



**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ
CLUJ-NAPOCA
ȘCOALA DOCTORALĂ
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ**



BERCE CRISTIAN

REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT

**Conducător științific:
PROF. DR. DR. H.C. IOAN ȘTEFAN GROZA**



**UNIVERSITATEA DE ȘTIINȚE AGRICOLE ȘI
MEDICINĂ VETERINARĂ
CLUJ-NAPOCA
ȘCOALA DOCTORALĂ
FACULTATEA DE MEDICINĂ VETERINARĂ**



BERCE CRISTIAN

**CERCETĂRI PRIVIND INTEGRAREA CELULELOR
PROGENITORE OSOASE ÎN STRUCTURI DE
MATERIALE BIOCOMPATIBILE ȘI APLICABILITATEA
ACESTORA ÎN TERAPIA REGENERATIVĂ**

(REZUMAT AL TEZEI DE DOCTORAT)

**Conducător științific:
PROF. DR. DR. H.C. IOAN ȘTEFAN GROZA**

Introducere

În ultimii zece ani, biotehnologia manipulării celulelor stem a evoluat considerabil, acestea fiind deja folosite în medicina regenerativă și în terapia unor boli oncologice precum leucemia. Din multitudinea de surse de celule stem mezenchimale (MSCs), cele mai ușor de obținut prin metode puțin invazive sunt celulele stem mezenchimale din placenta (hPMSCs), care pot fi recoltate cu ușurință în momentul nașterii, fără a leza integritatea organismului donator. Placenta reprezintă o sursă de MSCs relativ nou descoperită și chiar dacă numărul MSCs din placenta este mai mic decât cel din măduva osoasă, izolarea și cultivarea lor se face cu ușurință. Aplicabilitatea acestora poate fi extinsă în arii medicale precum ortopedia, neurochirurgia sau chirurgia buco-maxilo-facială. Integrarea unor aliaje biocompatibile ar putea fi favorizată și accelerată de prezența celulelor sușă cu o imunogenitate scăzută pe suprafața acestora și care au capacitate de diferențiere spontană.

1. Structura cercetărilor

Teza cuprinde un număr de 179 pagini și este structurată în conformitate cu prevederile legale actuale în 8 capitole și o anexă. În partea I - stadiul actual al cunoașterii, sunt prezentate cele mai importante și concludente date din literatura de specialitate referitoare la celulele stem mezenchimale, regenerarea sistemului osos, biocompatibilitatea osoasă și tehnologiile de prototipare rapidă, informațiile fiind împărțite în 3 capitole. În partea a II-a, compusă din 5 capitole, sunt prezentate cercetările proprii care au vizat cultivarea celulelor stem mezenchimale placentare umane (hPMSCs) pe suprafața unor materiale biocompatibile pe bază de titan și implantarea acestor structuri hibride în două modele animale pentru a evalua modul în care aceste celule ar interacționa cu un organism gazdă și modul în care ar putea stimula regenerarea osoasă. Lista bibliografică cuprinde un număr de 237 titluri de lucrări științifice din literatura de specialitate.

2. Scopul cercetărilor

În prezenta teză ne-am propus studierea capacității celulelor stem, recoltate din placenta umana, de a contribui la elaborarea unor substituiți osoși în vederea creșterii bioactivității unor biomateriale.

Pentru a îndeplini acest deziderat, ne-am propus următoarele obiective:

- elaborarea unui protocol de cultivare *in vitro* a hPMSCs obținute din corionul placentar pe suprafața unor materiale biocompatibile pe bază de titan, reprezentate de aliaje Ti-Al-Nb, Ti-Al-Nb infiltrat cu hidroxiapatită și Ti-Al-Nb infiltrat cu dioxid de siliciu și evaluarea adeziunii și diferențierii spontane a acestora în funcție de materialul pe care au fost cultivate;
- elaborarea unui protocol de testare a toxicității *in vivo*, conform normelor ISO-10993, a acestor biomateriale cultivate cu hPMSCs și evaluarea diferențierii acestor celule *in vivo* și validarea analizei hematologice ca metodă de caracterizare a răspunsului imun al organismului;
- elaborarea unui model animal de testare a biomaterialelor cultivate cu hPMSCs în cadrul sistemului osos și evaluarea grefării acestora prin metode imagistice și microscopice.

Prezentul studiu, prin obiectivele propuse, poate aduce contribuții importante la stadiul actual al cunoașterii scoțând astfel în evidență unele elemente de noutate privind biologia celulelor stem mezenchimale placentare umane după implantarea lor *in vivo*, cunoscut fiind faptul că acestea sunt supresoare naturale a sistemului imun, chiar dacă sunt xenogene, fiind transplantate într-o altă specie. Aspectele de noutate se traduc și prin obținerea unor rezultate concludente privind felul în care suportul pe care aceste celule sunt cultivate poate influența biologia și diferențierea lor *in vitro* și *in vivo*.

3. Rezultate și discuții

În Capitolul V, intitulat ”Cultivarea ”*in vitro*” a celulelor stem mezenchimale pe suprafața biomaterialelor luate în studiu”, s-a stabilit ca și scop evaluarea *in vitro* a capacității celulelor stem mezenchimale placentare umane de a adera la suprafața unor biomateriale testate în prealabil pentru biocompatibilitatea lor față de osteoblaști. Biomaterialele care au fost testate au fost reprezentate de aliaje de titan-aluminiu-niobiu (TiAlNb), titan-aluminiu-niobiu infiltrat cu hidroxiapatită (TiHA) și titan-aluminiu-niobiu infiltrat cu dioxid de siliciu (TiSi). Pentru a realiza acest deziderat, s-au trasat următoarele obiective: cultivarea unui număr cunoscut de hPMSCs pe suprafața biomaterialelor luate în studiu și cuantificarea viabilității celulare prin testul cu fluorescein diacetat și prin numărarea

celulelor aderente; identificarea capacității de diferențiere a hPMSCs înspre linia osteogenică prin cultivarea lor pe suporturile de biomateriale în medii de cultură osteogenice; evaluarea diferențierii spontane a hPMSCs cultivate pe biomaterialele luate în studiu și compararea acestei diferențieri spontane față de diferențierea produsă în mediile osteogenice prin colorații imunocitochimice, identificându-se markeri specifici ai celulelor stem precum ICAM-1 și markeri specifici ai diferențierii osteogenice precum osteopontin (OP) și fosfataza alcalina (PA); identificarea prezenței unei matrice extracelulare calcificate prin colorația alizarin-red; identificarea markerilor specifici diferențierii osteogenice din mediul de cultură recoltat prin teste ELISA.

În cazul evaluării viabilității celulare, comparând rezultatele obținute în funcție de timpul determinării realizate, s-a observat că viabilitatea hPMSCs cultivate au variat, constituind unele tenduri în care ar putea fi încadrate acestea în funcție de biomaterialele pe care au fost cultivate. Astfel, s-a observat că, inițial, hPMSCs cultivate pe suprafața discurilor de aliaj titan-aluminiu-niobiu au avut o viabilitate scăzută, aceasta crescând treptat aproape până la nivelul celulelor cultivate în godeurile martor. Celulele stem mezenchimale placentare umane au avut o FCR (Fluorescență celulară relativă) mai ridicată în lotul TiHA față de cele din lotul TiAlNb la două ore după cultivare, însă aceasta a scăzut treptat, identificându-se, astfel, un trend de scădere a viabilității celulare în lotul cu hidroxiapatită. Celulele aderente la suprafața discurilor din lotul TiSi au avut inițial cea mai ridicată viabilitate, însă aceasta a scăzut la 24 de ore după cultivare, menținându-se în platou și la 4 zile.

Prin numărarea celulelor aderente s-a identificat gradul de adeziune pe care aceste celule îl exprimă față de biomaterialele luate în studiu. La 2 ore după cultivare, cea mai intensă adeziune a hPMSCs față de biomaterial a fost identificată în lotul TiSi față de godeurile martor. La 24 de ore după cultivare, trendul identificat în lotul TiSi prin colorațiile realizate la 2 ore s-a menținut. La 4 zile după cultivare s-a menținut trendul identificat și în celelalte numărători de celule aderente. Cel mai mare număr de celule a fost identificat în lotul TiSi. Un fenomen interesant a fost identificat prin vizualizarea celulelor aderente la suprafața plăcii de cultură peri-biomaterial. Morfologia hPMSCs din loturile TiAlNb și TiSi a fost identificată ca fiind cea specifică celulelor stem mezenchimale, având aspect fibroblastoid. În cazul lotului TiHA, acest aspect nu a fost observat. Celulele aveau un aspect alungit, stelat, secretând în mod evident o matrice extracelulară indicând un proces de diferențiere celulară. Natura acestei diferențieri a fost relevată prin colorațiile imunocitochimice realizate și prin identificarea unor markeri specifici diferențierii osteogenice.

Pentru identificarea unei eventuale diferențieri osteogenice spontane a hPMSCs cultivate pe biomaterialele luate în studiu sub influența materialelor pe care au fost cultivate s-au realizat colorații imunocitochimice urmărindu-se prezența unor markeri specifici. Pentru a avea un termen de comparație, aceste celule au fost cultivate pe aceleași suporturi metalice în medii osteogenice.

La o oră după cultivare s-a urmărit identificarea markerului ICAM-1 (CD54) care este specific celulelor stem mezenchimale, inclusiv celor de origine placentară. Astfel, s-a identificat pozitivitate pentru ICAM-1 (FITC) în toate loturile luate în studiu. În cazul lotului TiAlNb, expresia ICAM-1 a fost mai intensă în mediile de cultură osteogenic simplu și complex, față de mediul de cultură uzual pentru celule stem mezenchimale. În lotul TiHA, expresia markerului specific celulelor stem mezenchimale ICAM-1 a fost mai intensă în mediul de cultură uzual și în cel osteogenic simplu, față de mediul osteogenic complex, indicând o diferențiere celulară timpurie înspre linia osteogenică în acest mediu de cultură. În lotul TiSi, cea mai intensă expresie a markerului ICAM-1 a fost evidențiată în mediul de cultură uzual, în celelalte două medii fiind aproape absentă. Acest fenomen ar putea însemna o diferențiere timpurie a acestor celule înspre linia osteogenică, ca și lotul menționat anterior.

La 24 de ore după cultivare s-a urmărit identificarea fosfatazei alcaline (FITC) care este un marker identificat în celulele stem pluripotente, dar nu și în cele multipotente precum hPMSCs și a fibrelor de actina-F (TRITC). În schimb, fosfataza alcalină este de asemenea un marker specific osteoblaștilor. În lotul TiAlNb, s-a identificat o pozitivitate intensă a fosfatazei alcaline pe discurile cultivate cu hPMSCs din mediul de cultură uzual și cel osteogenic simplu, față de cel osteogenic complex. În lotul TiHA, cea mai intensă fluorescență a fosfatazei alcaline a fost vizualizată în probele cultivate în mediul uzual, în celelalte două medii de cultură identificându-se doar fenomene de autofluorescență, iar în lotul TiSi expresia fosfatazei alcaline a fost mai intensă în mediile de cultură osteogenice simplu și complex, față de mediul uzual.

La 3 zile după cultivare s-a urmărit identificarea osteopontinului (TRITC) și a fosfatazei alcaline (FITC). Osteopontinul, numită și sialoproteina 1, este o proteină non-colagenoasă și un marker specific lineajului osteoblastic. În lotul TiAlNb cea mai intensă expresie a osteopontinului a fost indentificată în probele cultivate în mediul osteogenic simplu, iar în cel complex, expresia acestui marker a fost aproape absentă. Mediul de cultură uzual pentru celule stem mezenchimale a dovedit o flourescență moderată a osteopontinului marcat cu fluorocromul TRITC, indicând o diferențiere spontană a hPMSCs spre linia osteogenică. Lotul TiHA s-a asemănat foarte mult cu lotul TiAlNb,

întâlnindu-se o expresie marcantă a osteopontinului în probele cultivate în mediul osteogenic simplu și în mediul uzual, fiind practic absentă în mediul osteogenic complex. Lotul TiSi a relevat o fluorescență uniformă ca intensitate și frecvență în toate mediile de cultură folosite.

În vederea determinării fotocolorimetrice a depozitelor de calciu extracelular s-a realizat colorația Alizarin Red după 21 de zile de cultivare a hPMSCs pe suprafața biomaterialelor luate în studiu în mediile de cultură menționate anterior.

În cazul loturilor experimentale cultivate în mediul standard pentru celule stem mezenchimale s-a identificat un depozit de calciu foarte intens în lotul TiHA, acesta având valorile cele mai ridicate dintre toate loturile experimentale din mediile de cultură utilizate. În loturile experimentale cultivate în mediul osteogenic simplu, s-au obținut date relevante din punct de vedere statistic doar în loturile TiHA și TiSi, indicând un proces de mineralizare extracelulară în aceste loturi. Totuși, valorile obținute au fost mult mai mici față de cele obținute de la loturile cultivate în mediul standard. În cazul discurilor cultivate în mediul osteogenic complex, s-au obținut date relevante din punct de vedere statistic în toate loturile experimentale. La fel ca și în loturile anterioare, valorile obținute au fost mult mai reduse față de cele obținute de la probele cultivate în mediul uzual.

Prin analiza ELISA a mediilor de cultură recoltate, s-au identificat niveluri de osteopontin cu semnificație statistică față de godeurile martor negativ, în loturile TiHA din mediul de cultură standard, fenomen care ar fi în concordanță cu rezultatele obținute anterior.

Biomaterialele luate în studiu nu au prezentat citotoxicitate față de hPMSCs cultivate pe suprafața lor, fapt dovedit prin prezența acestor celule la suprafața materialelor la 4 zile după cultivare. Hidroxiapatita, sau mai degrabă ionii de calciu și de fosfor din componența hidroxiapatitei au proprietatea de a induce diferențierea celulelor stem mezenchimale înspre linia osteogenică în primele 24-48 de ore după cultivarea acestora într-un mediu care conține hidroxiapatită, această diferențiere producându-se în absența unui mediu osteogenic. Scăderea exponențială a numărului de hPMSCs detectabil prin testul cu FDA în loturile TiHA s-ar putea datora în primul rând unei diferențieri celulare induse de către hidroxiapatita infiltrată în aliajul de titan. Aceste date pot fi puse în strânsă legătură cu morfologia celulară diferită a hPMSCs cultivate pe suporturile TiHA la 4 zile după cultivare, cu rezultatele obținute prin efectuarea colorațiilor imunocitochimice și identificarea pozitivității pentru PA și OP, dar mai ales cu rezultatele testului ELISA prin care s-au identificat niveluri de OP extracelular decelabile doar în lotul TiHA cu mediu de cultură standard pentru celule stem

mezenchimale. În loturile cultivate în mediul de cultură standard și mediul de cultură osteogenic complex cel mai ridicat nivel al calciului din ECM a fost identificat în lotul TiHA fapt care confirmă din nou proprietățile osteogenice ale hidroxiapatitei asupra celulelor nediferențiate și faptul că acest element mineral accelerează procesul de diferențiere celulară și de mineralizare, celulele având un substrat calcic pe care îl pot utiliza pentru sinteza o matrice extracelulară mineralizată. Procesul de mineralizare identificat în loturile cultivate în mediile osteogenic simplu a fost relativ scăzut față de martorul negativ. Acest fenomen poate fi explicat prin faptul că dexametazona prezentă în mediile de cultură osteogenice interacționează în mod direct cu procesul de mineralizare a matricei extracelulare, inhibând-o. Rezultatele obținute prin identificarea OP din mediile de cultură confirmă datele obținute anterior și anume proprietățile osteogenice ale suporturilor fabricate din aliajul de titan-aluminiu-niobiu infiltrat cu hidroxiapatită.

În **Capitolul VI**, intitulat ”**Studiul toxicologic in vivo**”, s-a stabilit ca și scop testarea *in vivo* a bioactivității materialelor studiate prin conceperea și obținerea unui model animal accesibil efectuării studiilor experimentale pentru a identifica reacția unui organism viu după implantarea celulelor stem mezenchimale cultivate pe suprafața unor biomateriale. Pentru a realiza acest deziderat, s-au trasat următoarele obiective: urmărirea modificărilor parametrilor hematologici: numărul total al leucocitelor (WBC), formula leucocitară (LYM, MID, GRA), numărul total al hematiilor (RBC), numărul de trombocite (PLT); analiza histopatologică a țesutului format în proximitatea materialelor implantate conform sistemului impus de normele ISO-10993, prin identificarea infiltratului leucocitar, neovascularizatiei, fibrozei și a infiltratului adipos. Identificarea unei eventuale diferențieri *in vivo* a hPMSCs cultivate pe suprafața materialelor implantate.

După analiza statistică a rezultatelor hematologice s-au identificat modificări statistice semnificative ($p < 0.05$) în cei doi timpi ai recoltării, la 48 de ore, respectiv 14 zile după implantare. Valorile parametrilor hematologici analizați s-au încadrat în limite normale, iar în unele cazuri le-au depășit pe acestea. Pentru o mai bună înțelegere a rezultatelor obținute acestea au fost expuse în tabelul 1, valorile cu semnificație statistică fiind marcate cu *, ** sau *** în funcție de relevanță.

Tabel 1. Rezultatele analizei hematologice

Table 1. Hematologic analysis results

Recoltare Collection	LOT Group	WBC (6.5-19,5 x 10 ⁹ /l)	LYM% (55-97 %)	MID% (0,0-5 %)	GRA% (2-31 %)	RBC (5.3-10 x 10 ¹² /l)	PLT (500-1370 x 10 ⁹ /l)
48 de ore 48 hours	TiAlNb	9.154 ± 0.6370	57.15 ± 2.577	8.800 ± 0.9803	34.02 ± 1.597	6.652 ± 0.04091	1040 ± 30.92
	TiAlNb- MSC	9.590 ± 0.4365	80.62 ± 2.241 ***	4.100 ± 1.107 *	15.22 ± 1.142 ***	7.438 ± 0.1015 ***	1042 ± 13.14
	TiHA	13.83 ± 1.380	59.05 ± 0.5850	5.050 ± 0.7115	35.90 ± 1.297	7.732 ± 0.3219	1204 ± 91.88
	TiHA-MSC	6.290 ± 0.3974 *	64.00 ± 3.771	3.220 ± 0.1281 *	32.51 ± 3.976	6.580 ± 0.1702 *	872.0 ± 25.46 **
	TiSi	7.302 ± 0.2990	63.70 ± 0.6325	6.300 ± 0.1581	30.02 ± 0.4587	7.058 ± 0.05161	1083 ± 55.55
	TiSi-MSC	6.195 ± 0.1976 *	72.10 ± 0.3479 ***	6.500 ± 0.2530	21.40 ± 0.6008 ***	7.255 ± 0.04585 *	969.5 ± 105.5
14 zile 14 days	TiAlNb	11.65 ± 0.7400	77.10 ± 2.205	5.553 ± 1.408	17.33 ± 0.8058	8.935 ± 0.1360	1259 ± 62.89
	TiAlNb- MSC	12.12 ± 0.4079	84.70 ± 0.2214 **	0.7000 ± 0.03162 **	14.60 ± 0.1897 *	9.020 ± 0.1012	1442 ± 5.218 *
	TiHA	10.82 ± 1.135	71.53 ± 0.8523	7.527 ± 1.901	20.93 ± 1.332	8.540 ± 0.4208	1632 ± 10.45
	TiHA-MSC	7.850 ± 0.5882 *	80.85 ± 0.1803 ***	0.6533 ± 0.03887 **	18.47 ± 0.2395	8.590 ± 0.1316	1408 ± 32.03***
	TiSi	9.965 ± 0.5392	78.00 ± 1.708	5.650 ± 1.597	16.35 ± 0.1107	9.321 ± 0.01661	1080 ± 52.81
	TiSi-MSC	8.690 ± 0.3384	77.15 ± 1.376	3.900 ± 1.044	18.95 ± 0.3320 ***	8.760 ± 0.2024	1405 ± 31.46 ***

Din punct de vedere histopatologic, examinările efectuate au relevat o serie de fenomene și reacții tisulare specifice față de un material considerat ca fiind biocompatibil și au evidențiat proprietățile unor celule stem mezenchimale placentare xenogene implantate într-un model animal murin. Prin evaluarea histologică a țesuturilor de neofomație din proximitatea implanturilor din lotul TiAlNb și TiSi s-a observat o capsulă fibroconjunctivă densă care a înglobat aceste structuri metalice, fiind prezente și numeroase celule fibroblastice și un infiltrat limfoplasmocitar redus, fără a se identifica reacții granulomatoase de corp străin importante. În cazul loturilor TiAlNb-MSC și TiSi-MSC, precum și în lotul TiHA-MSC, structura histologică a țesuturilor peri-implantare a fost diferită față de loturile martor. Cel mai evident fenomen identificat a fost faptul că țesutul fibroconjunctiv

dens a fost înlocuit de un țesut conjunctiv lax cu aspect de țesut mezenchimal. Acesta reprezintă un tip de țesut caracterizat de o substanță fundamentală în cadrul căreia se interpun celule cu formă fusiformă și stelată, slab diferențiate, care nu prezintă polaritate. Celulele mezenchimale din componența acestui țesut au capacitatea de a se diferenția în țesuturi specifice sistemelor limfatice și circulatorii, precum și țesuturi conjunctive, osoase sau cartilajinoase. De asemenea, fibrele de collagen dispuse în vârtej, identificate în toate loturile cu hPMSCs sunt specifice unui țesut nediferențiat sau unui țesut în proces de organizare. În loturile TiHA-MSK s-au putut identifica noduli de calcifiere care în mod normal ar fi dus la formarea de os ectopic, iar rezultatele obținute au fost diferite față de lotul martor dovedind, astfel, influența pe care hPMSCs au avut-o asupra reacției organismului gazdă la aceste implanturi, chiar dacă aceste celule au fost xenogene. Un fenomen interesant a fost apariția celulelor tinere cu aspect blastoc în toate loturile experimentale. Aceste celule reprezintă o populație celulară parțial diferențiată, de obicei unipotentă, avându-și originea în celulele stem mezenchimale. Blaștii au capacitatea de a se diferenția în: mieloblaști, megacarioblaști, promegacariocite, melanoblaști, limfoblaști, normoblaști, angioblaști și timocite. Totuși, prezența acestor blaști nu indică neapărat un proces de malignizare a celulelor stem transplantate, acestea fiind identificate în 18% dintre pacienții suferinzi de diverse forme de leucemii care au beneficiat de un transplant de celule stem.

Un fenomen interesant, identificat prin evaluarea procentajului de monocite din formula leucocitară, a fost faptul că în toate loturile cu hPMSCs, mai ales la 14 zile după implantare, nivelurile monocitelor circulante au fost puternic inhibitate. Celulele dendritice sunt celule accesorii sistemului imun având funcția de a prelua antigene, de a le procesa și de a le transmite mai departe limfocitelor T. Acestea se încadrează în 3 subtipuri dintre care cele din subtipul I se aseamănă morfologic cu monocitele din care își au originea și reprezintă 0.1% până la 2% din celulele nucleate prezente în sângele periferic. Diverse studii in vitro au evidențiat faptul că celulele stem mezenchimale inhibă diferențierea monocitelor în celule dendritice de tip I. Loturile cu hPMSCs prezentau un nivel mai redus al granulocitelor circulante. În privința acestui aspect, literatura de specialitate raportează faptul că, în cazul transplantării de celule stem la pacienții suferinzi de leucemie, după efectuarea radiochimioterapiei mieloablative, neutrofilele sunt ultimele celule care ajung la valori hematologice normale. S-a dovedit că aceste celule stem inhibă maturarea neutrofilelor, celule care reprezintă 40 – 60% din totalul granulocitelor sangvine.

În **Capitolul VII**, intitulat ”**Testarea in vivo a biomaterialelor cultivate cu celule stem**”, s-a stabilit ca și scop elaborarea unui model animal accesibil efectuării studiilor experimentale pentru a identifica reacția țesutului osos după implantarea celulelor stem mezenchimale cultivate pe suprafața unor biomateriale. Pentru a realiza acest deziderat, s-au trasat următoarele obiective: analiza electronomicroscopică (SEM) a țesuturilor osoase adiacente implanturilor recoltate post-mortem; identificarea variațiilor atomice din cadrul țesutului osos peri-implant din piesele recoltate post mortem printr-un sistem de analize EDAX; analiza microtomografică a țesuturilor recoltate; determinarea densității minerale osoase (BMD) peri-implant; prelucrarea statistică a datelor obținute prin metodele enunțate.

Prin evaluarea electronomicroscopică a segmentelor de os recoltate s-au putut vizualiza unele elemente distinctive între loturile martor și loturile experimentale. De asemenea, osteointegrarea implantelor din ambele loturi a fost putut fi confirmată prin vizualizarea interfeței os-implant la o magnificație de 40x până la 800x. Nu s-au identificat zone de liză osoasă, care în mod normal, după 3 luni s-ar fi fibrozat. În loturile cu hPMSCs s-au identificat unele structuri cu morfologie celulară stelată care au proliferat pe suprafețele metalice neputând fi vizualizate la parametri optimi datorită faptului că refractau lumina albă a microscopului electronic, lucru întâmpinat cel mai des în cazul elementelor puternic încărcate cu ioni de calciu și fosfor. Structura chimică a acestor formațiuni a fost elucidată prin analiza EDAX confirmându-se conținutul ridicat de Ca și P. Aceste structuri nu au fost identificate în cazul probelor TiHA-MS. De asemenea, osul de novo a proliferat și pe suprafața implantului în loturile cu hPMSCs, fenomen care nu a fost întâlnit în loturile martor. Prin analiza EDAX a probelor recoltate s-au putut identifica elemente de origine organică pe suprafața implanturilor intraosoase.

Prin evaluarea microtomografică a fragmentelor de os recoltate s-a putut identifica morfologia corticalei osoase în toată grosimea ei peri-implant, prin secțiuni coronale, sagitale și transaxiale. Osteointegrarea implanturilor folosite a fost completă în toate loturile. S-au identificat diferențe morfologice semnificative între loturile experimentale față de cele martor. În loturile TiAlNb-MS și TiSi-MS s-au identificat cavități longitudinale în grosimea corticalei osoase. Acest lucru nu a fost valabil în cazul lotului TiHA-MS unde osteointegrarea implantului a fost superioară față de lotul martor.

Prin examinarea macroscopică a fragmentelor de femur recoltate împreună cu implanturile metalice de la loturile martor s-au identificat unele aspecte specifice reacției unui organism față de biomateriale. Acestea au fost reprezentate de formarea capsulei fibroconjunctive la suprafața implanturilor dând naștere unor aderențe fibroase între implant și țesutul periosteal. În cazul loturilor experimentale, aceste aderențe nu au fost prezente, periostul detașându-se cu ușurință. Aceste rezultate pot fi corelate cu rezultatele obținute în cadrul capitolului VI în care s-a identificat prezența unui țesut conjunctiv lax cu aspect mezenchimal în loturile experimentale, bogat în fibroblaști și celule nediferențiate, situat peri-implantar. Prin evaluarea electronomicroscopică a probelor recoltate s-a identificat un răspuns constant și uniform din partea organismului gazdă, în toate loturile. Au fost identificate și orificiile de vascularizație osoasă, semn al unui proces de revascularizație intensă a unui calus osos prezent înainte ca acesta să fie mineralizat. Aspectele care diferențiau loturile experimentale față de loturile martor au fost reprezentate de prezența osului de novo în șanțul de înșurubare al implantului, acesta fiind foarte bogat în orificii de vascularizație și prezența structurilor cu morfologie celulară pe suprafața implanturilor foarte încărcate cu săruri de Ca și P cu absența țesutului osos de novo sub formă de peliculă fină. Singura excepție de la acest fenomen a fost lotul TiHA-MSc în care s-a identificat os de novo pe suprafața implantului. Dintre celulele lineajului osteogenic, singurele celule care sunt încărcate puternic cu săruri de Ca și P sunt osteocitele, iar în susținerea acestui argument, literatura de specialitate menționează existența unor osteocite hipermineralizate. În consecință, prezența acestor structuri cu morfologie celulară stelată pe suprafața biomaterialelor implantate ar putea indica o diferențiere în osteocite a hPMSCs la 3 luni după implantare. Aceasta ipoteză poate fi susținută și de analizele EDAX efectuate prin care s-au identificat niveluri de Ca, P, Mg, S, Na, C, O și N mult mai ridicate pe suprafața biomaterialelor din loturile martor față de loturile experimentale indicând un proces de secreție a unei matrice extracelulare mineralizate. În lotul TiHA-MSc, aceste elemente nu au fost identificate. Structurile cu morfologie stelată au fost înlocuite de țesut osos de novo, iar implantul părea foarte bine osteointegrat, fenomen confirmat și prin evaluarea microtomografică a probelor. Datele obținute prin evaluările electronomicroscopice și prin analiza EDAX au fost confirmate prin vizualizarea țesutului osos peri-implantar în profunzimea lui prin metode microtomografice. Pe baza modificărilor observate, precum prezența cavitaților endo-osoase și a microfracturi nevindecate, s-a concluzionat că implanturile din loturile martor au fost mult mai eficiente osteointegrate cu excepția celor din lotul TiHA-MSc în care osteointegrarea s-a dovedit a fi mai eficientă decât în lotul TiHA

4. Concluzii generale

În urma cercetărilor efectuate în vederea elaborării unui protocol de cultivare a celulelor stem mezenchimale placentare umane pe suprafața biomaterialelor luate în studiu și evaluarea aplicabilității acestor construcții hibride in vivo, concluzionăm următoarele:

- hPMSCs au proprietatea de a adera la suprafața biomaterialelor luate în studiu și de a se diferenția;
- viabilitatea celulelor stem mezenchimale placentare umane este influențată de tipul de material pe care sunt cultivate. Această viabilitate este dinamică, evoluând sau involuând în timp, iar pe termen mediu cea mai bună viabilitate o prezintă celulele cultivate pe suporturi TiAlNb, confirmând literatura de specialitate;
- aliajul de titan-aluminiu-niobiu infiltrat cu hidroxiapatită induce diferențierea timpurie a hPMSCs înspre linia osteogenică fapt confirmat prin colorațiile imunocitochimice realizate;
- în mediul uzual, cel mai ridicat nivel al calciului extracelular a fost identificat în lotul TiHA confirmând din nou proprietățile osteogenice ale acestui material compozit; s-au identificat niveluri decelabile de calciu și în loturile TiSi indicând eventuale proprietăți osteogenice;
- implantarea subcutanată a materialelor cultivate cu celule stem mezenchimale s-a dovedit a fi o metodă eficientă de testare și evaluare a răspunsului imunologic al unui organism viu la aceste structuri implantate;
- s-a confirmat faptul că celulele stem transplantate în organismul gazdă au interacționat în mod direct cu sistemul imunitar al acestui organism, modificându-i unii parametri hematologici. Severitatea cu care aceste celule stem au influențat tabloul hematologic al animalelor luate în studiu a fost direct proporțional cu gradul de adeziune la nivelul implanturilor și cu viabilitatea celulară post-expunere la aceste implanturi, aspecte identificate în capitolul V;
- diferențierea acestor celule in vivo a fost uniformă în toate loturile experimentale, cu excepția lotului TiHA-MSc unde, alături de fibroblaști și celulele tinere cu aspect blastoc, au fost identificate și celule cu aspect osteoblastic
- obținerea nodurilor de calcifiere in vivo în loturile TiHA-MSc confirmă activitatea osteoblastică derivată din hPMSCs implantate. De asemenea, faptul că aceste formațiuni calcificate au fost prezente

doar în cazul implanturilor infiltrate cu hidroxiapatită ar putea sugera că modularea chimică a hPMSCs a fost influențată de prezența hidroxiapatitei;

- implantarea intraosoasă a biomaterialelor fabricate sub forma de implanturi dentare s-a dovedit a fi o metodă eficientă și ușor de realizat pentru a testa biocompatibilitatea unor materiale;

- dintre biomaterialele din loturile experimentale, cea mai bună biocompatibilitate osoasă a prezentat-o lotul TiHA-MSC. În concluzie prezența hPMSCs pe suprafața materialelor compozite pe bază de hidroxiapatită stimulează osteointegrarea acestora;

5. Recomandări

Ca urmare a studiului complex efectuat în prezenta teză de doctorat, în vederea realizării cercetărilor ulterioare referitoare la această temă, recomandăm următoarele:

- utilizarea mediului de cultura standard folosit în prezentul studiu pentru cultivarea celulelor stem mezenchimale pe suprafața biomaterialelor și a mediului osteogenic complex în cazul în care se dorește diferențierea acestora înspre linia osteogenică;

- utilizarea hidroxiapatitei pentru a induce diferențierea hPMSCs înspre lineajul osteoblastic in vitro;

- utilizarea analizei hematologice pentru evaluarea reacției inflamatorii față de biomaterialele implantate și pentru identificarea activității celulelor stem mezenchimale implantate;

- utilizarea suporturilor pe bază de hidroxiapatită cultivate cu celule stem mezenchimale placentare pentru obținerea mai facilă a țesutului osos ectopic;

- utilizarea microtomografiei pentru evaluarea gradului de osteointegrare al unui implant datorită posibilității vizualizării întregii structuri ososase pe secțiuni coronale, sagitale și transaxiale. De asemenea, recomandăm determinarea BMD pentru a identifica statusul țesutului osos peri-implantar.