip I/III (*Chondro-Gide®*, *Geistlich Pharma AG*), care au fost impregnate cu celule stem mezenchimale izolate din țesut grasos provenind de la donator uman, câte 1×10^5 celule LAF și PLA.

Au fost utilizați nouă masculi adulți Crl:KBL de iepuri albi de Noua Zeelandă, cu vârsta medie de 15 luni (12-18 luni), cu greutatea de 3.750 ± 0.6872 kg. (medie \pm 0.2173 DS), care au fost împărțiți în trei grupuri de câte 3: în grupul A (grupul de control) defectul a fost umplut cu matrice de colagen neînsămânțată, în grupul B matricea folosită a fost cea însămânțată cu celule LAF, iar în grupul C matricea a fost însămânțată cu celule PLA. Animalele au fost eutanasiate la trei luni postoperator, când s-au obținut următoarele rezultate:

- macroscopie: cel mai mare scor Wayne a fost obținut în grupul LAF, cu media de 11.3 puncte din 16, cu diferență semnificativă statistic între grupuri ($p=0,0041$).
- histologie: în grupul B, cartilaj hialin mai abundent, cu suprafața intactă și mai regulată, celularitate mai scăzută, o mai bună reconstrucție a osului subcondral, cu mai puțin țesut fibros și lipire aproape completă de osul adiacent, față de grupul PLA.
- expresia genică: în grupul B nivelul de semnificație al expresiei genei ACAN a fost cel mai mare, comparativ cu grupele A și C ($p<0.00051$). În ceea ce privește expresia genelor COL2A1 și SOX-9, aceasta a fost înalt semnificativă statistic în comparație cu grupul A ($p<0.0005$) și semnificativă statistic față de grupul C ($p<0.05$).
- scanare microCT: am observat restaurarea aproape totală a grosimii stratului cartilajului articular și trabecularea osului subcondral, mai pronunțate în grupul LAF.

Concluziile acestui studiu au fost următoarele:

- Celulele stem derivate din țesutul adipos reprezintă opțiuni valoroase pentru repararea osteocondrală.
- Celulele stem derivate din LAF par a avea activitate și efecte ceva mai bune comparativ cu celulele PLA, în ceea ce privește repararea cartilajului, fiind ajutate și de moleculele trofice din lichid.

- Celulele LAF pot fi separate rapid cu manipulare tisulară minimă, astfel că sunt mai ieftine și potrivite pentru proceduri chirurgicale dintr-o singură etapă.

Studiu 3. Evaluarea comparativă a vindecării leziunilor focale de cartilaj articular pe un model animal prin utilizarea celulelor stem din creasta iliacă versus celule stem din țesutul adipos

Scopul studiului a fost reprezentat de evaluarea eficienței metodelor care utilizează celule stem mezenchimale multipotente (MSC) pentru vindecarea defectelor focale de cartilaj articular. Primul obiectiv a constat în realizarea metodelor de recoltare a celulelor stem din aspirat concentrat de la nivelul crestei iliace (BMC – Bone Marrow Concentrate) și de la nivelul țesutului adipos (ASC – Adipose derived Stem Cells) pe model ovin și caracterizarea populației celulare obținute. Al doilea obiectiv a fost de realizare a unor metode intervenționale pe 15 exemplare ovine prin crearea defectelor de cartilaj de 8 mm diametru până în osul subcondral la nivelul porțiunii centrale a condilului femural medial a genunchiului stâng și repararea acestora prin tehnici specifice care implică un nou tip de scaffold de colagen (MatriBone Ortho demineralizat) și MSC provenite din BMC (Grup A - 6 oi), ASC (Grup B - 6 oi) și respectiv microfracturi subcondrale (Grup C - 3 oi, grupul de control). Obiectivul al treilea fost reprezentat de efectuarea unei analize comparative clinice, anatomo-patologice și imagistice a evoluției leziunilor focale de cartilaj articular după 7 luni de la intervențiile de reparare cu implicarea celulelor stem.

Pentru desfășurarea studiului am obținut avizul Comisiei de Etică a UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, înregistrat cu numărul 237/19.06.2014, iar experimentele au fost derulate cu respectarea directivei UE 63/2010 și a legii nr. 43/2014 din România. Intervențiile chirurgicale s-au realizat în cadrul Blocului Operator al Clinicii de Chirurgie a USAMV Cluj-Napoca, de către o echipă mixtă de medici veterinari, chirurghi ortopezi din cadrul UMF "Iuliu Hațieganu" Cluj-Napoca, ajutați de către biologi specializați pe produsele biologice, îndeosebi celulele stem mezenchimale.

Au fost analizate aspectele macroscopice, microscopice, imunohistochimia, imagistica prin CT și IRM 7 Tesla. Concluziile au fost următoarele:

- Cercetarea în echipe pluridisciplinare reprezintă premisa obținerii rezultatelor celor mai bune pentru dezvoltarea terapiilor complexe în afecțiunile osteoarticulare
- Oaia reprezintă un model de animal foarte bun pentru experimente terapeutice pe aparatul locomotor, în speță pe tratamentul leziunilor osteocondrale, putându-se merge și mai departe pentru studierea bolilor degenerative articulare (artroze)
- Metodele de prelevare a celulelor stem de la nivelul măduvei osoase din creasta iliacă, precum și de la nivelul țesutului adipos, sunt fezabile și la ovine, obținându-se populații de celule mezenchimale multipotente cu potențial de regenerare osteocondrală

- Regenerarea țesutului cartilagos hialin este posibil cu țesut de aceeași calitate, nu doar cu fibrocartilaj
- Procedeele care implică repararea într-un singur timp, fără manipulare celulară și prelucrare în laborator, sunt cele mai eficiente din punct de vedere al complexității actului terapeutic, dar și din punct de vedere economic
- Celulele stem mezenchimale oferă posibilități reale de tratament al defectelor focale de cartilaj, cu sau fără implicarea osului subiacent
- Celulele stem mezenchimale din BMC și ASC își demonstrează clar superioritatea față de celulele mezenchimale locale din stratul subcondral
- Pentru a avea o mai bună eficacitate este necesară utilizarea unor implanturi care să ofere suport pentru susținerea acestor celule, dar și pentru refacerea arhitecturii fibrelor de colagen din os și cartilaj
- Implantul de colagen testat în premieră întrunește caracteristicile necesare pentru a fi folosit ca suport al regenerării osteocondrale, oferind rezultate foarte bune din punct de vedere histologic, imagistic și clinic
- Celulele BMC dau rezultate mai bune în ceea ce privește regenerarea osului și cartilajului decât celulele ASC, însă acestea din urmă trebuie luate în considerare datorită rezultatelor bune obținute și relativei ușurințe în recoltare și prelucrare. Activarea acestora cu concentrat trombocitar autolog PRP crește potențialul lor reparator
- Rezultatele studiului sunt încurajatoare, arătând posibilitățile imense de cercetare pe care le oferă acest domeniu, însă este necesară continuarea cu studii experimentale mai ample pe modele animale mai mari ale metodelor terapeutice și evaluarea aplicabilității lor clinice pe scară mai largă
- Trebuie încurajată utilizarea tehnicilor imagistice performante pentru evaluarea rezultatelor, cum sunt IRM, CT, în acest fel putându-se evita sacrificarea animalelor
- Este necesară găsirea unor metode cât mai simple, reproductibile, cu minim de morbiditate și riscuri, mai ieftine, dar cu rezultate mai bune și complicații diminuate.

Studiul 4. Analiză statică cu elemente finite la nivelul genunchiului de oaie tratat prin reconstrucție osteo-cartilaginoasă

Obiectivul acestor cercetări a vizat dezvoltarea unor modele matematice prin metode FEA (Finite Element Analysis), cu un ridicat grad de fidelitate în reprezentarea formelor anatomice reale ale femurului, tibiei și cartilajelor de acoperire. Studiul evaluează efectul solicitărilor statice comparând distribuția tensiunilor la nivelul cartilajului, osului cortical și al osului trabecular în zona tratată a defectului, ca urmare a testelor *in vivo* pe oi prezentate în capitolul anterior.

Noutatea acestui studiu este dată de utilizarea analizelor FEA asupra structurilor osoase și a cartilajului, la 7 luni postoperatoriu după aplicarea celor 3 tratamente distincte (tratarea doar cu implanturi din colagen tip I/III, colagen și celule

stem din țesutul adipos, colagen și celule stem din măduva osoasă). Zona tratată a fost localizată în cartilajul condilului femural medial stâng, regiunea centrală de maximă convexitate. Spre deosebire de alte cercetări care au analizat cu metode FEA efectul solicitărilor asupra sistemului osteoarticular, studiul actual descrie și efectele unei posibile traume ce poate apărea asupra țesuturilor osoase sau a cartilajului în postoperator, prin aplicarea unei presiuni ridicate de 0.76 MPa. Totodată se analizează distribuția tensiunilor în țesuturile osoase încărcate cu o presiune considerată normală pentru oi (0.38 MPa).

Concluzii: în scenariile simulate cu forțe de 1120 N (normală) și 2240 N (excesivă), se demonstrează că în osul cortical din femur sau tibie nu sunt tensiuni care să se apropie de limita de rupere a lui, în realitate ele fiind sub 50 MPa.

Din simulările FEA privind Cazul 0 - sănătos, reiese faptul că cartilajul se comportă ca un material compresibil și elastic, care absoarbe tensiunile și le distribuie în țesutul osos adiacent. Acest comportament al cartilajului este similar cu cel al ligamentului periodontal. După aplicarea unei forțe statice excesive, cartilajul femural sănătos este încărcat cu o tensiune de 3 MPa la contactul cu cartilajul tibiei. Rezultate asemănătoare s-au obținut și în Cazul 2, unde cartilajul are o tensiune ce variază între 0,5-3 MPa, tensiune ce este considerată normală pentru contactul cartilajelor. După aplicarea tratamentului din Cazul 2, cartilajul este refăcut la 6 luni postoperator, iar mișcările normale distribuie tensiuni în țesuturi similare cu Cazul 0 – sănătos. Mișcările complexe care implică forțe ridicate, ar putea afecta regiuni din osul trabecular refăcut.

Colagenul existent în defect la 6 luni postoperator se încarcă cu tensiuni din osul cortical și le distribuie direct în celelalte țesuturi cu care este în contact, ajungând să transmită tensiuni ridicate atât în osul trabecular al femurului, cât și în cartilaje. Acest fenomen ar putea leza în special pereți laterali ai cartilajului nou format din femur, dar și cartilajul tibiei cu care intră în contact direct, aspect vizibil în Cazurile 1 și 3. Comportamentul colagenului de a conduce tensiuni se explică prin rigiditatea lui, în comparație cu țesuturile elastice (os spongios și cartilaj). În Cazurile 1 și 3, după aplicarea unei forțe de 2240 N, cartilajul nou format din zona defectului se încarcă cu tensiuni ce ajung în unele zone la 5-7 MPa. Acest nivel al tensiunilor poate deteriora cartilajul.

Existența colagenului în zona defectului duce la accentuarea deformațiilor totale atât în situații normale (1-2 mm), cât și după aplicarea unei presiuni excesive (1-3 mm). Atunci când se evaluează răspunsul biomecanic al cartilajului tratat *in vivo* pe animale, studiile FEA pot ajuta la luarea unor decizii clinice privind modul și materialele ce se pot aplica în tratarea unor cazuri umane, știindu-se că fără o intervenție eficientă s-ar putea promova pierderea progresivă a cartilajului afectat.

Studiul 5. Studiu retrospectiv observațional asupra leziunilor de cartilaj articular tratate în practica clinică

În ultimii ani au fost propuse metodele terapeutice biologice care implică utilizarea celulelor stem multipotente și a materialelor biologice de suport a regenerării tisulare, care par să dea rezultate net superioare față de metodele "clasice". În acest sens, ipoteza studiului de față este că pacienții care beneficiază de astfel de tratamente vor avea rezultate cel puțin la fel de bune cu cele ale metodelor deja validate pentru același tip de leziuni. Astfel, scopul studiului a fost de a evalua comparativ scorurile funcționale articulare în pre și postoperator la 6 luni pentru pacienții supuși acestor procedee terapeutice.

În perioada 2013-2016 am efectuat un număr de 427 de artroscopii de genunchi și gleznă în Clinica Ortopedie-Traumatologie Cluj-Napoca, Secția II. Din acești pacienți, 197 (46%) au prezentat leziuni de cartilaj articular, de diferite grade și extinderi. Dintre acestea am selectat grupul de studiu de 75 de pacienți pe baza diagnosticului intraoperator de leziune de cartilaj articular de grad Outerbridge III sau IV, fie izolată, fie în asociere cu altă patologie.

Metodele terapeutice au fost aplicate în funcție de indicațiile fiecăroră (descrise mai amplu în capitolul de tratament al leziunilor de cartilaj). Metodele au fost următoarele: debridarea (regularizarea marginilor leziunilor), microfracturile subcondrale, transplantul osteocondral (mozaicplastie), aplicarea unor membrane de colagen sau acid hialuronic peste microfracturi subcondrale, injectarea intraarticulară de celule stem multipotente din concentratele de măduvă osoasă BMC.

Concluziile au fost următoarele:

- Leziunile condrale sunt întâlnite cu o frecvență foarte ridicată, însă doar o mică parte necesită tratament de specialitate (în jur de 17%)
- Leziunile de cartilaj trebuie avute în vedere în orice afecțiune articulară care necesită tratament (leziuni de menisc. leziuni ligamentare, etc)
- Debridările și microfracturile subcondrale nu aduc beneficiul scontat în cele mai multe cazuri
- Procedeele mai complexe aduc cele mai mari beneficii și oferă posibilitatea restaurării unor suprafețe largi (în jur de 4 cm²)
- Implanturile osteocondrale dau rezultate mult mai bune față de procedeele fără implant, în special în combinație cu celule.
- Ingineria tisulară reprezintă etalonul pentru procedeele de reparare cartilaginoasă.

Originalitatea și contribuțiile inovative ale tezei

Studiul va aduce reale beneficii pe plan științific, pornind de la promisiunea acestor terapii cu celule stem, care reprezintă o speranță pentru viitor în tratamentul defectelor focale de cartilaj articular și nu numai, exemplele putând merge către tratamentul artrozelor, întârzierilor în consolidare/pseudartrozelor, infecțiilor osteoarticulare, etc.

Studiul va contribui la aprofundarea înțelegerii rolului MSC în tratamentul leziunilor de cartilaj articular și va permite îmbunătățirea posibilităților de tratament intervențional prin dezvoltarea de metode cu cost și morbiditate minime și eficiență maximă. De asemenea, va putea servi ca bază pentru algoritmi de diagnostic și tratament al leziunilor cartilaginoase în practica curentă. Studiul pilot de testare a fezabilității utilizării celulelor din LAF este premergător unui studiu mai amplu, de testare a utilizării acestor celule în tratamentul artrozei, și ale cărui concluzii ar trebui să fie mult mai relevante.

Dacă și alte rezultate vor demonstra, fracțiunea fluidă a lipoaspiratului va putea fi folosită mai departe ca sursă de celule stem mezenchimale cu aplicații în multiple domenii: ortopedie, chirurgie generală, plastică și reparatorie sau vasculară, având avantajul unei relative simplități și a rapidității metodei de separare a LAF din lipoaspirat. Elementele inovative ale cercetării noastre sunt reprezentate de:

- procedeul de separare a LAF, format din celule stem și substanțe nutritive cu efect de stimulare;
- utilizarea celulelor provenite din LAF pentru repararea condrală;
- tehnica de reparare utilizând celule stem însămânțate pe membrana de colagen I/III (cu posibilitate de utilizare și dezvoltare în cadrul unei „one step procedure”);
- utilizarea în premieră a membranei de colagen I/III MatriBone demineralizată;
- compararea directă a celor două tipuri de celule stem prin prisma rezultatelor obținute;
- realizarea modelului matematic virtual pornind de la imagistica prin CT a genunchiului de oaie, care va putea fi folosit pentru analiză cu element finit;
- efectuarea IRM cu aparatul de 7 Tesla a revelat detalii structurale de o claritate microscopică, demonstrând potențialul de utilizare al acestuia pentru explorarea structurii cartilajului articular și osului subcondral;
- introducerea în practica clinică curentă a terapiilor de regenerare a țesutului cartilagos, folosind scaffold-uri colagenice și celule mezenchimale multipotente, care oferă posibilitatea efectuării unor veritabile „artroplastii biologice”;
- obținerea unor rezultate încurajatoare în ceea ce privește regenerarea țesutului cartilagos prin injectarea concentratelor de celule stem, ceea ce dă o speranță pacienților care suferă de degradarea cartilajului.

PhD THESIS ABSTRACT

Modern therapeutic approaches for repair of articular cartilage lesions

PhD Student **Horea Rareș Ciprian Benea**

PhD Coordinator **Prof. Dr. Gheorghe Tomoaia**



UMF
UNIVERSITATEA DE
MEDICINĂ ȘI FARMACIE
IULIU HAȚIEGANU
CLUJ-NAPOCA

CONTENT

INTRODUCTION	17
CURRENT STATE OF KNOWLEDGE	21
1. Normal articular cartilage	21
1.1. Anatomy and histology	21
1.1.1. Generalities	21
1.1.2. Types of cartilage	21
1.1.3. Articular cartilage composition	22
1.1.3.1. Chondrocytes	22
1.1.3.2 Extracellular matrix of articular cartilage	23
1.1.4. Histological structure of articular cartilage	26
1.2. Physiology of articular cartilage	28
1.2.1. Chondrogenesis	28
1.2.2. Metabolism	28
1.2.3. Mechanical properties of articular cartilage	29
1.2.4. Extracellular matrix remodeling	30
2. Physiopathology of cartilage lesions	31
2.1. Response of chondral tissue to lesions – spontaneous reparation	31
2.2. Traumatic lesions	32
2.3. Ischemic lesions	33
2.4. Associated factors to chondral injuries	34
2.5. Iatrogenic lesions	35
2.6. Degenerative lesions –osteoarthritis physiopathology	36
3. Diagnostic of cartilage lesions	37
3.1. Clinic diagnostic elements	37
3.2. Paraclinic investigations	38
3.2.1. Radiology	38
3.2.2. Echography	38
3.2.3. Computerized tomography	38
3.2.4. Arthrography by computerized tomography and magnetic resonance	39
3.2.5. Magnetic resonance imaging (MRI)	39
3.2.6. Biological markers	40
3.2.7. Arthroscopy	40
4. Treatment of cartilage lesions	41
4.1. Conservative treatment	41
4.2. Surgical treatment	41
4.2.1. Direct treatment	42
4.2.1.1. Intraarticular lavage and chondral lesions debridement	42

4.2.1.2. Radiofrequency ablation	42
4.2.1.3. Microfractures (BMS - Bone Marrow Stimulation)	42
4.2.1.4. Osteochondral autograft transfer - OAT	43
4.2.1.5. Osteochondral allograft transplantation	44
4.2.1.6. Xenografts	44
4.2.1.7. Loco-regional pediculate osteochondral graft transfer	44
4.2.1.8. Biphasic osteochondral prosthetic implants	44
4.2.1.9 Prosthetic arthroplasty	44
4.2.2. Tissue engineering elements	45
4.2.2.1. Autologous chondrocyte implantation - ACI	45
4.2.2.2. Mesenchymal multipotent stem cells	46
4.2.2.3. Scaffolds with practical utilization	47
4.2.3. Corrective treatment of associated factors	48
4.2.3.1. Solving ligamentous instability	48
4.2.3.2. Realignment osteotomies	48
4.2.3.3. Treatment of protective factors	48
PERSONAL CONTRIBUTION	49
1. Work hypothesis / Objectives	51
2. General methodology	53
3. Study 1. In vitro behavior of mesenchymal stem cells on different biomaterials	55
3.1. Introduction	55
3.2. Work hypothesis	55
3.3. Material and methods	55
3.3.1. Cellular biologic material	56
3.3.2. Tested biomaterials	56
3.3.3. Morphologic characterization of collagen matrix surface	57
3.3.4. Evaluation of cellular adhesion, proliferation degree and migration capacity of mesenchymal stem cells on demineralized MatriBone Ortho implants	57
3.3.5. Evaluation of cellular adhesion and cytotoxicity on biomaterials	58
3.4. Results	59
3.4.1. Stem cells population characterization	59
3.4.2. Evaluation of cellular adhesion and migration capacity of mesenchymal stem cells on demineralized MatriBone Ortho implants	61
3.4.3. Morphologic characterization of collagen matrix surface	62
3.4.4. Comparative microscopically evaluation of plate cellular adhesion on biomaterials	66
3.4.5. Scanning electron microscopy (SEM) evaluation of cellular adhesion and cytotoxicity on biomaterials	66
3.5. Discussions	68
3.6. Conclusion	69

4. Study 2. Lipoaspirate fluid derived stem cells use for the treatment of cartilage defects. Pilot study on rabbit model.	71
4.1. Introduction	71
4.2. Work hypothesis	72
4.3. Material and methods	72
4.3.1. Ethical statement	72
4.3.2. Implants	72
4.3.3. Cells isolation	73
4.3.4. Cells seeding on collagen membranes	73
4.3.5. Animals and hosting	73
4.3.6. Surgical technique	74
4.3.7. Results evaluation	75
4.3.8. Data analysis	76
4.4. Results	76
4.4.1. Macroscopic evaluation	77
4.4.2. Histologic evaluation	78
4.4.3. Gene expression analysis	78
4.4.4. Micro CT scanning	79
4.5. Discussions	79
4.6. Conclusions	80
5. Study 3. Comparative assessment of healing focal lesions of articular cartilage in an animal model by using stem cells from the iliac crest versus stem cells from adipose tissue	81
5.1. Introduction	81
5.2. Work hypothesis/objectives	81
5.3. Material and methods	82
5.3.1. Ethical statement	82
5.3.2. Animals and experimental environment	82
5.3.3. Group randomization	82
5.3.4. Preoperative preparation	83
5.3.5. Harvest, separation, concentration and characterization of stem cells	84
5.3.5.1. Harvesting BMC	84
5.3.5.2. Harvesting ASC	86
5.3.5.3. Harvesting PRP	86
5.3.6. Implants preparation	86
5.3.7. Experimental surgical technique	87
5.3.8. Results evaluation criteria	88
5.3.8.1 Macroscopic evaluation	88
5.3.8.2. Microscopic evaluation	88
5.3.8.3. Immunohistochemically evaluation	89

5.3.8.4. Imagistic evaluation	89
5.4. Results	90
5.4.1. Macroscopic and microscopic evaluation	90
5.4.2. Immunohistochemically evaluation	94
5.4.3. Imagistic evaluation	94
5.4.3.1 Radiologic investigation	94
5.4.3.2. CT scan	95
5.4.3.3. Magnetic resonance imaging (MRI)	95
5.5. Discussions	96
5.6. Conclusions	97
6. Study 4. Static analysis with finite elements on the sheep knee treated by osteochondral reconstruction	99
6.1. Introduction	99
6.2. CT scan images evaluation	100
6.2.1. Methodology	100
6.2.2. CT scan images evaluation results	101
6.2.3. Partial general conclusions	102
6.3. 3D knee reconstruction	102
6.3.1. FEA static analysis conditions	103
6.3.2. FEA static simulation results	103
6.4. Conclusions	107
7. Study 5. Retrospective observational study on articular cartilage lesions treated in clinical practice	109
7.1. Introduction	109
7.2. Work hypothesis/objectives	109
7.3. Material and methods	110
7.4. Results	112
7.4.1. Clinical cases	115
7.5. Discussions	122
7.6. Conclusions	122
8. General conclusions (synthesis)	123
9. Thesis originality and innovative contributions	127
REFERENCES	129
APPENDIX	146

KEY WORDS: Articular cartilage; Treatment; Reconstruction; Mesenchymal stem cells; Osteochondral implants; Collagen; Autologous biological therapies; Osteochondral transplantation; Mathematical model; Finite element.

INTRODUCTION. CURRENT STATE OF KNOWLEDGE

At present, the pathology and treatment of cartilage lesions represents a field of intensive research, both at the laboratory and clinical level. Restoring articular cartilage through hyaline tissue formation is still a challenge both for surgeons and researchers. There are no broad-batch clinical or lab studies to establish objective conclusions about the best therapeutic methods.

The morphological and metabolic characters of cartilaginous tissue have prompted a lively interest among both clinicians and researchers. The failure of classical methods of treatment has led to the search for biological solutions in the attempt to heal injuries. There is an increasingly focus on the necessity of restoring the cellular capital and not only the fundamental substance. The potential of stem cells development towards the cartilaginous line is recognized, but also towards the recovery of the subchondral bone, the essential element of support and nutrition for the cartilage. Direct use of cartilage cells is also attempted to proliferate locally at the defect level under the influence of different biological stimuli without the need for laboratory cultivation.

Moreover, the development of implants with biological role in the repair of osteochondral tissue, support scaffolds capable of receiving mesenchymal stem cell elements (multipotent somatic precursor cells located in the perivascular areas of the connective stroma of adult tissues) to be directed under the influence of biological factors, cytokines, specific growth factors, towards the recovery of cartilaginous and bone cells is more and more tested.

These therapies bring us already in the field of regenerative medicine, which is an area of intensive development that makes an important contribution to the medical sciences. Here, the tissue engineering of bio composite materials has found a breeding place for an extensive development. Along with biomaterials, stem cells are key points of regenerative medicine, and their ability to differentiate and renew makes them essential for tissue repair and organ regeneration in the living organism.

Most procedures based on the use of mesenchymal stem cells are time-consuming, technically difficult and require multiple interventions and *ex vivo* handling, thus involving high costs, risk of contamination and local infections. The ideal procedure should be a single-step with minimal tissue manipulation. In this regard, cells derived from bone marrow (BMCs) and adipose tissue (ASCs) are a kept promise, as we will further on see.

PERSONAL CONTRIBUTION

Work hypothesis / Objectives

I have decided to develop the research in a field of topical science, namely the stem cell autologous biological therapies with potential to be used to restore articular cartilage injuries. These therapies are already used in current practice and encouraging results have been reported.

I planned to develop a therapeutic method, as simple as possible from a technical point of view, as fast and less aggressive, and as effective as possible in the treatment of articular osteochondral lesions.

Achieving good results through an animal model study would create the premise of validating this “one-step surgery”. This would represent a true novelty in the field of articular cartilage surgery and would have every chance of successful implementation in current practice, being practically the goal of various research that is currently taking place worldwide. Furthermore, the population impact would be huge, given that joint pain affects millions of people.

In this respect, we have designed five studies the objectives of which are as follows:

- Assessing the possibilities of applying stem cell based treatments, both in the animals and in the clinic
- Assessing the behavior of stem cells on certain materials that could be used as scaffolds
- Testing the feasibility and applicability of stem cell chondral repair procedures
- Comparative evaluation of the results of these therapies by methods of histological, molecular, medical imaging investigation
- Testing new materials and procedures for cellular sampling
- Developing virtual mathematical patterns for finite element analysis
- Assessing the incidence and outcome of the chondral pathology in patients treated by arthroscopic methods
- Translating therapeutic procedures from the laboratory, on animals and then to the human medicine clinic.

Study 1. *In vitro* behavior of mesenchymal stem cells on different biomaterials

The main objective of our *in vitro* study focused on the isolation of mesenchymal stem cells from the adipose tissue and haematogenous bone marrow, their characterization, the evaluation of biocompatibility, cell adhesion, cytotoxicity and proliferation and migration ability on various biomaterials studied, including a newly developed collagen biomaterial, firstly tried *in vitro* and *in vivo*. Through these

experiments, we intended to demonstrate that this new type of collagen scaffold is biocompatible, does not exhibit residual cytotoxicity and allows for good adherence and proliferation of mesenchymal stem cells.

Following our study on the isolation of mesenchymal stem cells (MSCs) from the iliac crest bone marrow (BMC on an ovine animal pattern) using the Concemo® kit and the assessment of cell function on demineralized MatriBone Ortho biomaterial, the following conclusions can be drawn:

- isolated cells from the haematogenous bone marrow and adipose tissue can be easily processed using the Concemo® kit, but the immunophenotypic results indicate a fairly wide variability between the samples harvested and analyzed;
- until the first subcultivation, the cultures showed a marked heterogeneity, with the predominance of the round and the fusiform cells, with the culture confluence on average 14 days after the isolation;
- positivity was recorded for the CD44 mesenchymal marker after the first passage, the global analysis indicating an average of $96.67 \pm 3.20\%$;
- the degree of attachment and proliferation on demineralized MatriBone Ortho was significantly higher compared to the control culture;
- the cells present a comparable degree of attachment on the B3 implant to the B4 implant (Chondro-Gide) after 3 days, which is currently a reference implant for the treatment of articular cartilage defects;
- the results of the assessment of the migration potential on the demineralized MatriBone Ortho show statistically significantly better results compared to the control culture.
- We recommend the cultivation and transplantation of mesenchymal stem cells on the demineralized MatriBone Ortho implant, which is biocompatible, has no residual cytotoxicity and allows for good adherence and proliferation of mesenchymal stem cells.

Study 2. Use of stem cells derived from fluid lipoaspirate for the treatment of cartilage defects. Pilot study on rabbit pattern.

Lately, the idea of obtaining stem cells directly from the liquid fraction LAF of the lipoaspirate fluid has been supported by relatively simple mechanical procedures, and these cells could be, at least theoretically, useful and valuable for cell-based therapies, as well as those obtained by laboratory processing of processed lipoaspirate PLA.

The aim of the study was to evaluate and compare the chondral-regenerative properties of the lipoaspirate fluid cells and lipoaspirate cells processed in the

laboratory on a preclinical knee cartilage defect pattern on trochlea of 6 cm in diameter, in rabbits. The study hypothesis was that LAF would have trophic effects on the regenerative cartilage due to the presence of plastic stem cells along the soluble molecules.

All experiments were conducted in accordance with the current practice guides and were approved by the Ethics Committee of "Iuliu Hațieganu" UMF from Cluj-Napoca, Romania, with the approval no. 340 / 05 June 2015 and in accordance with the EU Directive 63/2010 and Law 43/2014 in Romania. Collagen type I / III membranes (*Chondro-Gide®*, *Geistlich Pharma AG*) have been used for the surgical implantation procedure, and they were impregnated with mesenchymal stem cells isolated from fat tissue originating from human donor, 1×10^5 LAF and PLA.

Nine New Zealand Crl:KLB adult male white rabbits were used, the average age of 15 months (12-18 months), weighing 3.750 ± 0.6872 kg. (average ± 0.2173 DS), which were divided into three groups of 3: in group A (control group) the defect was filled with non-seeded collagen matrix, in group B the LAF cell-seeded matrix was used, and in group C the matrix was seeded with PLA cells. The animals were euthanized three months postoperatively, when the following results were obtained:

- macroscopy: the highest Wayne score was obtained in the LAF group, with an average of 11.3 out of 16, with a statistically significant difference between groups ($p = 0.0041$).
- histology: in group B, more abundant hyaline cartilage, with intact and more regular surface, lower cellularity, better reconstruction of the subchondral bone, with less fibrous tissue and almost complete adhesion of the adjacent bone, in comparison with the PLA group.
- gene expression: in group B, the level of significance of ACAN gene expression was highest compared to groups A and C ($p < 0.00051$). Regarding the expression of COL2A1 and SOX-9 genes, it was statistically highly significant compared to group A ($p < 0.0005$) and statistically significant to group C ($p < 0.05$).
- micro CT scan: we observed almost total restoration of articular cartilage layer thickness and subchondral bone trabeculation, more pronounced in the LAF group.

The conclusions of this study were as follows:

- Stem cells derived from adipose tissue are valuable choices for osteochondral repair.
- LAF-derived stem cells appear to have slightly better activity and effects than PLA cells regarding the cartilage repair, and are also helped by trophic molecules in the fluid.

- LAF cells can be quickly separated by minimal tissue manipulation, so they are cheaper and more suited for single-step surgical procedures.

Study 3. Comparative assessment of healing focal lesions of articular cartilage in an animal pattern by using stem cells from the iliac crest versus stem cells from adipose tissue

The purpose of the study was to evaluate the effectiveness of methods using multipotent mesenchymal stem cells (MSC) to heal focal defects of articular cartilage. The first objective was to create the methods of harvesting stem cells from concentrated aspirate from iliac crest (BMC - Bone Marrow Concentrate) and adipose tissue (ASC - Adipose derived Stem Cells) on an ovine model and characterize the cell population obtained. The second objective was to create interventional methods on 15 ovine specimens by creating cartilage defects of 8 mm diameter to the subchondral bone at the central portion of the medial femoral condyle of the left knee and repairing them by specific techniques involving a new type of collagen scaffold (demineralized MatriBone Ortho) and MSC from BMC (Group A - 6 sheep), ASC (Group B - 6 sheep) and subchondral micro-fractures (Group C - 3 sheep, control group). The third objective was to perform a comparative clinical, anatomic-pathological and medical imaging analysis of the evolution of focal lesions of articular cartilage 7 months after the stem cell repair interventions.

In order to conduct the study, I obtained the approval of the Ethics Committee of "Iuliu Hațieganu" UMF from Cluj-Napoca, registered with the number 237 / 19 June 2014, and the experiments were carried out in compliance with the EU Directive 63/2010 and Law 43/2014 in Romania. The surgical interventions were carried out within the surgical unit of the USAMV Cluj-Napoca Clinic Surgery Department by a mixed team of veterinary surgeons, orthopedic surgeons from "Iuliu Hațieganu" UMF in Cluj-Napoca, assisted by biologists specialized in biological products, especially mesenchymal stem cells.

Macroscopic, microscopic elements, immunohistochemistry, CT and 7 Tesla MRI imaging were analyzed. The conclusions were as follows:

- Multidisciplinary team research is the premise of achieving the best results for the development of complex therapies in osteoarticular disorders
- The sheep is a very good animal model for therapeutic procedures on the locomotor system, in particular on the treatment of osteochondral lesions, which can go further for the study of degenerative joint diseases (arthrosis)
- Methods of bone marrow stem cell extraction from the iliac crest and from the adipose tissue are also feasible in sheep, resulting in multipotent mesenchymal cell populations with osteochondral regenerative potential

- Regeneration of cartilaginous hyaline tissue is possible with tissue of the same quality, not just fibrocartilage
- Procedures involving one-stage repair without cell manipulation and laboratory processing are the most effective in terms of the complexity of the therapeutic act but also from an economic point of view
- Mesenchymal stem cells offer real possibilities for treatment of focal cartilage defects, with or without the involvement of the underlying bone
- Mesenchymal stem cells from BMC and ASC clearly demonstrate their superiority against local mesenchymal cells in the subchondral layer
- For better efficacy, it is necessary to use implants to support these cells, but also to restore the architecture of collagen fibers from bone and cartilage
- The collagen implant tested for the first time meets the necessary features to be used as a support for osteochondral regeneration, delivering very good histological, medical imaging and clinical results
- BMC cells perform better in bone and cartilage regeneration than ASC cells, but the latter should be considered due to good results and relative ease in harvesting and processing. Their activation with PRP autologous platelet concentrate increases their repairing potential
- The results of the study are encouraging, demonstrating the vast research potential of this field, but it is necessary to continue with extensive experimental studies on larger animal models of therapeutic methods and to assess their clinical applicability on wider scale
- Use of effective imaging techniques to evaluate results, such as MRI, CT, should be encouraged, thus avoiding the slaughter of animals
- It is necessary to find simple, reproducible methods with minimal morbidity and risks, cheaper, but with better results and reduced complications.

Study 4. Static analysis with finite elements on the sheep knee treated by osteochondral reconstruction

The objective of these research was to develop mathematical models using FEA (Finite Element Analysis) methods, with a high degree of fidelity in the representation of real anatomical forms of the femur, tibia and covering cartilage. The study evaluates the effect of static stresses by comparing the distribution of stresses in cartilage, cortical bone and trabecular bone in the treated area of the defect as a result of the *in vivo* tests on sheep presented in the previous chapter.

The novelty of this study is given by the use of FEA assays on bone structures and cartilage at 7 months postoperatively after application of the 3 distinctive

treatments (treatment only with type I / III collagen implants, collagen and stem cells from adipose tissue, collagen and stem cells from the bone marrow). The treated area was located in the left medial femoral condyle cartilage, the central region of maximum convexity. Unlike other studies that analyzed the effect of stress on osteoarticular system by FEA methods, the current study also describes the effects of possible trauma that may occur on bone tissue or cartilage postoperatively by applying a pressure higher than 0.76 MPa. At the same time, the distribution of stresses in the bone tissues loaded with a pressure considered normal for sheep (0.38 MPa) is analyzed.

Conclusions: In the scenarios simulated with 1120 N (normal) and 2240 N (excessive) forces, it is demonstrated that there is no tension in the cortical bone of the femur or tibia that is close to its breaking limit, in reality being less than 50 MPa.

From the FEA simulations on Case 0 - healthy, it results that cartilage behaves like a compressible and elastic material that absorbs tension and distributes it into adjacent bone tissue. This cartilage behavior is similar to that of the periodontal ligament. After applying an excessive static force, the healthy femoral cartilage is loaded with a tensile strength of 3 MPa upon contact with the cartilage of the tibia. Similar results have been obtained in Case 2, where the cartilage has a tensile strength varying between 0.5-3 MPa, which is considered normal for cartilage contact. After applying the treatment from Case 2, the cartilage is restored 6 months postoperatively, and normal movements distribute tensile strengths in the tissue similar to Case 0 - healthy. Complex movements involving high forces could affect regions in the trabecular bone restored.

The collagen present in the defect 6 months postoperatively is loaded with cortical bone stress and distributes them directly to the other tissues it comes in contact with, resulting in high stresses in both the trabecular bone of the femur and the cartilage. This phenomenon could damage especially the side walls of the newly formed cartilage of the femur, but also the tibia cartilage with which it comes into direct contact, visible in Cases 1 and 3. The behavior of collagen to drive stresses is explained by its stiffness, compared to elastic tissues (spongy bone and cartilage). In Cases 1 and 3, after applying a force of 2240 N, the new cartilage formed in the defect area is loaded with tensile strengths reaching some areas at 5-7 MPa. This level of tension may damage the cartilage.

The presence of collagen in the defect area leads to an increase in overall deformations in both normal situations (1-2 mm) and after applying an excessive pressure (1-3 mm). When assessing the biomechanical response of cartilage treated *in vivo* on animals, FEA studies may help to make clinical decisions about the method and the materials that can be applied in treating human cases, knowing that without effective intervention, the progressive loss of affected cartilage could be fostered.

Study 5. Retrospective observational study on articular cartilage lesions treated in clinical practice

Biological therapeutic methods have been proposed over the past years, that involve the use of multipotent stem cells and biological materials supporting tissue regeneration, which seem to yield superior outcomes as compared to "classical" methods. In this regard, the hypothesis of this study is that patients receiving such treatments will have at least the same results as those already validated for the same type of injury. Thus, the aim of the study was to assess comparatively the preoperative and postoperative functional scores at 6 months for patients undergoing these therapeutic procedures.

In the period 2013-2016 we performed 427 knee and ankle arthroscopies in the Orthopedic-Traumatology Clinic from Cluj-Napoca, Department II. Of these patients, 197 (46%) had articular cartilage lesions of varying degrees and extensions. We selected among these the study group of 75 patients based on the intraoperative diagnosis of Outerbridge III or IV articular cartilage lesion, either isolated or in combination with another pathology.

Therapeutic methods were applied according to their particular indications (described more extensively in the chapter addressing the treatment of cartilage lesions). The methods were the following: debridement (regularization of lesions edges), subchondral micro-fractures, osteochondral transplantation (mozaicplasty), application of collagen or hyaluronic acid membranes over the subchondral micro-fractures, intra-articular injection of multipotent stem cells from BMC bone marrow concentrates.

The conclusions were as follows:

- Chondral lesions are encountered at a very high frequency, but only a small part requires specialized treatment (around 17%)
- Cartilage lesions should be considered in any joint disease requiring treatment (meniscus lesions, ligament lesions, etc.)
- Subchondral debridement and micro-fractures do not bring the expected benefit in most cases
- More complex processes bring the greatest benefits and offer the possibility of restoring large surfaces (about 4 cm²)
- Osteochondral implants give far better results than implant-free procedures, especially in combination with cells.
- Tissue engineering is the standard for cartilage repair procedures.

Originality and innovative contributions of the thesis

The study will bring real scientific benefits, from the promise of these stem cell therapies, which is a hope for the future in the treatment of focal joint cartilage defects and not only, examples that can lead to the treatment of arthrosis, delays in consolidation / pseudo- arthrosis, osteoarticular infections, etc.

The study will help deepen the understanding of MSC's role in the treatment of articular cartilage lesions and will enable the improvement of interventional treatment options by developing methods with minimal cost and morbidity and maximum efficacy. It will also serve as the basis for algorithms for the diagnosis and treatment of cartilage lesions in current practice. The pilot study on testing the feasibility of using LAF cell is a precursor to a broader study regarding the testing the use of these cells in the treatment of arthrosis, and the findings of which should be more relevant.

If other results demonstrate it, the fluid fraction of lipoaspirate may be further used as a source of mesenchymal stem cells with applications in multiple fields: orthopedics, general surgery, plastic and repair or vascular surgery, having the advantage of relative simplicity and rapidity of the separation method of LAF from the lipoaspirate. The innovative elements of our research are represented by:

- LAF separation process, consisting of stem cells and stimulating nutrients;
- using LAF cells for chondral repair;
- repair technique using stem cells seeded on the collagen I / III membrane (capable of being used and developed in a "one step procedure");
- the use for the first time of demineralized MatriBone collagen I / III membrane;
- direct comparison of the two types of stem cells in terms of the results obtained;
- creation of the virtual mathematical pattern based on the CT imaging of the sheep knee, which can be used for finite element analysis;
- MRI with the 7 Tesla machine revealing structural details of microscopic clarity, demonstrating its potential for use to explore the structure of articular cartilage and subchondral bone;
- introducing cartilage tissue regeneration therapies in the current clinical practice using collagen scaffolds and multipotent mesenchymal cells, which offers the possibility of making real "biological arthroplasties";
- obtaining encouraging results on the regeneration of cartilage tissue by injecting stem cell concentrates, this gives hope to patients suffering from cartilage degradation.