

Grant T_D CNCSIS 305/2007

DEZVOLTAREA UNOR BIOTEHNOLOGII DE CULTIVARE A UNOR CELULE UMANE ÎN SCOPUL APLICĂRII LOR ÎN PRACTICA MEDICALĂ

În ultimii ani, s-au făcut eforturi pentru descoperirea de materiale noi și biocompatibile [1]. Marea majoritate sunt implanturi pe baza de titan [2] și ceramici [3, 4]. Posibila lor citotoxicitate este determinată prin teste pe culturi de celule. Practic la nivel internațional cercetările de biocompatibilitate pe materiale implantabile osoase sunt numeroase și de înaltă tinută științifică. Astfel, o căutare pe Google referitoare la acest domeniu de cercetare ne conduce la 243 000 de referințe bibliografice.

Titanul (Ti) este considerat un material aproape inert și bine tolerat, care în condiții optimizate este capabil de osteointegrare în țesutul osos. Mai mult, Ti permite formarea unui strat bogat în fosfat de calciu pe suprafața lui, precum și a unui film subțire și stabil de oxid, care-i conferă pasivitate.

Deși Ti este considerat un metal biocompatibil, *in vitro* și *in vivo*, ionii Ti^{4+} inhibă *in vitro* activitatea osteoclastică și reduc sinteza proteinelor osteoblastice [5]. Într-un studiu ce utilizează o linie celulară osteoblastică umană MG-63, definită ca osteoblaste proliferante, Shida și colab. [6] au arătat că ionii Ti^{4+} induc producția IL-6 și activează astfel osteoclastogeneza. În plus există date care indică apariția dermatitei de contact ca răspuns la implantarea Ti.

Nichelul (Ni) este cunoscut prin toxicitatea lui și capacitatea de a produce alergii, în ciuda faptului că este un element esențial al organismului uman (component al unor metaloproteine). Ionii de Ni^{2+} cresc proliferarea osteoblastelor derivate din maduva osoasă de iepure, dar inhibă maturarea lor, activitatea fosfazei alcaline și întârzie mineralizarea [7]. În plus, Ni^{2+} inhibă enzime din sistemul de apărare antioxidantă ce neutralizează speciile reactive de oxigen [8].

Aliajul metalic NiTi (Nitinol) prezintă efectul memoriei formei SME (*shape memory effect*), în care forma și rigiditatea lui este controlată termic, fiind un material capabil să sesizeze o modificare în temperatura externă și să fie transformat într-o formă preprogramată. Mai mult, datorită supraelasticității, aceste implanturi pot fi expuse la distorsiuni continue. Datorită conținutului înalt în nichel al aliajului NiTi, există posibilitatea ca datorită coroziunii să aibă loc dizolvarea Ni din aliaj și să aibă efecte nefavorabile. Deși există multe studii privind biocompatibilitatea NiTi au rămas probleme nerezolvate privind efectele *in vivo* după o lungă perioadă de implantare, carcinogenicitatea etc. [9].

Rezistența la coroziune a aliajelor biocompatibile utilizate în implanturile ortopedice are o importanță deosebită, nu numai datorită creșterii duratei de viață a dispozitivului implantat dar și datorită faptului că procesul de coroziune are efecte nocive asupra organismului. Se știe că produsii rezultați în urma coroziunii afectează metabolismul și comportamentul celular.

Ti6Al4V este cel mai frecvent aliaj pe baza de Ti utilizat în implantologie cu toate că există o serie de probleme încă nerezolvate legate de efectele pe care le pot avea componentele aliajului. Ionii metalici eliberați în urma procesului de coroziune și uzura pot induce pierderea protezei după o perioadă lungă de la implantare, în special datorită potențialelor efecte adverse ale vanadiului. Din această cauză, s-au investigat o serie de aliaje pe baza de Ti (Ti-Al-Nb, Ti-Zr-Al) [10, 11] și s-a demonstrat că aliajul Ti6Al6Nb are proprietăți comparabile cu aliajul Ti6Al4V, dar prezintă o mai mare tărie și rezistență la coroziune [12]. Studiile *in vitro* au arătat că celulele se comportă diferit în prezența debriurilor generate de uzura celor 2 aliaje. Astfel se constată o eliberare crescută a prostaglandinei E2 ca răspuns la contactul cu particulele Ti6Al4V, dar o intensificare a eliberării altor citokine inflamatorii comparativ cu particulele Ti-Al-Nb. Aceste date sugerează că Ti6Al4V stimulează celulele fagocitice mai mult decât Ti-Al-Nb sau Ti.

Expunerea celulelor provenite din maduva osoasă la particulele Ti-Al-V induce o creștere semnificativă a eliberării mediatorilor proinflamatorii și osteolitici care sunt responsabili de pierderea protezelor [13].

Ceramicile pe baza de fosfați de calciu sunt hidroxiapatita (HA), sintetică sau derivată din corali și fosfatul tricalcic (TCP). Aceste materiale, utilizate pentru acoperirea implanturilor sau umplerea unor defecte, se prepară la temperaturi și presiuni mari pentru a se obține ceramice dense, înalt cristaline și

inerte. Ambele ceramice sunt osteoconductive, lipsite de un potential osteogenic intrinsec, inalt biocompatibile, dar difera prin raspunsul biologic dezvoltat la situsul implantat - TCP este indepartat pe masura ce noul tesutul osos se dezvolta, in timp ce HA ramane permanent. Ele sunt usor accesibile, lipsite de un potential infectios sau imunogenic și reduc semnificativ morbiditatea [14].

In prezent se fac eforturi pentru imbunatatirea proprietatilor lor mecanice, permiterea migrarii celulelor, penetrarea noului tesut si fluxul substantelor nutritive dupa implantare [15].

Obiectivele și activitățile de cercetare din cadrul programului:

Ob.1. Evaluarea *in vitro* a biocompatibilității materialelor implantabile

Act.1.1. Optimizarea condițiilor de cultivare, congelare și decongelare a liniei celulare de osteoblaste.

Act.1.2. Studii de viabilitate celulară (testul MTT) și citotoxicitate (măsurarea eliberării lactat dehidrogenazei –LDH-) în mediul de cultură

Ob.2. Studii de adeziune celulară a osteoblastelor pe suporturile de testat (material, suport de plastic)

Act.2.1. Evidențierea prin imunocitochimie a receptorilor (integrine $\beta 1$) implicați în adeziunea osteoblastelor la MEC sintetizată suporturi

Act.2.2. Adsorbția FN pe materialul de testat și pe suportul de plastic, comparativ, prin imunofluorescență

Ob.3. Studiul expresiei proteinelor citoscheletului și evidențierea efectului suporturilor de testat asupra acestor proteine

Act.3.1. Imunodetecția în fluorescență a actinei și filamentelor intermediare (tubulina, vimentina)

Act. 3.2. Imunodetecția în fluorescență a vinculinei, o proteină majoră din adeziunile focale ale osteoblastelor

Ob.4. Evidențierea expresiei markerilor specifici osteoblastelor pe suporturile de testat

Act.4.1. Evidențierea activității fosfatazei alcaline exprimată de celulele aderate de suporturi

Act.4.2. Studiul expresiei markerilor specifici osteoblastelor: colagenul de tip I și osteocalcinul

Ob.5. Evaluarea turnover-ului matricei extracelulare în prezența și absența materialelor de testat

Act.5.1. Evidențierea prin gelatin zimografie a MMP exprimate în mediul de cultură

Act.5.2. Analiza TIMPs prin western blotting

Bibliografie

1. Ruano, R., Jaeger, R.G., Jaeger, M.M., Effect of a ceramic and a non/ceramic hydroxyapatite on cell growth and procollagen synthesis of cultured human gingival fibroblasts, J. Periodontol., 71, 540-545, 2000.

2. Nagai, M., Hayakawa, T., Fukatsu, A., Yamamoto, M., Fukumoto, M., Nagahama, F., Mishima, H., Yoshinari, M., Nemoto, K., Kato, T., In vitro study of collagen coating of titanium implants for initial attachment, Dent. Mater. J., 21, 250-260, 2002.

3. Mustafa, K., Oden, A., Wennerberg, A., Hultenby, K., Arvidson, K., The influence of surface topography of ceramic abutments on the attachment and proliferation of human oral fibroblasts, Biomaterials, 26, 373-381, 2005.

4. Ozen, J., Ural, A.U., Dalkiz, M., Beydemir, B., Influence of dental alloys and an all-ceramic material on cell viability and interleukin-1beta release in a three-dimensional cell culture model, 5urk. J. Med. Sci., 35, 203-208, 2005.

5 Thompson, G.J., Puleo, D.A. Ti-6Al-4V ion solution inhibition of osteogenic cell phenotype as a function of differentiation timecourse in vitro. Biomaterials, 17,1949-1954, 1996.

6 Shida, J., Trindade, M.C., Goodman, S.B., Schurman, D.J., Smith, R.L. Induction of interleukin-6 release in human osteoblast-like cells exposed to titanium particles in vitro. Calcif. Tissue Intern., 67,151-155,2000.

7 Morais, S., Sousa, J.P., Fernandes, M.H., Carvalho, G.S. In vitro biomineralization by osteoblast like cells. I. Retardation of tissue mineralization by metal salts. Biomaterials, 19, 13-21, 1998.

8 Kapanen, A., Biocompatibility of orthopedic implants on bone forming cells, Dissertation Thesis, University of Oulu, 2002

9 Kujala, S., Biocompatibility and biomechanical aspects of Nitinol shape memory metal implants, Dissertation Thesis, University of Oulu, 2003

- 10 Yu SY, Scully JR, Vitros CM. Influence of niobium and zirconium alloying additions on the anodic dissolution behavior of activated titanium in HCl solutions. *J Electrochem. Soc* 148:B 68-78, 2001.
- 11 Lopez MF, Gutierrez A, Jimenez JA. Surface characterization of new non-toxic titanium alloys for use as biomaterials. *Surf Sci* 482:300-5, 2001.
- 12 Kobayashi E, Wang TJ, Doi H, Yoneyama T, Hamanaka H. Mechanical properties and corrosion resistance of Ti-6Al-7Nb alloy dental casting. *Mater Sci: Mater Med* 9:567-74, 1998
- 13 Wilke A, Endres S, Gris P, Herz U. Cytokine profile of a human bone marrow cell culture on exposure to titanium-aluminum-vanadium particles. *Z. Orthop Ihre Grenzgeb* 14 (1) : 83-9, 2002
- 14 Vaccaro, A.R., The role of the osteoconductive scaffold in synthetic bone grafts, *Orthopedics*, 25, 571-578, 2002
- 15 Bohner, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements. *Injury*. 31 (supp4), S37-S47, 2000.