Nanotuburi de TiO_2 spațiate utilizate că platforme pentru eliberare de medicamente și regenerare osoasă

-Rezumat etapă 2-

Activități etapă:

1. Reacția inflamatorie generată de macrofage la contactul cu TNT spațiate;
2. Stabilirea dozei optime de medicament necesară pentru îmbunătățirea vindecării osului și efectele sale în inflamație.

Titanul este un material larg utilizat în ortopedie datorită abilității sale de a se integra la nivelul țesutului și datorită biocompatibilității ridicate. Modificarea caracteristicilor fizico-chimice ale materialului poate promova diferențierea celulelor stem și stimula producerea de factori osteoblastici precum și formarea de țesut osos nou. Cu toate acestea, efectul generat de aceste suprafețe asupra celulelor imune este încă incomplet elucidat. Astfel, pentru a aborda în mod cuprinzător capacitatea de osteointegrare a implanturilor, este nevoie atât de evaluarea răspunsului celulelor osoase cât și al macrofagelor.

În acest context, prezentul proiect și-a propus evaluarea comparativă a comportamentului pre-osteoblastelor MC3T3-E1 și macrofagelor RAW 264.7 în contact cu suprafețele de titan (Ti) nemodificate și acoperite cu nanotuburi de TiO_2 clasice (TNT) sau spațiate (TNTs) pe fondul rezultatelor contradictorii din literatura de specialitate privind performanța biologică a acestor suprafețe nanostructurate. În plus, se are în vedere potențiala lor utilizare ca sisteme de livrare locală de compuși cu efect asupra metabolismului țesutului osos ce contribuie la îmbunătățirea osteointegrării implantului, un reprezentat în acest sens fiind simvastatina (SV).

În cadrul acestei a doua etape de implementare a proiectului NanoDelBone s-a evaluat răspunsul inflamator generat de celulele RAW 264.7 menținute în contact cu suprafețele de Ti, TNT și TNTs, în condiții standard sau în prezența unui stimul pro-inflamator reprezentat de lipopolizaharidul bacterian (LPS). Astfel, într-o primă abordare experimentală a fost evaluată capacitatea acestor materiale de a susține adeziunea, proliferarea și supraviețuirea celulară precum și caracteristicile morfologice ale celulelor. Totodată a fost evidențiată capacitatea

acestor suporturi de a induce formarea de celule gigant multinucleate *in vitro* și de a induce secreția de mediatori cu rol în inflamație: oxid nitric și citokine/chemokine pro- și anti-inflamatorii.

Testele *in vitro* utilizând linia celulară de macrofage murine RAW 264.7 au demonstrat că particularitățile structurale ale TNTs nu determină citotoxicitate și au capacitatea de a susține supraviețuirea și proliferarea celulară la un nivel aproximativ similar nanotuburilor clasice, atât în condiții normale cât și în prezența stimulului pro-inflamator. În ceea ce privește adeziunea celulară se observă o capacitate ușor mai scăzută a TNTs comparativ cu celelalte două suprafețe de a sprijini acest proces. Totuși, nu se constată modificări morfologice exceptând suprafața plană de Ti pe care se remarcă trăsături caracteristice activării macrofagelor (dimensiuni mai mari, plieri pronunțate ale membranei plasmatice, o capacitate crescută de etalare și numeroase pseudopode). Mai mult, în prezența LPS capacitatea de fuziune a macrofagelor scade în ordinea Ti>TNTs>TNT. Totodată, analizând rezultatele obținute la evaluarea nivelului de secreție a NO și al citokinelor/chemokinelor pro- și anti-inflamatorii se poate concluziona că Ti și TNTs generează, în general, un răspuns inflamator mai acut comparativ cu suprafața acoperită cu TNT clasice.

Cea de-a doua parte experimentală a vizat stabilirea unei doze optime de SV care să inducă răspunsuri ale osteoblastelor și macrofagelor cât mai favorabile osteointegrării. În acest scop au fost testate diferite doze de medicament în termeni de supraviețuire/proliferare celulară, în cazul ambelor linii celulare studiate. Totodată, a fost investigat efectul dozelor non-toxice de SV asupra diferențierii osteoblastelor și răspunsului inflamator al macrofagelor.

Rezultatele obținute au permis identificarea dozelor toxice și bioactive de SV și au evidențiat un efect ușor inhibitor al acesteia asupra proliferării celor două linii celulare testate, diferențele nefiind semnificative în raport cu controlul netratat (substratul de plastic). Totodată analiza efectelor dozelor netoxice de SV asupra diferențierii pre-osteoblastelor MC3T3-E1 (în termeni de expresie a fosfatazei alcaline intracelulare, formare a depozilor de calciu și a matricei colagenice) și a nivelului de sinteză și secreție al mediatorilor pro-inflamatori IL-1β, IL-6 și TNF-α de către macrofagele RAW 264.7 a demonstrat că o concentrație de 10^{-7}M SV este adecvată pentru inducerea unui răspuns celular favorabil osteointegrării implantului. Prin urmare, în etapa următoare a proiectului, suprafețele nanostructurate elaborate vor fi funcționalizate cu SV astfel încât sa se asigure aceasta concentrație.