

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ, FARMACIE, ȘTIINȚE ȘI TEHNOLOGIE „GEORGE
EMIL PALADE” DIN TÂRGU MUREȘ

ȘCOALA DE STUDII DOCTORALE

TEZĂ DE DOCTORAT

ABSTRACT

Studiul adaptabilității, comportamentului și funcțiilor osteoblastelor pe substraturi ortopedice moderne

Doctorand: **Andrei-Marian FEIER**

Conducător de doctorat: **Prof. Univ. Dr. Tiberiu BĂȚAGĂ**

TÂRGU MUREȘ, 2022

INTRODUCERE

În prezent, la nivel global și național, industria endoprotezelor ortopedice înregistrează o creștere exponențială a numărului de dispozitive implantate anual, fiind în strânsă corelație cu incidența crescută a patologiilor degenerative. Desigur, este de așteptat supraaglomerarea sistemelor globale de sănătate, dar și o creștere a cererii de materiale endoprotetice cu proprietăți osteogenice îmbunătățite. În acest context, necesitatea cercetărilor și studiilor inovatoare care stau la baza obținerii de materiale ortopedice moderne cu înveliș de suprafață și proprietăți mecanice îmbunătățite devine imperativă.

Primul pas în acest demers este o înțelegere mai îndeaproape a proceselor fizice, mecanice și de sinteză ale acestor materiale, de la momentul fabricării lor până la studierea caracteristicilor lor *in vitro*. Un alt pas extrem de important este studiul tipurilor de implanturi adaptate pentru a conferi un grad ridicat de biocompatibilitate și pentru a analiza interacțiunea acestora cu țesuturile și celulele umane.

OBIECTIVE

Prezenta teză de doctorat a avut ca scop principal studierea adaptabilității, comportamentului și funcțiilor celulelor osteoblaste însămânțate în contact cu substraturi ortopedice moderne pentru a standardiza etapele necesare analizelor de biocompatibilitate *in vitro*. Pentru atingerea acestui obiectiv au fost stabilite și alte obiective secundare, printre care:

- (a) stabilirea unui protocol standardizat pentru obținerea de celule stem mezenchimale derivate din țesutul osos și diferențierea lor spre linia osteoblastică;
- (b) confirmarea unui protocol standardizat de stocare (crioconservare) a celulelor stem mezenchimale pentru utilizarea lor ulterioară;
- (c) dezvoltarea unui protocol standardizat privind un număr optim de celule osteoblaste care trebuie cultivate pe substraturi pentru analizele de biocompatibilitate.

MATERIALE ȘI METODE

Utilizarea țesutului osos uman, dar cu atât mai mult a celulelor umane, în scopuri de cercetare este o activitate responsabilă din punct de vedere moral și etic. Din acest motiv, după stabilirea ipotezei de lucru, primul pas a fost obținerea avizului Comisiei de Etică a Universității de Medicină, Farmacie, Științe și Tehnologie „George Emil Palade” din Târgu-Mureș și a Comitetului de Etică al Spitalului Clinic Județean din Mureș. După răspunsul favorabil primit din partea celor două comitete, studiile au fost schițate astfel:

(a) un prim studiu care a presupus elaborarea și adaptarea unui protocol standardizat de obținere a celulelor stem mezenchimale derivate din țesutul osos și diferențierea lor față de linia osteoblastelor împreună cu stocarea lor pe perioade lungi (crioconservare); a fost stabilit un ghid pas cu pas de la sala de operație până la laboratorul de cercetare;

(b) un al doilea experiment, care s-a concentrat pe stabilirea unui protocol

standardizat privind un număr optim de celule osteoblaste necesar a fi însămânțate pe substraturi atunci când sunt utilizate pentru analizele de biocompatibilitate; osteoblastele au fost însămânțate în numere diferite (3×10^4 , 6×10^4 , 1×10^5) pe un material martor și morfologia lor a fost evaluată la diferite intervale de timp (1, 3, 7 și 10 zile).

(c) a treia analiză, bazată pe studii comparative de biocompatibilitate, a urmărit să studieze adaptabilitatea, comportamentul și funcțiile celulelor osteoblaste care au fost puse în contact cu substraturi ortopedice moderne, prin analiza biomarkerilor fosfatază alcalină (FA) și proteine totale (PT) și imagini obținute în microscopie confocală. Materialele ortopedice moderne studiate (obținute prin metoda imprimării 3D și electrofilării) au fost următoarele: PCC - polistiren de cultură celulară; Ti-titan ortopedic; PEI 1% HAp- Polieterimidă ranforsată cu 1% hidroxiapatită; PEI 15% HAp- Polieterimidă ranforsată cu 15% hidroxiapatită; PLA 100 μm - acid polilactic cu dimensiunea interporoasă de 100 μm ; PLA 60 μm - acid polilactic cu dimensiunea interporoasă de 60 μm .

REZULTATE

Cea mai importantă constatare a primului nostru studiu a fost faptul că recoltarea de țesut osos rezidual și obținerea de celule osteoblaste primare derivate din țesutul osos uman este profund dependentă de respectarea unui protocol adecvat al unui mediu steril și aseptice, de tehnica osteotomiei colului femural, dar și referitor la transportul țesutului rezidual din sala de operație către laboratorul de cercetare.

Un număr maxim de 50.000 de osteoblaste este optim pentru a fi însămânțate pentru fiecare probă în studii care implică testarea biocompatibilității. Dacă materialele au o rugozitate redusă, acest număr poate fi diminuat la 20.000 de osteoblaste/probă. În cazul în care studiul are ipoteza unei analize pe termen lung al comportamentului osteoblastelor, inclusiv analiza fazei de mineralizare, se recomandă utilizarea unui număr de 20.000 de osteoblaste/probă de la început.

Cei doi biomarkeri analizați în studiul actual de biocompatibilitate au avut variații diferite în funcție de timpul total de contact cu materialele dar și în funcție de natura și structura diferită a fiecărui material. Analiza rezultatelor efectuată după 24 și 72 de ore de incubare pe materialele testate relevă caracteristici particulare pentru fiecare material. Cel mai biomaterial biocompatibil în ceea ce privește FA și PT combinat cu rezultatele imaginilor de microscopie confocală a fost PLA 60 μm ($p < .0001$, CI 95%).

CONCLUZII

Până acum nu au fost definite o serie de caracteristici care determină în ce măsură proprietățile unui material influențează activitatea celulară. În timp ce populațiile de celule se pot adapta la schimbările din mediile lor chimice, mecanice și structurale, în prezent nu există un model care să caracterizeze toți acești factori simultan. Pe baza rezultatelor analizelor de biocompatibilitate prezente, cercetătorii în colaborare cu clinicienii pot oferi pacienților un sistem hibrid terapeutic care constă din grefe sintetice populate cu celule stem mezenchimale autologe și implantarea acestora în zone anatomiche de interes.