

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului "CRISTOFOR SIMIONESCU"



# Suporturi biomimetice pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu cu incluziune de particule magnetice pentru regenerarea osoasă

Rezumatul tezei de doctorat

Conducător de doctorat : Prof. Dr. Ing. Ionel Marcel Popa

> Doctorand: Bioing. Florina-Daniela Ivan (Cojocaru)

# UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI R E C T O R A T U L

Către

Vă facem cunoscut că, în ziua de 01 iulie 2019, la ora 10<sup>00</sup> în Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului "Cristofor Simionescu", va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

# "Suporturi biomimetice pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu cu incluziune de particule magnetice pentru regenerarea osoasă"

elaborată de doamna Florina-Daniela IVAN (COJOCARU) în vederea conferirii titlului științific de doctor.

#### Comisia de doctorat este alcătuită din:

1. MĂLUȚAN Teodor, Prof. univ. dr. ing, Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași	președinte
2. POPA Ionel Marcel, Prof. univ. dr. ing, Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași	conducător
	de doctorat
3. VEREȘTIUC Liliana, Prof. univ. dr. ing, Universitatea de Medicină și Farmacie	referent oficial
"Grigore T. Popa" lași	
4. PROFIRE Lenuța, Prof. Dr. Farm, Universitatea de Medicină și Farmacie	referent oficial
"Grigore T. Popa" Iași	
5. LISA Gabriela, Prof. Dr. Ing, Universitatea Tehnică "Gheorghe Asachi" din Iași	referent oficial

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.



Secretar universitate, Juri Ing.Cristina Nagîţ

## Mulțumiri

"Nu urca munții ca lumea sa te vadă, urcă munții pentru ca tu să vezi lumea." David McCullough Jr.

La final de activitate stiințifică, cu emoție și recunosțință vreau să adresez cuvinte de mulțumire și sentimente de considerație coordonatorilor, colegilor, prietenilor și familiei, pentru ajutorul și încurajările lor.

Sincere mulțumiri, recunoștință și un deosebit respect am pentru domnul Prof. Dr. Ing. Ionel Marcel Popa, care m-a sprijint mereu și mi-a oferit sfaturi deosebit de valoroase pentru desfășurarea activităților aferente tezei. Mulțumesc pentru răbdarea acordată și disponibilitatea dumneavoastră!

Gânduri de recunoștință și mulțumiri se îndreaptă către Prof. Dr. Ing. Teodor Măluțan, Prof. Dr. Ing. Liliana Vereștiuc, Prof. Dr. Farm. Lenuța Profire, Prof. Dr. Ing. Gabriela Lisa care m-au onorat, în calitate de președinte, respectiv referenți, în comisia de doctorat. Mulțumesc pentru timpul acordat, îndrumare, sfaturi și încurajări!

Această teză de doctorat nu ar fi fost posibilă fără ajutorul esențial al doamnei Prof. Dr. Ing. Liliana Vereștiuc care mi-a îndreptat pașii spre domeniul cercetării științifice încă din perioada facultății. Îi sunt profund recunoscătoare pentru sfaturile, cunoștințele prețioase oferite, sprijinul dumneaei și pentru că a crezut mereu în potențialul meu de cercetător.

O prețuire nespusă și o deosebită gratitudine am pentru doamna Asist. Univ. Dr. Bioing. Vera Bălan. Fără ajutorul necondiționat și sfaturile ei nu aș fi dus la bun sfârșit această teză.

Totodată, le sunt recunoscătoare doamnei Conf. Dr. Maria Butnaru, pentru că mi-a împărtășit din experiența dumneaei și domnului Dr. Bioing. Edi Tănase pentru tot ajutorul oferit și sfaturile valoroase.

Mulțumiri deosebite merg spre cei care au avut o implicare directă în realizarea aceastei teze, prin caracterizarea materialelor cu ajutorul a diferite instrumente și tehnici. Domnilor Prof. Dr. Mihai Mareș și Conf. Dr. Valentin Năstasă de la Facultatea de Medicină Veterinară, USAMV Ion Ionescu de la Brad Iași, le mulțumesc pentru testele *in vivo* realizate cu meticulozitate și pentru promptitudinea rezultatelor. Țin să amintesc și pe Prof. Dr. Ing. Iulian Antoniac, Dr. Ing. Aurora Antoniac, Dr. Biol. Andrei Lobiuc și Dr. Anca Munteanu pentru analizele realizate, care au condus la două lucrări publicate în reviste cotate ISI. Menționez și pe Dr. Silvia Vasiliu și Ș.l. Dr. Ing. Bogdan Istrate pentru timpul acord în efectuarea unor analize importante.

De asemenea, sunt recunoscătoare doamnei Dr. Aurica Chiriac, de la Institutul de Chimie Macromoleculară Petru Poni din Iași, și colectivului de cerectare coordonat de dumneaei, îndeosebi Dr. Bioing. Loredana Niță, Dr. Biong. Alina Rusu și Dr. Bioing. Alina Ghilan, pentru analizele efectuate și pentru încurajări.

Mulțumesc colegilor doctoranzi, celor care au finalizat programul de doctorat și întregului colectiv al Catedrei de Chimie - Fizică din cadrul Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului pentru colaborare, încurajări și ajutorul oferit.

Alese mulțumiri cadrelor didactice de la Facultatea de Bioinginerie Medicală, care au avut o contribuție valoroasă în formarea mea ca bioinginer și cercetător.

Colegilor și coordonatorilor actuali din cadrul Universității de Medicină și Farmacie "Grigore T. Popa" Iași: Conf. Dr. Cristina Dimitriu și colectivul departamentului CEMEX, în special Dr. Bioing. Gianina Dodi, le sunt recunoscătore pentru toată înțelegerea și încurajările oferite în ultimile luni.

Mulțumesc tuturor prietenilor care mi-au fost alături necondiționat, ori de câte ori a fost nevoie, atât în momentele fericite, cât și în cele nefericite, în special drd. Bioing. Roxana Mihalachi.

Mulţumesc parinților mei și fratelui meu, în mod deosebit mamei mele pentru atenția, îndrumarea și iubirea ei. De la ea am învățat că simplitatea și modestia nu vor da niciodată greș. Nu aș fi reușit să finalizez această teză fără sprijinul necondiționat, încrederea și încurajarea care mi-au fost oferite de soțul meu, Ștefan.

Dedic această teză mamei mele și soțului meu, deoarece ei reprezintă sprijinul meu moral în viață.

Cu stimă, Biong. Florina-Daniela Ivan (Cojocaru)

# Cuprins

# PARTEA TEORETICĂ

Introducere         Capitolul 1. Stadiul actual al cercetărilor în domeniul suporturilor biomimetice         pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu cu incluziune de particule magnetice         pentru regenerarea osoasă         1.1. Țesutul osos. Structură. Fiziologie. Patologie         1.1.1. Funcțiile țesutului osos         1.1.2. Structura țesutului osos         1.1.2.1. Matricea extracelulară         1.1.2.2. Celulele țesutului osos         1.1.3. Fiziologia țesutului osos         1.1.3.1. Osteogneza și osteoliza         1.1.3.2. Creșterea osului         1.1.3.3. Remodelarea osului         1.1.4.1. Tumori osoase         1.2.1. Metode actuale de tratament a defectelor osoase         1.2.1. Grefe osoase și substituienți sintetici         1.2.2. Grefe osoase și substituienți sintetici         1.2.2. Ingineria tisulară și regenerarea osoasă         1.2.2.1. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă         1.2.2.1.3. Biomateriale cermice         1.2.2.1.4. Polimeri sintetici         1.2.2.2.5. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă         1.2.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă			Pag. rezumat
Capitolul 1. Stadiul actual al cercetărilor în domeniul suporturilor biomimetice pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu cu incluziune de particule magnetice pentru regenerarea osoasă 1.1. Țesutul osos. Structură. Fiziologie. Patologie 1.1.1. Funețiile țesutului osos 1.1.2. Structura țesutului osos 1.1.2. Structura țesutului osos 1.1.2. Celulele țesutului osos 1.1.3. Fiziologia țesutului osos 1.1.3. Fiziologia țesutului osos 1.1.3. Creșterea osului 1.1.3.2. Creșterea osului 1.1.3.3. Remodelarea osului 1.1.4. Patologia osoasă 1.1.4.1. Tumori osoase 1.2.1. Metode actuale de tratament a defectelor osoase 1.2.1. Grefe osoase biologice 1.2.1.2. Grefe osoase şi substituienți sintetici 1.2.2. Ingineria tisulară și regenerarea osoasă 1.2.2.1. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă 1.2.2.1.3. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă 1.2.2.1.3. Biomateriale cermice 1.2.2.1.3. Biomateriale cermice 1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă 1.2.2.1.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă 1.2.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă 1.2.2.2.1.1. defe conase și 1.2.2.2.1.1. Biomateriale cermice 1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă 1.2.2.2.1.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă 1.2.2.2.1.1. Biomateriale cermice	ducara		/ teza
<ul> <li>Per bază de biopolimeri și fosfați de calciu cu incluziune de particule magnetice pe futu regenerarea osoasă</li> <li>1.1. Țesutul osos. Structură. Fiziologie. Patologie</li> <li>1.1.1. Funcțiile țesutului osos</li> <li>1.1.2. Structura țesutului osos</li> <li>1.1.2. Celulele țesutului osos</li> <li>1.1.3.1. Osteogeneza și osteoliza</li> <li>1.1.3.2. Creșterea osului</li> <li>1.1.3.3. Remodelarea osului</li> <li>1.1.4.1. Tumori osoase</li> <li>1.2.1. Metode actuale de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1. Metode actuale de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1. Grefe osoase și substituienți sintetici</li> <li>1.2.2. Clugeneza și osteolize</li> <li>1.3.4.1. Tumori osoase</li> <li>1.2.2.1.1. Grefe osoase biologice</li> <li>1.2.2.1.2. Grefe osoase și substituienți sintetici</li> <li>1.2.2.1.2. Grefe osoase și substituienți sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2.1.4. Biopolimeri</li> <li>1.2.2.2.5. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.2. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2.1.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2.2.1.1. Biopolimeri</li> <li>1.2.2.2.2.2.2.1.1. Diopolimeri</li> <li>1.2.2.2.2.2.1.1. Diopolimeri</li> <li>1.2.2.2.2.3. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2.1.2. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2.1.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2.1.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> </ul>	tolul 1 Stadiul act	ual al cercetărilor în domeniul suporturilor biomimetice	1/1 
<ul> <li>J. J. Tesutulo osos. Structură. Fiziologie. Patologie</li> <li>1.1. Țesutul osos. Structură. Fiziologie. Patologie</li> <li>1.1.1. Funcțiile țesutului osos</li> <li>1.1.2. Structura țesutului osos</li> <li>1.1.2. Structura țesutului osos</li> <li>1.1.3. Matricea extracelulară</li> <li>1.1.2.2. Celulele țesutului osos</li> <li>1.1.3.1. Osteogeneza și osteoliza</li> <li>1.1.3.2. Creșterea osului</li> <li>1.1.3.3. Remodelarea osului</li> <li>1.1.4.1. Tumori osoase</li> <li>1.2.1. Metode actuale de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1. Grefe osoase biologice</li> <li>1.2.2. Grefe osoase și substituienți sintetici</li> <li>1.2.2. Ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.1. Biopolimeri</li> <li>1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.1.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.4.</li></ul>	iză de bionolimeri	si fosfati de calciu cu incluziune de narticule magnetice	
<ul> <li>1.1. Ţesutul osos. Structură. Fiziologie. Patologie</li> <li>1.1. Funcțiile țesutului osos</li> <li>1.1.2. Structura țesutului osos</li> <li>1.1.2.1. Matricea extracelulară</li> <li>1.1.2.2. Celulele țesutului osos</li> <li>1.1.3. Fiziologia țesutului osos</li> <li>1.1.3.1. Osteogeneza și osteoliza</li> <li>1.1.3.2. Creșterea osului</li> <li>1.1.3.3. Remodelarea osului</li> <li>1.1.4. Patologia osoasă</li> <li>1.1.4.1. Tumori osoase</li> <li>1.2.2. Metode de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1. Metode actuale de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1. Grefe osoase biologice</li> <li>1.2.2.1.1. Grefe osoase biologice</li> <li>1.2.2.1.2. Grefe osoase și substituienți sintetici</li> <li>1.2.2.1.2. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> </ul>	u regenerarea oso	asă	
<ul> <li>1.1. Funcțiile țesutului osos</li> <li>1.1.2. Structura țesutului osos</li> <li>1.1.2.1. Matricea extracelulară</li> <li>1.1.2.2. Celulele țesutului osos</li> <li>1.1.3. Fiziologia țesutului osos</li> <li>1.1.3. Fiziologia țesutului osos</li> <li>1.1.3.1. Osteogeneza și osteoliza</li> <li>1.1.3.2. Creșterea osului</li> <li>1.1.3.3. Remodelarea osului</li> <li>1.1.4.1. Ostoogeneza și osteoliza</li> <li>1.1.4.1. Tumori osoase</li> <li>1.2.2. Metode de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1. Metode actuale de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1. Grefe osoase și substituienți sintetici</li> <li>1.2.2. Ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.1. Biopolimeri</li> <li>1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> </ul>	Tesutul osos. Struct	ră. Fiziologie. Patologie	4
<ul> <li>1.1.2. Structura ţesutului osos <ol> <li>1.1.2.1. Matricea extracelulară</li> <li>1.1.2.2. Celulele ţesutului osos</li> </ol> </li> <li>1.1.3. Fiziologia ţesutului osos <ol> <li>1.1.3.1. Osteogeneza şi osteoliza</li> <li>1.1.3.2. Creşterea osului</li> <li>1.1.3.3. Remodelarea osului</li> </ol> </li> <li>1.1.4. Patologia osoasă <ol> <li>1.1.4.1. Tumori osoase</li> </ol> </li> <li>1.2.2. Metode de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1.1. Grefe osoase biologice <ol> <li>2.1.2. Grefe osoase şi substituienţi sintetici</li> </ol> </li> <li>1.2.2. Ingineria tisulară şi regenerarea osoasă <ol> <li>2.2.1.1. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară şi regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară şi regenerarea osoasă</li> </ol> </li> </ul>	1.1. Functiile tesutu	lui osos	4
<ul> <li>1.1.2.1. Matricea extracelulară</li> <li>1.1.2.2. Celulele țesutului osos</li> <li>1.1.3. Fiziologia țesutului osos</li> <li>1.1.3.1. Osteogeneza și osteoliza</li> <li>1.1.3.2. Creșterea osului</li> <li>1.1.3.3. Remodelarea osului</li> <li>1.1.4. Patologia osoasă</li> <li>1.1.4.1. Tumori osoase</li> <li>1.2. Metode de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1. Metode actuale de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1. Grefe osoase biologice</li> <li>1.2.1.2. Grefe osoase și substituienți sintetici</li> <li>1.2.2. Ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> </ul>	.2. Structura tesuti	lui osos	6
<ul> <li>1.1.2.2. Celulele ţesutului osos</li> <li>1.1.3. Fiziologia ţesutului osos</li> <li>1.1.3.1. Osteogeneza şi osteoliza</li> <li>1.1.3.2. Creşterea osului</li> <li>1.1.3.3. Remodelarea osului</li> <li>1.1.4. Patologia osoasă</li> <li>1.1.4.1. Tumori osoase</li> <li>1.2. Metode de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1. Metode actuale de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1.1. Grefe osoase biologice</li> <li>1.2.1.2. Grefe osoase şi substituienți sintetici</li> <li>1.2.2. Ingineria tisulară şi regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară şi regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară şi regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară şi regenerarea osoasă</li> </ul>	1.1.2.1. Matrice	a extracelulară	7
<ul> <li>1.1.3. Fiziologia ţesutului osos <ul> <li>1.1.3.1. Osteogeneza şi osteoliza</li> <li>1.1.3.2. Creşterea osului</li> <li>1.1.3.3. Remodelarea osului</li> </ul> </li> <li>1.1.4. Patologia osoasă <ul> <li>1.1.4.1. Tumori osoase</li> </ul> </li> <li>1.2. Metode de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1.1. Grefe osoase biologice <ul> <li>1.2.1.2. Grefe osoase și substituienți sintetici</li> </ul> </li> <li>1.2.2. Ingineria tisulară și regenerarea osoasă <ul> <li>1.2.2.1.1. Biopolimeri</li> <li>1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.1. Quorturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> </ul> </li> </ul>	1.1.2.2. Celulel	tesutului osos	8
<ul> <li>1.1.3.1. Osteogeneza și osteoliza</li> <li>1.1.3.2. Creșterea osului</li> <li>1.1.3.3. Remodelarea osului</li> <li>1.1.4. Patologia osoasă</li> <li>1.1.4.1. Tumori osoase</li> <li>1.2. Metode de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1.1. Grefe osoase biologice</li> <li>1.2.1.2. Grefe osoase și substituienți sintetici</li> <li>1.2.2. Ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.2. Polimeri 1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> </ul>	1.3. Fiziologia țesu	ului osos	10
<ul> <li>1.1.3.2. Creșterea osului</li> <li>1.1.3.3. Remodelarea osului</li> <li>1.1.4. Patologia osoasă</li> <li>1.1.4.1. Tumori osoase</li> <li>1.2. Metode de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1.1. Grefe osoase biologice</li> <li>1.2.1.2. Grefe osoase și substituienți sintetici</li> <li>1.2.2.1. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.1. Biopolimeri</li> <li>1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> </ul>	1.1.3.1. Osteog	neza si osteoliza	10
<ul> <li>1.1.3.3. Remodelarea osului</li> <li>1.1.4. Patologia osoasă <ol> <li>1.1.4.1. Tumori osoase</li> </ol> </li> <li>1.2. Metode de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1. Metode actuale de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1.1. Grefe osoase biologice <ol> <li>2.1.2. Grefe osoase și substituienți sintetici</li> </ol> </li> <li>1.2.2. Ingineria tisulară și regenerarea osoasă <ol> <li>2.2.1. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>2.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>2.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>2.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> </ol> </li> </ul>	1.1.3.2. Creșter	a osului	11
<ul> <li>1.1.4. Patologia osoasă <ol> <li>Tumori osoase</li> </ol> </li> <li>1.2. Metode de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1. Metode actuale de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1.1. Grefe osoase biologice <ol> <li>2.1.2. Grefe osoase biologice</li> <li>2.1.2. Grefe osoase şi substituienți sintetici</li> </ol> </li> <li>1.2.2. Ingineria tisulară şi regenerarea osoasă <ol> <li>2.2.1. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă</li> <li>2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară şi regenerarea osoasă</li> <li>2.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară şi regenerarea osoasă</li> </ol> </li> </ul>	1.1.3.3. Remod	larea osului	12
<ul> <li>1.1.4.1. Tumori osoase</li> <li>1.2. Metode de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1. Metode actuale de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1.1. Grefe osoase biologice</li> <li>1.2.1.2. Grefe osoase şi substituienți sintetici</li> <li>1.2.2. Ingineria tisulară şi regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.1. Biopolimeri</li> <li>1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară şi regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară şi regenerarea osoasă</li> </ul>	1.4. Patologia osoas	ă	13
<ul> <li>1.2. Metode de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1. Metode actuale de tratament a defectelor osoase</li> <li>1.2.1.1. Grefe osoase biologice</li> <li>1.2.1.2. Grefe osoase și substituienți sintetici</li> <li>1.2.2. Ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.1. Biopolimeri</li> <li>1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> </ul>	1.1.4.1. Tumori	osoase	13
<ul> <li>1.2.1. Metode actuale de tratament a defectelor osoase <ol> <li>1.2.1.1. Grefe osoase biologice</li> <li>1.2.1.2. Grefe osoase şi substituienți sintetici</li> </ol> </li> <li>1.2.2. Ingineria tisulară şi regenerarea osoasă <ol> <li>1.2.2.1. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.1. Biopolimeri</li> <li>1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară şi regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară şi regenerarea osoasă</li> </ol> </li> </ul>	Aetode de tratamen	a defectelor osoase	16
<ul> <li>1.2.1.1. Grefe osoase biologice</li> <li>1.2.1.2. Grefe osoase și substituienți sintetici</li> <li>1.2.2. Ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.1. Biopolimeri</li> <li>1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> </ul>	2.1. Metode actuale	de tratament a defectelor osoase	16
<ul> <li>1.2.1.2. Grefe osoase și substituienți sintetici</li> <li>1.2.2. Ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.1. Biopolimeri</li> <li>1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> </ul>	1.2.1.1. Grefe o	soase biologice	16
<ul> <li>1.2.2. Ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.1. Biopolimeri</li> <li>1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> </ul>	1.2.1.2. Grefe o	soase și substituienți sintetici	18
<ul> <li>1.2.2.1. Biomateriale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1.1. Biopolimeri</li> <li>1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2. M te be letice</li> </ul>	2.2. Ingineria tisula	ă și regenerarea osoasă	20
osoasă 1.2.2.1.1. Biopolimeri 1.2.2.1.2. Polimeri sintetici 1.2.2.1.3. Biomateriale cermice 1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă 1.2.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă 1.2.2.2.2. M te be beti	1.2.2.1. Biomat	riale utilizate la realizarea de suporturi pentru regenerarea	21
<ul> <li>1.2.2.1.1. Biopolimeri</li> <li>1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și</li> <li>regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și</li> <li>regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2.2. M to bo bo bio</li> </ul>	osoasă		
<ul> <li>1.2.2.1.2. Polimeri sintetici</li> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și</li> <li>regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și</li> <li>regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2.2. M to bo bo bio</li> </ul>	1.2.2.1.	. Biopolimeri	21
<ul> <li>1.2.2.1.3. Biomateriale cermice</li> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și</li> <li>regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și</li> <li>regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2.2. M (a. b. al (b. al (b.</li></ul>	1.2.2.1.2	. Polimeri sintetici	28
<ul> <li>1.2.2.2. Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă</li> <li>1.2.2.2.2. M (a. b. al (b. al</li></ul>	1.2.2.1.3	. Biomateriale cermice	30
regenerarea osoasă 1.2.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă	1.2.2.2.	Suporturi biomimetice pentru ingineria tisulară și	33
1.2.2.2.1. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă	regenera	rea osoasă	
regenerarea osoasă	1.2.2.2.1	. Caracteristici ale suporturilor pentru ingineria tisulară și	33
	regenera	rea osoasă	
1.2.2.2.2. Metode de obținere a suporturilor pentru ingineria tisulară	1.2.2.2.2	. Metode de obținere a suporturilor pentru ingineria tisulară	34
și regenerarea osoasă	și regen	rarea osoasă	27
1.2.2.2.3. Suporturi biomimetie pe baza de biopolimeri și fosfați de	1.2.2.2.	. Suporturi biomimetie pe baza de biopolimeri și fosfați de	37
calciu pentru regenerarea osoasa	caiciu p	niru regenerarea osoasa	20
de narticule magnetice pentru regenerarea osoasă	rticule magnetice n	entru regenerarea osoasă	39
1.3.1. Suporturi magnetice cu biopolimeri	3.1. Suporturi magr	etice cu biopolimeri	41

1.3.1.1. Suporturi magnetice cu proteine	41
1.3.1.2. Suporturi magnetice cu polizaharide	45
1.3.2. Suporturi magnetice cu polimeri sintetici	46
1.3.3. Suporturi magnetice pe bază de biomateriale ceramice	49
1.3.3.1. Sticle ceramice bioactive	49
1.3.3.2. Fosafați de calciu	50
1.4. Concluzii	51
PARTEA EXPERIMENTALĂ	
Capitolul 2. Materiale și metode experimentale	4/ 53
2.1. Strategie experimentală. Obiective.	4/ 53
2.2. Materiale utilizate	55
2.2.1. Materiale utilizate pentru prepararea suporturilor	55
2.2.2. Materiale utilizate pentru caracterizarea suporturilor	56
2.3. Obținerea suporturilor pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu cu incluziune	5/ 59
de particule magnetice	
2.3.1. Obținerea particulelor magnetice	5/ 59
2.3.2. Obținerea suporturilor pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu cu	5/ 60
incluziune de particule magnetice	
2.3.3. Program experimental	6/61
2.4. Metode de caracterizare	6/63
2.4.1. Caracterizarea structurală a suporturilor	63
2.4.1.1. Analiza prin Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier	63
(FTIR)	- 1
2.4.1.2. Spectroscopia de raze x prin dispersie de energie (EDS)	64
2.4.1.3. Difracție cu raze X (XRD)	65
2.4.2. Caracterizarea morfologică a suporturilor	65
2.4.2.1. Microscopie electronică de baleiaj (SEM)	65
2.4.2.2. Micro computer-tomografia (microCT)	66
2.4.3. Proprietățile mecanice ale suporturilor	67
2.4.4. Propritățile magnetice ale suporturilor	69
2.4.5. Determinarea caracteristicilor de retenție a fluidelor de interes biologic	70
2.4.6. Studii de degradare enzimatică <i>in vitro</i>	70
2.4.7. Teste de citotoxicitate <i>in vitro</i>	74
2.4.7.1. Testul MTT	75
2.4.7.2. Testul de viabilitate celulară cu Calceină-AM	76
2.4.8. Teste de citotoxicitatea in vivo	77
2.4.9. Studii privind aplicația suporturilor în radio-chimioterapia tumorilor	/8
USUASE MANGUE 2491 Teste de încărcare/eliberare controlată a chimioteranicalor din	70
suporturi	17
Supercuri	

Capitolul 3. Studii experimentale privind obținerea de suporturi biomimetice	7/ 81
pe bază de compozite din chitosan și biopolimeri (albumină, acid hialuronic,	
gelatină), fosfați de calciu și particule magnetice	
3.1. Obținerea suporturilor	8/83
3.2. Rezultate și discuții	9/ 84
3.2.1. Structura chimică a suporturilor	9/ 84
3.2.2. Compoziția suporturilor	10/ 85
3.2.3. Morfologia suporturilor	10/ 87
3.2.4. Proprietăți magnetice	89
3.2.5. Interacțiunea suporturilor cu fluide	11/90
3.2.6. Degradarea enzimatică in vitro a suporturilor	11/ 92
3.2.7. Citotoxicitatea suporturilor in vitro	12/93
3.2.7.1. Testul MTT	93
3.2.7.2. Testul de viabilitate celulară cu Calceină-AM	95
3.3. Concluzii	13/96
Capitolul 4. Suporturi biomimetice pe bază de biopolimeri (chitosan, colagen,	14/ 98
acid hialuronic) și fosfați de calciu cu incluziune de particule magnetice sub	
formă uscată	
4.1. Obținerea suporturilor	14/98
4.2. Rezultate și discuții	15/100
4.2.1. Structura chimică a suporturilor	100
4.2.2. Morfologia suporturilor	102
4.2.3. Interacțiunea suporturilor cu fluide	15/104
4.2.4. Degradarea enzimatică in vitro a suporturilor	105
4.2.4.1. Determinarea concentrației de chitosan degradat	105
4.2.4.2. Determinarea concentrației de colagen degradat	106
4.2.5. Proprietățile mecanice ale suporturilor	107
4.2.6. Proprietățile magnetice ale suporturilor	109
4.2.7. Testul MTT de citotoxicitatea in vitro	110
4.2.8. Toxicitate <i>in vivo</i> a suporturilor	16/111
4.3. Concluzii	17/114
Capitolul 5. Suporturi biomimetice pe bază de biopolimeri (chitosan, colagen,	18/ 116
acid hialuronic) și fosfați de calciu cu incluziune de suspensie coloidală de	
particule magnetice	
5.1. Obținerea suporturilor	18/ 116
5.2. Rezultate și discuții	19/119
5.2.1. Structura chimică a suporturilor	19/119
5.2.2. Compoziția suporturilor	20/120
5.2.3. Morfologia suporturilor	20/ 121
5.2.4. Proprietățile mecanice ale suporturilor	22/ 124
5.2.5. Proprietățile magnetice ale suporturilor	125
5.2.6. Interacțiunea suporturilor cu fluide de interes biologic	23/ 126

5.2.7. Degradarea enzimatică <i>in vitro</i> a suporturilor	23/127
5.2.7.1. Determinarea concentratiei de chitosan degradat	24/127
5.2.7.2. Determinarea concentratiei de colagen degradat	24/128
5.2.8. Citotoxicitatea <i>in vitro</i> a suporturilor	25/128
5.2.8.1. Testul MTT	25/ 128
5.2.8.2. Testul de viabilitate celulară cu Calceină-AM	130
5.2.9. Toxicitatea <i>in vivo</i> a suporturilor	26/130
5.3. Concluzii	28/135
Capitol 6. Studii privind reproductibilitatea metodei de preparare a suporturilor biomimetice pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu cu incluziune de particule magnetice și utilizarea acestora în radio-chimioterania	29/ 138
tumorilor osoase maligne	
6.1. Reproductibilitatea metodei de preparare a suporturilor biomimetice pe	29/138
bază de biopolimeri și fosfați de calciu cu incluziune de particule magnetice	
6.1.1. Obtinerea suporturilor	29/139
6.1.2. Rezultate si discutii	139
6.1.2.1. Structura chimică a suporturilor	29/139
6.1.2.2. Morofologia suporturilor	30/141
6.1.2.3. Proprietățile mecanice ale suporturilor	31/142
6.1.2.4. Interacțiunea suporturilor cu fluide de interes biologic	31/143
6.1.2.5. Degradare enzimatică in vitro a suporturilor	32/143
6.1.2.6. Citotoxicitatea suporturilor in vitro	33/ 145
6.2. Studii privind potențiala aplicație a suporturilor în radio-chimioterapia	34/146
tumorilor osoase maligne	
6.2.1. Obținerea suporturilor	34/148
6.2.2. Tehnica de iradierea cu raze X a suporturilor	35/149
6.2.3. Teste in vitro de încărcare/eliberare doxorubicină	36/151
6.2.4. Rezultate și discuții	37/151
6.2.4.1. Structura chimică și morfologia suporturilor	37/ 152
6.2.4.2. Interacțiunea suporturilor cu fluide de interes biologic și degradarea enzimatică a acestora	38/ 154
6.2.4.3. Citotoxicitatea <i>in vitro</i> a suporturilor	39/ 156
6.4.2.4. Eliberarea controlată de medicamente antitumorale	40/157
6.2.4.5. Interacțiunea in vitro a suporturilor conținând MNPs-DOX și a	41/159
medicamentului antitumoral cu celule	
6.3. Concluzii	41/160
Concluzii generale	42/ 161
Diseminarea rezultatelor	44/ 165
Bibliografie selectivă	46/168

## Introducere

Impactul clinic, cât și cel economic pentru tratamentul afecțiunilor osoase este uluitor, osul fiind al doilea cel mai transplantat țesut după transfuziile de sânge. Numeroase metode de reconstrucție a defectelor osoase sunt disponibile, în practica clinică fiind utilizate autogrefe, alogrefe, matrice osoasă demineralizată, materiale metalice sau ceramice, proteine osoase morfogenetice, factori de creștere și altele. Succesul acestor materiale este însă unul limitat, fiecare din ele prezentând dezavantaje considerabile. În încercarea de a oferi o soluție pentru rezolvarea problemei menționate, tot mai mulți cercetători și-au îndreptat atenția spre realizarea de noi materiale pentru ingineria tisulară și regenerarea țesutului osos, materiale cu proprietăți și interacțiuni controlabile. Aceste materiale se găsesc sub diverse forme de prezentare: suporturi poroase tridimensionale, sisteme injectabile, capsule, filme/membrane, matrici fibroase și nano-fibroase, hidrogeluri.

Tumorile osoase maligne, afecțiuni cu caracter degenerativ, reprezintă unul din principali factori ce conduc la defecte osoase critice. Tratamentul unor astfel de afecțiuni osoase constă în două etape: prima etapă constă în rezecția țesutului afectat, iar cea de a doua este implantarea unui material de substituție și regenerare osoasă, care poate conține factori de creștere sau medicamente.

Cele mai importante proprietăți impuse unor astfel de suporturi sunt: biocompatibilitate, lipsa toxicității, proprietăți de suprafață adecvate incluziunii și proliferării celulare, osteoconductivitate, osteoinductivitate, rata de degradare controlată, proprietăți mecanice comparative cu cele ale osului natural etc. De asemenea, foarte important este ca suportul să fie biomimetic, în vederea integrării adecvate în osul gazdă.

În ultimii ani, interesul pentru nanotehnologie a crescut semnificativ. Particulele magnetice fac parte din grupul materialelor utilizate în nanotehnologii cu un impact considerabil în diverse domenii: chimie, biosenzori, nanomedicină etc. Cele mai importante aplicații ale lor sunt legate de obținerea particulelor de dimensiuni nanometrice, denumite nanoparticule magnetice – MNPs, utilizate în metode de diagnostic (rezonanța magnetică nucleară, separarea magnetică a unor entități biologice), în scop terapeutic sau combinații, diagnostic și terapie.

Utilizate în scop terapeutic, nanoparticulele magnetice au fost mult studiate pentru eliberarea controlată de medicamente. Prin utilizarea atracției magnetice sau a direcționării specifice a unor biomarkeri tumorali, nanoparticulele magnetice oferă o soluție atractivă pentru terapia directă cu agenți chimioterapici care să fie eliberați într-un loc specific, reducând în mod semnificativ cantitatea de medicament inclusă în formulare și, implicit, efectele adverse asociate cu absorbția de către țesuturi sănătoase a medicamentului.

Teza de față este structurată în două secțiuni principale: stadiul actual al cercetărilor în domeniul vizat și rezultate originale. Prima secțiune sintetizează date de literatură și este reprezentată de primul capitol. A doua secțiune este formată din 5 capitole: capitolul 2 prezintă materialele și metodele utilizate pentru obținerea rezultatelor originale prezentate în capitolele 3, 4, 5 și 6.

*Capitolul 1* prezintă pe scurt date despre anatomia, fiziologia și patologia țesutului osos, deoarece fără cunoșterea acestor noțiuni ar fi imposibil de realizat un suport care să permită regenerarea osoasă adecvată. Capitolul cuprinde informații despre materialele pentru regenerarea osoasă utilizate în practica clinică și variantele aflate în stadiul de cercetare, fiind prezentate pe scurt o parte din cele mai utilizate biomateriale în domeniul vizat. O atenție deosebită este acordată metodelor de obținere a suporturilor pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu, cu sau fară conținut de component magnetic. După un studiu amănunțit a suporturilor magnetice realizate până în prezent, s-a realizat o clasificare a acestora, în funcție de biomaterialele de bază utilizate în etapa de sinteză.

*Capitolul 2* prezintă strategia experimentală, construită în jurul obiectivului central: *obținerea și caracterizarea de suporturi biomimetice pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu, cu incluziune de particule magnetice, pentru regenerarea osoasă*. Sunt prezentate etapele procesului de preparare a suporturilor pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu cu incluziune de particule magnetice precum și metodele de caracterizare a suporturilor obținute. Subcapitolul *Metode de caracterizare* evidențiază principiile de bază ale tehnicilor folosite, condițiile de lucru, parametrii și dispozitivile utilizate.

*Capitolul 3* a avut drept scop principal realizarea și caracterizarea unor suporturi compozite folosind patru combinații diferite de biopolimeri și trei concentrații diferite de nanoparticule magnetice. În urma analizei structurii chimice a suporturilor, a compoziției și morfologiei acestora, a proprietăților magnetice precum și a interacțiunii suporturilor cu fluide de interes biologic, enzime și celule se vor stabili biopolimerii și concentrația de nanoparticule ce vor fi utilizate în capitolele următoare.

Un program experimental s-a utilizat pentru a obține 13 suporturi pe bază de colagen, chitosan, acid hialuronic și fosfați de calciu cu incluziune de particule magnetice sub formă uscată, *capitolul 4* prezentând prepararea și caracterizarea acestora. Pe lângă analizele realizate pentru suporturile din capitolul 3, s-au analizat și proprietățile mecanice ale celor 13

suporturi precum și citotoxicitate lor *in vivo*, ultimul experiment menționat având o durată de 21 zile.

Același program experimental și aceeași compoziție a suporturilor a fost utilizată și pentru prepararea suporturilor descrise în *capitolul 5*, diferența fiind dată de faptul că particulele au fost încorporate sub formă de suspensie coloidală. Morfologia acestor suporturi a fost studiată în detaliu cu ajutorul tehnicii microCT, iar testele de toxicitate *in vivo*, realizate pe aceași specie de animale utilizate în capitolul anterior, a avut o durată de mai mare, de 64 zile.

*Capitolul 6* este structurat în două părți. Prima parte prezintă reproductibilitatea metodei de preparare a suporturilor, iar a doua parte studii privind potențiala aplicație a suporturilor în radio-chimioterapia tumorilor osoase maligne. Într-o primă etapă suporturile au fost iradiate cu o doza unică de raze X, administrată în mod obișnuit în cazul metastazelor osoase, fiind analizată apoi influența radiațiilor asupra proprietăților fizico-chimice și biologice a suporturilor. A doua etapă a studiului a constat în încărcarea nanoparticulelor incluse în suporturi cu doxorubicină (medicament utilizat în practica clinică pentru tratamentul metastazelor osoase și a tumorilor osoase), urmată de caracterizarea suporturilor obținute.

Lucrarea se încheie cu un capitol de concluzii generale și bibliografia consultată pentru realizarea acesteia.

Teza de doctorat se extinde pe 185 pagini structurate în șase capitole care includ 31 tabele, 95 figuri, 16 ecuații și 232 indicații bibliografice. O parte din rezultatele originale prezentate în teza de față au sunt publicate în 2 articole din reviste cotate ISI cu factor de impact cumulat **5.329** și scor relativ de influență **2.639** și 3 articole publicate în baze de date internaționale (indexate ISI/ ISI proceedings). De asemenea, rezultatele au fost prezentate în cadrul a 4 conferințe naționale și 11 conferințe internaționale de prestigiu, atât sub formă de postere cât și sub formă de prezentări orale. Un articol cu date importante din teză urmează să fie trimis spre evaluare în vederea publicării într-o revistă cotată ISI cu factor de impact minim 4.

Acest rezumat prezintă aspectele esențiale tratate în cadrul tezei de doctorat, fiind menținută numerotarea tabelelor, a figurilor, ecuațiilor și a referințelor din materialul tezei.

#### Capitolul 2. Materiale și metode

#### 2.1. Strategie experimentală. Obiective

În urma realizării meticuloase a unui studiu de literatură cu privire la stadiul actual al subiectului abordat, s-a ales pentru lucrarea de față o strategie de cercetare care a avut drept obiectiv central:

Obținerea și caracterizarea de suporturi biomimetice pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu cu incluziune de particule magnetice pentru regenerarea osoasă

Având în vedere componentele matricei extracelulare a țesutului osos (60-70% componentă anorganică, 20-30% componentă organică și apă), biomaterialele utilizate în studiile de față au fost selectate după cum urmează: pentru componenta organică au fost selectați biopolimeri adesea utilizați în studii ce vizează regenerarea țesutului osos și fosfați de calciu, pentru componenta anorganică. Noutatea tezei este dată de adăugarea de particule magnetice (magnetită funcționalizată cu chitosan) în amestecul supus procedeului de co-precipitare, particule care pot fi funcționalizate cu diverși bioagenți (medicamente) și au rolul de transportori ai acestora.

Un suport magnetic biomimetic cu design adecvat este dispozitivul ideal pentru a ghida formarea de neo-ţesut atât *in vitro* cât și *in vivo*. Suporturile pentru ingineria tisulară a osului trebuie să fie biocompatibile, să mimeze structura și funcția biologică a matricei extracelulare și să ofere suport mecanic pentru țesutul în formare și, de asemenea, să elibereze în locul unde are loc repararea țesutului, diverse molecule, celule, factori de creștere. Totodată, suportul trebuie să fie osteoconductiv și osteoinductiv și să prezinte o viteză de degradarea controlată.

O mare parte dintre suporturile propuse în literatură nu mimează și arhitectura matricii extracelulare naturale, acesta fiind motivul pentru care rezultatele unor astfel de studii nu sunt satisfăcătoare. Suportul trebuie să fie biomimetic, adică să mimeze nu doar compoziția osului, ci, la fel de important, nano-structura sa. Astfel, pentru tema de cercetare abordată s-a ales un procedeu biomimetic de co-precipitare *in situ* a fosfaților de calciu în soluții de biopolimeri, inspirat din procesul natural de mineralizare, unde mineralele sintetizate de către organism, sunt combinate cu componentele organice ale matrici extracelulare a țesutului osos.

Pentru partea organică a suporturilor s-au testat diverși polimeri naturali: chitosan, acid hialuronic, gelatină, albumină și colagen.

Pentru partea anorganică a suporturilor s-au utilizat fosfați de calciu sintetici, deoarece prezintă o strucutură similară cu cea a mineralului primar din componența țesutului osos, având rolul de stimuli osteoconductivi și osteoinductivi. Aceștia s-au obținut prin precipitarea din precursori: azotat de calciu – Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>/ CaCl<sub>2</sub> și fosfat monosodic – NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.

Utilizarea particulelor magnetice este un concept nou studiat în domeniul inginerie tisulare. Acesta implică utilizarea de nanoparticule magnetice care sunt funcționalizate cu factori de creștere, medicamente sau alți agenți bioactivi care vor fi preluate de către țesuturile adiacente, proces stimulat de acțiunea unui camp magnetic în apropierea zonei unde este implantat suportul. Nanoparticulele magnetice funcționalizate acționează ca transportatori de agenți bioactivi către și în interiorul suportului magnetic, eliberând succesiv moleculele pe care le transportă.

# 2.3. Obținerea suporturilor pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu cu incluziune de particule magnetice

#### 2.3.1. Obținerea particulelor magnetice

Particulele magnetice au fost obținute conform protocolului descris de Bălan și colaboratorii [116], proprietățile lor de bază fiind: dimensiunea medie (nm) – 178, indicile de polidispersitate – 0.27, potențial Zeta în soluție apoasă de surfactant (mV) – -18,6 și magnetizarea 43,65 emu/g. Pe scurt, un volum de soluție de chitosan de masă moleculară mică a fost amestecat cu un volum de magnetită – Mag și pluronic F-127. După omogenizare amestecului s-a adăugat o soluție TPP în picătură. Amestecul final s-a dializat contra apei distilate, timp de 5 zile.

#### 2.3.2. Obținerea suporturilor compozite

Suporturilor magnetice au fost obținute utilizând o metodă biomimetică de coprecipitare a fosfaților de calciu din precursorii săi în soluții de biopolimeri, inspirată din procesul natural de mineralizare, etapele procesului de obținere fiind prezentate în Figura 2.1.

Soluțiile apoase de precursori de fosfați de calciu au fost adăugate în amestecul de soluții de polimeri. Înainte de adăugarea precursorilor de fosfați de calciu, în amestecul de soluții de polimeri s-au adăugat particule magnetice fie sub formă uscată, fie sub formă de suspensie coloidală. Co-precipitarea s-a realizat în prezența unei soluții de amoniac NH<sub>4</sub>OH (25 %), până la obținerea unei valori a pH-ului de 7,2-7,4. Fiecare amestec a fost spălat de 3

ori cu apă distilată și separate prin centrifugare (5000 rpm, timp de 10 minute), iar în final amestecurile au fost liofilizate, 24h, la -55°C.



Figura 2.1. Obținerea suporturilor pe bază de biopolimeri și foșfați de calciu cu incluziune de particule magnetice

#### 2.3.3. Program experimental

Pentru teza de față s-a utilizat un program experimental multifactorial în vederea optimizării compoziției suporturilor. Programul menționat este caracterizat prin faptul că fenomenul/ procesul este urmărit prin intermediul unui număr finit de variabile, variabile ce pot avea fiecare un număr discret de valori într-un domeniu prestabilit [120]. Compoziția suporturilor a fost optimizată din punct de vedere al raportului biopolimer/biopolimer și a raportului Ca/P.

#### 2.3.4. Metode de caracterizare

Suporturile au fost caracterizate riguros din punct de vedere fizico-chimic și biologic.

Analiza prin Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR) s-a utilizat în vederea determinării grupărilor funcționale ale suporturilor, acest tip de spectroscopie fiind o metodă uzuală în stabilirea structurii și identificarea unui compus chimic [123].

În vederea analizei de suprafață s-a recurs la Spectroscopia de raze X prin dispersie de energie (EDS). Difracția cu raze X (XRD) a fost folosită pentru a studia faza cristalină a suporturilor, oferind totodată și date despre dimensiune și orientarea cristalelor. Fazele

anorganice din suporturile obținute au fost identificate cu ajutorul standardelor Centrului Internațional pentru Difracție (JCPDS). Morfologia suporturilor a fost studiată în ansamblu cu ajutorul microscopiei electronice de baleiaj (SEM), iar pentru o analiză de înaltă precizie cu ajutorul micro-computer tomografiei (microCT).

Proprietățile mecanice ale suporturilor au fost determinate din perspectiva modului de elasticitate Young, calculat în urma unui test de compresiune efectuat cu ajutorul dispozitivului Texture Analyzer TA.XTplus. Susceptibilitatea magnetică, notată cu  $\chi_m$ , s-a măsurat cu balanța de susceptibilitate magnetică Sherwood Scientific MSB Auto, la o intensitatea a campului magnetic H= 4.5 kGauss, iar valorile rezultate au permis calcularea magnetizării suporturilor.

Determinarea caracteristicilor de retenție a fluidelor de interes biologic s-a realizat cu ajutorul metodei volumetrice, prin contactul suporturilor cu soluție PBS, și/ sau cu o soluție SBF, în paralel. Pentru studiile de degradare *in vitro* s-a utilizat metoda enzimatică, utilizând fie lizozim (enzimă ce este implicată în procesul de degradare al chitosanului în organismul uman), fie un amestec de lizozim și colagenază (enzimă ce este implicată în procesul de degradare al colagenului în organismul uman).

Din punct de vedere biologic, suporturile au interacționat *in vitro* direct sau indirect cu diverse linii celulare în vederea determinării citotoxicității lor, iar *in vivo* s-au implantat subcutanat la șoareci în vederea determinării toxicității acestora.

Conceptul de terapie combinată pentru tratamentul tumorilor osoase maligne ce implică utilizarea radioterapii și chimioterapii a fost considerată ca o potențială aplicație a suporturile obținute.

# Capitolul 3. Studii experimentale privind obținerea de suporturi biomimetice pe bază de compozite din chitosan și biopolimeri (albumină, acid hialuronic, gelatină), fosfați de calciu și particule magnetice

Biopolimerii sunt recunoscuți de mediul biologic și degradați metabolic. Chitosanul, colagenul, gelatina, alginații, condroitin sulfatul și acidul hialuronic sunt printre cei mai studiați datorită argumentelor menționate în capitolele anterioare și a similarității lor cu componentele matricei extracelulare [142-144].

Având în vedere proprietățile a patru dintre cei mai utilizați biopolimeri în ingineria tisulară și regenerarea osoasă (chitosan, acid hialuronic, gelatină și albumină) s-a emis ipoteza că prin realizarea unor combinații ale acestora cu fosfați de calciu și particule magnetice se pot obține suporturi magnetice cu aplicații în regenerarea tisulară osoasă (Figura 3.1). Fosfații

de calciu, componenți ai fazei anorganice a țesutului osos uman, stimulează osteoconductivitatea și osteoinductivitatea [144].



Figura 3.1. Suporturi pe bază de biopolimeri, fosfați de calciu și nanoparticule magentice

Importanța utilizării nanoparticulelor magnetice în suporturi compozite pentru ingineria tisulară și regenerarea osoasă a fost detaliată în capitolul 1. Alegerea unei concentrații de nanoparticule adecvată este o provocare, o concentrație prea mică poate avea riscul de a nu conferi proprietăți magnetice suportului în care sunt incluse, iar o concentrație prea mare poate duce la un eventual caracter citotoxic al suportului. Studiile în domeniu prezintă prepararea de suporturi magnetice ce au încoporate concentrații diferite de particule: 0,5%, 1%, 2%, 3%, 7%, 5% sau 10% etc. [90-92]. Dintre aceste concentrații în cadrul tezei de doctorat s-au selectat concentrațiile: 1%, 3% și 5%.

#### 3.1. Obținerea suporturilor

Suporturi au fost obținute conform protocolului descris în subcapitolul 2.3.2, au fost codificate în funcție de compoziția lor, după cum se poate observa în tabelul 3.1. și au fost caracterizate din punct de vedere al structurii chimice și compoziției (FTIR, EDS, XRD) și morfologic (SEM). De asemenea, s-a urmărit comportamentul suporturilor în fluide de interes

biologic, degradarea acestora și s-au analizat proprietățile magnetice. Toxicitatea suporturilor a fost analizată în culturi celulare printr-un test MTT și printr-un test de viabilitate celulară cu Calceină-AM.

Suport	Concentrația de nanoparticule magnetice	Gradul de retenție PBS (%)	Gradul de retenție SBF (%)	Magnetizare (emu/g)
Cs 1%	1%	$704 \pm 22$	$680 \pm 35$	$1,32 \pm 0,10$
Cs 3%	3%	645 ± 12	632 ± 14	$7,\!42 \pm 0,\!45$
Cs 5%	5%	676 ± 21	530 ± 25	$10,14 \pm 0,61$
Cs-Hya 1%	1%	$784 \pm 24$	667 ± 31	$0,25 \pm 0,07$
Cs-Hya 3%	3%	$714 \pm 45$	$630 \pm 29$	-
Cs-Hya 5%	5%	$490\pm22$	$475 \pm 17$	$12,53 \pm 0,58$
Cs-Bsa 1%	1%	700 ± 39	$654 \pm 41$	$2,26 \pm 0,13$
Cs-Bsa 3%	3%	$454 \pm 61$	567 ± 16	$6,10 \pm 0,32$
Cs-Bsa 5%	5%	$806\pm78$	$515 \pm 20$	$8,16 \pm 0,51$
Cs-G 1%	1%	$465\pm35$	$421\pm34$	-
Cs-G 3%	3%	$805 \pm 42$	$625\pm09$	-
Cs-G 5%	5%	$755 \pm 27$	$722 \pm 15$	-

Tabel 3.1. Compoziția și proprietățile suporturilor (retenție PBS/SBF și magnetizarea)

#### 3.2. Rezultate și discuții

#### 3.2.1. Structura chimică

Structura chimică a suporturilor a fost analizată cu ajutorul spectroscopiei FTIR, picuri caracteristice biopolimerilor, fosfaților de calciu și particulelor magnetice fiind identificate pe spectrele FTIR (Figura 3.2).

În ceea ce privește spectrul FTIR al suportului Cs 3% s-au observat benzile caracteristice Cs-ului, după cum urmează: gruparea -OH la 3430 cm<sup>-1</sup>, gruparea –CH<sub>2</sub> la 2923 cm<sup>-1</sup>, amida I la 1655 cm<sup>-1</sup>, vibrației de întindere a legăturii C–N la 1322 cm<sup>-1</sup> și vibrației de absorbție a grupării C–O la 1029 cm<sup>-1</sup> [159]. Pentru același suport s-au mai putut observa picuri specifice grupării fosfat  $PO_4^{3-}$ , în regiunea 600 cm<sup>-1</sup> [99] și grupării Fe–O a particulelor magnetice la 560 cm<sup>-1</sup> [160]. În cazul suportului Cs-Bsa 3% s-a observat o creștere semnificativă a intensității picului 1657 cm<sup>-1</sup>, ce corespunde amidei I, drept rezultat al

vibrației de întindere a grupării C=O din legătura peptidică. Picul de la numărul de undă 1546 cm<sup>-1</sup> corespunde amidei II, iar picul de la 1240 cm<sup>-1</sup> amidei III din componenta proteică [161].



Figura 3.2. Spectrele FTIR ale suporturilor cu diferite compoziții

### 3.2.2. Compoziția suporturilor

Principalele tipuri de fosfați de calciu identificați pe spectrele XRD și EDS sunt prezentați în tabelul 3.2.

Forme de fosfați de calciu	Formulă chimică	Raport Ca/P
МСРМ	$Ca(H_2PO_4)_2 \cdot H_2O$	0,5
Fosfat monocalcic anhidru	$Ca(H_2PO_4)_2$	0,5
Fosfat dicalcic anhidru	CaHPO <sub>4</sub>	1,00
Hidroxiapatită	Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	1,67
Fosfat tricalcic	$Ca_3(PO_4)_2$	1,5

Tabel 3.2. Diferite forme de CP prezente în compozitele Cs-CP conform datelor XRD și EDS

#### 3.2.3. Morfologia suporturilor

Dimensiunile porilor suporturilor sintetizate (tabel 3.3.) au fost calculate din imaginile SEM prin analiza cantitativă a parametrilor imaginilor, utilizând funcția *threshold* a programului ImageJ.

	Cs 3%	Cs-Hya 3%	Cs-Bsa 3%	Cs-G 3%
Deviația standard	996 ± 189	$1115 \pm 170$	751 ± 91	924 ± 135
Dimensiunea minimă	399	452	319	456
Dimensiunea maximă	1946	2137	1122	1549
Dimensiunea medie	953	989	673	815

Tabel 3.3. Dimensiunea porilor (µm)

#### 3.2.5. Interacțiunea cu fluide de interes biologic

Rezultatele obținute sunt redate în tabelul 3.1. Pentru toate suporturile s-au obținut valori mari ale gradului de retenție PBS (%), acestea fiind cuprinse între 400 și 800 %. Aceste valori au fost corelate pe de o parte, cu structura poroasă tridimensională a suporturilor, iar pe de altă parte cu proprietățile hidrofile ale biopolimerilor, atribuite grupărilor lor funcționale. În ceea ce privește interacțiunea suporturilor cu soluția SBF, prezența ionilor pozitivi (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>) și a ionilor negativi (HPO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, Cl<sup>-</sup>, HCO<sub>3</sub><sup>2-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), precum și proprietatea acestora de a interacționa cu componentele suporturilor, diminuează retenția de fază apoasă a suporturilor.

#### 3.2.6. Degradarea enzimatică in vitro a suporturilor

Degradarea suporturilor a fost studiată *in vitro* în prezența lizozimului (enzima care catalizează în organismul uman degradarea chitosanului), pentru o perioadă de 16 zile (Figura 3.6). S-a remarcat că procesul de degradare are două etape. În prima etapă, ce corespunde primelor 8 zile, a avut loc o degradare mai accentuată a suporturilor, pe când în a doua etapă a urmat o încetinire a procesului de degradare.



Figura 3.6. Concentrația de chitosan degradat pentru suporturile compozite

Procesul de degradare în două etape a fost evidențiat și în alte studii și poate fi explicat de faptul că lizozimul conține un situs de legare hexameric, iar secvențele hexazaharidice conținând 3-4 sau mai multe unități acetilate au o puternică influență asupra vitezei inițiale de degradare a chitosanului. După o pierdere mare de masă inițială, viteza de degradare a suporturilor a scăzut considerabil, ca rezultat al pierderii secvențelor de hexazaharidă [170].

#### 3.2.7. Teste de citotoxicitate in vitro

Pentru evaluarea citotoxicității in vitro pe culturi de celule, s-a utilizat metoda contactului indirect, realizându-se un extract din suporturile obținute, care în prealabil au fost sterilizate. S-au realizat doua teste: un test MTT (rezultatele sunt redate în Figura 3.7) și un test de viabilitate celulară cu calceină AM (Figura 3.9)



Figura 3.7. Viabilitatea celulară a preosteoblatelor din linia celulară MC-3T3 în urma contactului indirect cu suporturile



Figura 3.9. Structura și morfologia celulelor cultivate pe compozite (marcare Calcein AM)

Datele obținute în urma testului MTT au indicat faptul că suporturile nu au eliberat compuși toxici, înglobați în structura suporturilor în momentul sintezei sau neîndepărtați prin spălare, care să influențeze negativ atașarea și proliferarea celulară.

Atât rezultatele obținute în urma testului MTT, cât și rezultatele obținute în urma testului cu Calceină-AM au evidențiat un comportament bun al suporturilor la contactul cu cele două linii celulare (fibroblaste și preosteoblaste).

#### 3.3. Concluzii

✓ În capitolul de față s-au obținut și caracterizat suporturi compozite pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu cu incluziune de concentrații diferite de particule magnetice. Chitosanul, unul din biopolimeri cei mai utilizați în ingineria tisulară și regenerarea osoasă, a fost combinat, cu acid hialuronic, albumină serică bovină sau gelatină.

✓ Analizând structura chimică a suporturilor, pe spectrele FTIR s-a remarcat prezența picurilor caracteristice tuturor componentelor introduse în sinteză, cele mai reprezentative fiind: benzile caracteristice grupării –OH a Cs-ului în apropierea picului corespunzător numărului de undă 3430 cm<sup>-1</sup>, grupării –CH<sub>2</sub> la 2923 cm<sup>-1</sup>, amida I la 1655 cm<sup>-1</sup> și alte benzi caracteristice grupărilor funționale ale celor 4 biopolimeri. Diferite tipuri de fosfați de calciu au fost identificate în faza cristalină a suporturilor, dintre care cel mai impotant tip fiind hidroxiapatita, prezentă în suportul Cs-G 3%, rezultat confirmat atât de XRD cât și de EDS.

✓ Morfologia a fost studiată în secțiunea suporturilor, imaginile evidențiind o porozitate ridicată a acestora precum și formarea fosfaților de calciu pe structura polimerică. Particulele magnetice au fost complet integrate în structura compozită. Dimensiunea minimă a porilor a fost în jur de 300 µm, iar dimensiunea maximă în jur de 2000 µm.

✓ Comparând valorile obținute pentru magnetizarea suporturilor cu datele de literatură, concentrația de 5% particule magnetice s-a dovedit a fi cea mai apropiată de datele regăsite în alte studii având aceleași obiective. De asemenea, se poate afirma că suporturile sunt superparamagnetice.

✓ Retenția fluidelor biologice simulate este influențată de morfologia suporturilor și proprietățile hidrofile ale suporturilor, iar viteza de degradare enzimatică *in vitro* este corelată cu conținutul de fază polimerică. Testele de citotoxicitate *in vitro*, testul MTT și testul de viabilitate celulară cu Calceină-AM, indică faptul că suporturile obținute nu eliberează substanțe toxice care să influențeze negativ activitatea celulelor.

13

# Capitolul 4. Suporturi biomimetice pe bază de biopolimeri (chitosan, colagen, acid hialuronic) și fosfați de calciu cu incluziune de particule magnetice sub formă uscată

Având în vederea datele obținute anterior obiectivul următor a fost realizarea și caraterizarea de suporturi pe bază de colagen – chitosan – acid hialuronic, nanoparticule magentice și fosfați de calciu. S-a selectat concentrația de 5 % MNPs pentru a fi inclusă în etapă de sinteză, particulele fiind introduse în formă uscată. O parte din proprietățile suporturilor au fost studiate în paralel cu cele ale suporturilor expuse la radiații UV timp de 4 ore, cu scopul de a observa eventuale modificări survenite după această procedură de iradiere, folosită pentru sterilizare în practica clinică și preclinică.

#### 4.1. Obținerea suporturilor

Etapele procesului de obținere sunt prezentate în Figura 4.1.



Figura 4.1. Obținerea suporturilor pe bază de Cs–Col–Hya și fosfați de calciu cu incluziune de particule magnetice

Pe scurt, soluții de precursori de fosfați de calciu: CaCl<sub>2</sub> (40 %) și NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (25 %), au fost amestecate cu soluții de biopolimeri: Cs (1%), C (1%), Hya (1%) și MNPs. pH-ul amestecului a fost ajustat la 7,2 -7,4 utilizând o soluție apoasă de amoniac – NH<sub>4</sub>OH, iar după spălare, amestecurile au fost liofilizate pentru 24 h [172].

#### 4.2. Rezultate și discuții

Suporturile biomimetice obținute, ce reprezintă Lot numărul 1, au fost caracterizate din punct de vedere al structurii chimice prin analiza FTIR, iar din punct de vedere al morfologiei prin SEM. De asemenea, s-a analizat comportamentul suporturilor în fluide de interes biologic, degradarea acestora, proprietățile mecanice și proprietățile magnetice al suporturilor. Citotoxicitatea suporturilor a fost analizată printr-un test MTT *in vitro* (contact indirect), iar toxicitatea *in vivo* pe animale de experență (șoareci din linia CD1).

Din punct de vedere al structurii chimice, benzi de frecvență caracteristice biopolimerilor, CP și MNPs au fost observate în toate spectrele FTIR. Nu au fost observate diferențe între spectrele suporturilor expuse la radiații UV și cele normale, ceea ce înseamnă că acest proces de sterilizare nu influențează structura chimică a suporturilor. Morfologia suporturilor a fost analizată în secțiune cu ajutorul SEM. S-a remarcat o structură poroasă a suporturilor, cu CP și MNPs distribuite pe suportul polimeric. La fel ca în cazul structurii chimice, radiațiile UV nu influențează morfologia suporturilor, astfel, acest proces de sterilizare poate fi utilizat pentru pregătirea probelor în vederea realizării lor *in vitro* și *in vivo*.

Pentru studiile de degradare *in vitro* s-a studiat interacțiunea cu un amestec de două enzime: lizozim și colagenază, enzime implicate *in vivo* în procesele de degradarea a chitosanului, respectiv colagenului. Viteza de degradare a crescut gradual în timp, în cazul ambilor biopolimeri.

Din punct de vedere al proprietăților magnetice, valorile obținute pentru magnetizare au indicat un caracter superparamagnetic al suporturilor.

Modulul de elaticitate (modulul Young) are valori diferite pentru fiecare din cele două tipuri de țesut osos; este cuprins între 7 și 30 GPa pentru țesutul osos compact și între 20 și 500 MPa pentru țesutul osos spongios [168]. Valorile obținute în cazul suporturile preparate au fost cuprinse între 38,41 MPa și 226,71 MPa, valori ce se încadrează în intervalul corespunzător modulului Young al țesutului osos spongios.

#### 4.2.3. Interacțiunea suporturilor cu fluide

Gradul de retenție al fluidelor în suporturile preparate pentru aplicații în inginerie tisulară influențează răspunsul suporturilor la difuzia celulelor, nutrienților și medicamentelor, caracteristici foarte importante pentru aplicația vizată [175]. S-au analizat trei fragmente din fiecare tip de suport și s-a calculat media și deviația standard. Rezultatele obținute în urma acestui studiu sunt redate în Figura 4.5.

Cea mai mare valoare a gradului de retenție a fost calculată pentru P7, suport ce are cel mai mic raport Ca/P = 1,579, iar una din cele mai mici valori ale gradului de retenție a fost calculată pentru P8, suport ce are cel mai mare raport Ca/P = 1,721, ceea ce indică o influență semnificativă a raportului Ca/P asupra retenție de fluide biologice simulate. Practic, fosfați de calciu acoperă matricea polimerică îngreunând pătrunderea soluție PBS în interior.



Figura 4.5. Gradul de retenție PBS (%) pentru suporturile obținute

#### 4.2.8. Toxicitate in vivo a suporturilor

Testele *in vivo* pentru determinarea toxicității s-au realizat utilizând animale de experiență, șoareci femele din linia CD1, în vârstă de 6 săptămâni.

După 14 zile de la implantare (Figura 4.12), materialul implantat are o structură mai "aerisită", probabil consecință a resorbției tisulare a unor constituienți.



Figura 4.12. Imagini histologice după 14 zile de la implantare. Colorare tricomic Masson

În jurul materialului implantat se remarcă o capsulă conjunctivă, formată din țesut conjunctiv tânăr, ce are tendința de sechestrare a acestuia, și care trimite scurte travei spre zona centrală a materialului implantat (Figura 4.12.A). Se observă la periferia materialului implantat travei (septe) conjunctive pornite din capsula conjunctivă periferică ce infiltrează materialul implantat, remarcându-se tendința de înglobare a acestuia (Figura 4.12.B), într-un țesut conjunctiv neoformat, lax, încă imatur, reprezentat din fibroblaste și fibre de colagen tinere (Figura 4.12.C).

După sacrificarea animalelor la 21 zile de la implantare din punct de vedere microscopic s-a observat un țesutul conjunctiv neoformat încă imatur, dezorganizat, constituit din fibroblaste active și fibre de colagen cu un aranjament anarhic, repezentat de vârtejuri și cordoane (Figura 4.14.A). De asemenea, au fost remarcate mici depozite de fosfat de calciu sechestrate în masa conjunctivă neoformată (Figura 4.14.B) și septe conjunctive constituite din țesut conjunctiv cu dispoziție diametrală, și care străbat materialul implantat cu tendința de a-l îngloba.



Figura 4.14. Imagini histologice după 21 zile de la implantare. Colorare tricomic Masson

#### 4.3. Concluzii

✓ Determinarea gradului de retenție PBS s-a realizat utilizând o metodă volumetrică, valorile obținute după 72 ore de la interacțiunea suportului cu fluidul, la 37°C, indicând o influență semnificativă a raportului Ca/P asupra proprietății studiate.

✓ Caracterul netoxic al suporturilor a fost evidențiat și *in vivo*, după ce fragmente de suporturi au fost implantate subcutanat la șoareci. După 21 zile aceștia au fost sacrificați, iar fragmentele de țesut cu implant au fost analizate macroscopic și microscopic, confirmând proprietăți adecvate de interacțiune cu țesuturile biologice.

# Capitolul 5. Suporturi biomimetice pe bază de biopolimeri (chitosan, colagen, acid hialuronic) și fosfați de calciu cu incluziune de suspensie coloidală de particule magnetice

Având în vedere proprietățile biopolimerilor (Cs, Col şi Hya) descrise în capitolele anterioare, precum şi procedeul biomimetic de co-precipitarea de fosfați de calciu (CP) din precursori (CaCl<sub>2</sub> şi NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), un lot nou de suporturi – **Lot numărul 2** a fost realizat conform metodei de obținere utilizate în capitolul 4, diferența dintre acest lot de suporturi și lotul de suporturi descrise anterior fiind dată de modalitatea de incluziune a particulelor magnetice în etapa de sinteză a suporturilor, în cazul lotului din capitol 4 particulele au fost incorporate sub formă uscată, iar în cazul acestui lot, particulele au fost încorporate sub formă de suspensie coloidală, pentru a asigura o mai bună distribuție a MNP în masa compozitului și asigurarea unor proprietăți uniforme în întreg materialul.

Pentru ambele loturi a fost utilizat un program experimental cu două variabile (concentrația de chitosan/colagen și raportul Ca/P) cu scopul de a se determina compoziția optimă a suporturilor. Respectând valorile teoretice din programul experimental s-au obținut 13 materiale. Concentrația de Hya (1%) este de 5% față de cantitatea totală de biopolimer introdusă în sinteză, iar pentru raportul Ca/P au fost alese valori apropiate de cele identificate în țesutul osos uman. Influența radiațiilor UV a fost studiată și pentru acest lot.

#### 5.1. Obținerea suporturilor

Utilizarea programului experimental a permis determinarea variabilelor răspuns Y<sub>1</sub>, care corespunde gradului de retenție PBS a suporturilor preparate (%) și Y<sub>2</sub> ce corespunde modului de elasticitate E (MPa) – Tabel 5.4.

Suporturile biomimetice pe bază de Cs–Col–Hya și fosfați de calciu cu incluziune de particule magnetice au fost caracterizate din punct de vedere al structurii și compoziției, utilizând spectroscopia FTIR, EDS și XRD și al morfologiei, prin SEM și microCT. De asemenea, s-a analizat comportamentul suporturilor în fluide de interes biologic, degradarea acestora, proprietățile mecanice și proprietățile magnetice. Citotoxicitatea suporturilor a fost analizată printr-un test MTT *in vitro* (contact direct), și toxicitatea *in vivo* pe șoareci din linia CD1.

18

Suport	$\mathbf{X}_1$	$X_2$	Y <sub>1</sub> -Retenție PBS (%)	$Y_2 - E$ (MPa)
<b>S</b> 1	-1	-1	$1217,14 \pm 219,73$	$209,25\pm32$
S2	1	-1	1096,49 ± 323,78	$279,\!47\pm22$
<b>S</b> 3	-1	1	$2392,34 \pm 173,09$	120,01 ± 34
<b>S</b> 4	1	1	$1635,22 \pm 108,71$	$162,01 \pm 24$
S5	-1,141	0	$1388,88 \pm 242,63$	86,68 ± 33
<b>S</b> 6	1,141	0	$1006,28 \pm 207,24$	122,61 ± 29
S7	0	-1,141	$1090,91 \pm 221,04$	$90,\!38\pm21$
<b>S</b> 8	0	1,141	$1212,13 \pm 54,71$	$83,72\pm12$
<b>S</b> 9	0	0	$1388,89 \pm 181,59$	$76{,}28\pm32$
S10	0	0	$1389,60 \pm 182,09$	$78,73\pm12$
<b>S</b> 11	0	0	$1460, 19 \pm 150, 2$	$80,\!89\pm24$
S12	0	0	$1410,67 \pm 100,22$	$79,42 \pm 8$
<b>S</b> 13	0	0	$1418,44 \pm 92,15$	$80,34 \pm 32$

Tabel 5.4. Programul experimental împreună cu valorile determinate pentruGradul de retenție PBS (%) și E (MPa)

#### 5.2. Rezultate și discuții

#### 5.2.1. Structura chimică a suporturilor

Datele obținute în urma analizei FTIR oferă informații despre structura suporturilor. Suporturile au fost analizate înainte și după expunere la UV pentru 4 ore, rezultatele fiind redate în Figura 5.1. S-au observat picuri pentru cei trei biopolimeri (Amide I, C=O, Amide II, N-H, funcțiile OH, grupari alifatice) fosfații de calciu ( $PO_4^{3-}$  la 563 cm<sup>-1</sup>) și nanoparticule magnetice [176].

Benzile reprezentative pentru suporturi sunt prezentate în tabelul 5.5. După cum se poate observa, benzile reprezentative pentru suporturile expuse la UV au valori foarte apropiate sau chiar identice cu cele ale suporturilor care nu au fost expuse la UV, ceea ce indică faptul că radiațiile UV nu influențează structura chimică a acestora, chiar și după o perioadă mare de timp (4 ore).

	Înainte de expunere la UV			După expunere la UV		
Grupări funcționale	B. reprez. (cm <sup>-1</sup> ) S7	B. reprez. (cm <sup>-1</sup> ) S8	B. reprez. (cm <sup>-1</sup> ) S9	B. reprez. (cm <sup>-1</sup> ) S7	B. reprez. (cm <sup>-1</sup> ) S8	B. reprez. (cm <sup>-1</sup> ) S9
ОН	3421	3418	3409	3421	3419	3415
С-Н	2937	2936	2934	2937	2942	2936
Amida I, C=O	1653	1659	1655	1655	1652	1655
Amida II, N-H	1556	1556	1552	1557	1556	1552
C-0	1030	1031	1030	1031	1030	1030
Fe-O	603	603	602	603	603	602
$PO_{3}^{-4}$	561	561	560	561	561	561

Tabel 5.5. Benzile FTIR pentru suporturile compozite S1 și S3

B. reprez – benzile reprezentative

### 5.2.2. Compoziția suporturilor

Datele XRD și EDS au determinat tipurile de fosfați de calciu formate pe matricea polimerică, cele mai reprezentative forme identificate fiind: fosfat dicalcic - CaHPO<sub>4</sub>, hidroxiapatită –  $Ca_{10}(PO_4)_6 \cdot (OH)_2$  și fosfatul tetracalcic –  $Ca_4(PO_4)_2O$ .

## 5.2.3. Morfologia suporturilor

Rezultatele SEM sunt prezentate în Figura 5.4. Figura 5.4.A. reprezintă suporturile S7, S8, S9 înainte de expunere la radiații UV, iar Figura 5.4.B. aceleași suporturi după expunere la radiații UV.



Figura 5.4. Morfologia suporturilor S7, S8, S9: A. Înainte de expunere la UV; B. După expunere la UV.

La 500  $\mu$ m se poate observa structura poroasă a suporturilor, încorporarea particulelor magnetice și a cristalelor de calciu în matricea polimerică și faptul că nu există diferențe între suporturile sterilizate și cele nesterilizate.

Pentru un studiu mai detaliat al morfologiei suporturilor, fragmente din acestea au fost scanate utilizând sistemul Skyscan Bruker 1172, parametrii de lucru fiind 25 kV, 130  $\mu$ A și o rotație de 0.5°. Proiecțiile astfel obținute au fost procesate și reconstruite utilizând programul NRecon (Bruker, Belgium), rezultatele fiind redate în Figura 5.5.



Figura 5.5. Dimensiunea și distribuția porilor pentru suporturile S6, S7, S8, S9

Trei regiuni de interes au fost selectate pentru fiecare proba, iar programul CTAn a fost utilizat pentru calcularea dimensiunii porilor precum și dimaterului de percolație. Pentru calcularea porozității s-a utilizat metoda "sphere-fitting" regasită în aplicația BatMan a programului CTAn. Pentru calcularea diametrului de percolație s-a utilizat metoda descrisă de Ashworth și colaboratorii [180]. Pe scurt, metoda "shrink wrap" a fost aplicată pentru a identifica volumul accesibil unui obiect virtual care poate penetra întreaga regiune de interes utilizând urmatoare ecuație:

$$L = L_0 (d - d_c)^{-\theta} \tag{16}$$

unde 𝔊 este o constantă de percolație egală cu 0,88 pentru sistemele 3D [181].

Vizualizarea distribuției porilor a fost efectuată utilizând programul CTVox (Bruker, Belgium). Astfel o funcție de transfer a distribuției porozității a fost suprapusă peste reconstrucția 3D a probei de investigat, iar un cod de culoare a fost desemnat pentru vizualizare.

Suportul care are cea mai mare dimensiune a porilor a fost suportul S7, iar suportul cu cea mai mică dimensiune a porilor a fost suportul S8. Aceste două suporturi sunt practic suporturile cu cel mai mic raport Ca/P – S7 (Ca/P = 1,579) și cel mai mare raport Ca/P – S8 (Ca/P = 1,721), ceea ce a indicat o influență semnificativă a conținutului de fază minerală asupra porozității suporturilor. În ceea ce privește comparația porozității suporturilor din punct de vedere al compoziției de biopolimeri, s-a observat o dimensiune mai mare a porilor suportului S6 (conținând un raport mai mare de colagen).

#### 5.2.4. Proprietățile mecanice ale suporturilor

Valorile obținute pentru modulul Young (Figura 5.6) au fost cuprinse între 76,28 MPa și 279,47 MPa, valori ce se încadrează în intervalul 0,02 - 0,5 GPa (20 - 500 MPa) corespunzător valorilor Modulului Young al țesutului osos spongios, interval în care s-au încadrat și valorile obținute pentru suporturile caracterizate în capitolul 4.



Figura 5.6. Modulul Young (MPa) pentru suporturile pe bază de Cs–Col–Hya și fosfați de calciu cu incluziune suspensie coloidală de particule magnetice

Cea mai mare valoare a lui E s-a obținut pentru suportul S2, având următoarea compozițe: 35 % Cs, 65 % Col și raportul Ca/P = 1,6, iar cea mai mică valoare s-a obținut pentru suportul S9, având următoarea compozițe: 50 % Cs, 50 % Col și raportul Ca/P = 1,65.

#### 5.2.6. Interacțiunea suporturilor cu fluide de interes biologic

Valorile gradului de retenție obținute pentru suporturi sunt prezentate în Tabelul 5.3 și Figura 5.7. Valorile mari ale gradului de retenție pot fi explicate de structura poroasă a suporturilor, dovedită de datele SEM, precum și de proprietățile hidrofile ale celor trei biopolimeri utilizați la fabricarea suporturilor.



Figura 5.7. Grad de retenție PBS în funcție de compoziția inițială a compozitelor

Se poate afirma că o parte din PBS interacționează cu matricea polimerică, iar o altă parte este reținută fizic în porii suporturilor. Inițial, din PBS moleculele de  $H_2O$  intră în suporturi prin pori pentru a umple spațiile interne. Pe de altă parte, numărul de grupe polare este, de asemenea, un factor important care afectează hidrofilia materialului [182]. Adăugarea de fosfați de calciu în compoziția suporturilor duce la o scădere a gradului de retenție.

#### 5.2.7. Degradare enzimatică in vitro a suporturilor

Pentru studiile de degradare *in vitro* s-a utilizat degradarea enzimatică, utilizând un amestec de două enzime: lizozim și colagenază. Metoda de lucru utilizată a fost aceeași ca cea utilizată pentru degradarea suporturilor obținute și caracterizate în capitolul 4: 10 mg din fiecare probă s-a imersat în 5 ml soluție de PBS cu lizozim (1200  $\mu$ g/ml) și colagenază (100  $\mu$ g/ml) aflată într-o membrană de dializă, introdusă apoi în 10 ml din același PBS, după care au fost incubate la 37°C. La intervale de timp prestabilite s-a extras și analizat un volum din

cei 10 ml PBS în vederea determinării concentrațiilor de chitosan degradat, respectiv de colagen degradat.

#### 5.2.7.1. Determinarea concentrației de chitosan degradat

Concentrația de chitosan degradat a fost analizată la 2 ore, 48 ore, 7 zile și 14 zile, datele obținute în urma studiului fiind prezentate în Figura 5.8.



Figura 5.8 Concentrația de chitosan degradat pentru suporturile S5 – S9

Comparând valorile obținute nu s-a observat o dependență clară a vitezei de degradare cu concentrația de chitosan, chiar dacă toate materialele sunt degradate treptat. Comportamentul se datorează interacțiunilor ionice ale chitosanului cu colagenul și fosfații de calciu care modifică conformația situsului de legare pentru lizozim [183].

#### 5.2.7.2. Determinarea concentrației de colagen degradat

Hidrolizarea colagenului din suporturi, catalizată de colagenază, enzima implicată în procesul de degradare al acestei proteine *in vivo*, are două etape. Într-o primă etapă, enzima se atașează la suport și apoi rupe situsurile care corespund structurilor de aminoacizi pentru care enzima are specificitate. Condițiile de mediu (pH, tărie ionică, inhibitori de enzime) și caracteristicile materialelor (compoziție, structură supramoleculară și porozitate) sunt parametri care dictează viteza de degradare și biointegrarea controlată a suportului. Toate suporturile au fost degradate în timp, cu viteze diferite. Concentrația de colagen degradat a fost analizată la 4 ore, 48 ore, 72 ore și 7 zile, datele obținute în urma studiului fiind prezentate în Figura 5.9.



Figura 5.9. Concentrația de colagen degradat pentru suporturile S5 – S9

#### 5.2.8. Citotoxicitatea in vitro a suporturilor

#### 5.2.8.1. Testul MTT

Citotoxicitatea *in vitro* a suporturile obținute a fost analizată utilizând un test MTT, test ce a oferit informații despre viabilitatea a trei linii diferite de celule: fibroblate, celule STEM și osteoblaste (Figura 5.11), la contactul direct cu fragmente de suporturi.

Rezultatele obținute indică lipsa citotoxicității suporturilor asupra fibroblastelor, valorile viabilității celulare fiind mai mari de 80%, pentru toți cei trei timpi de contact.



Figura 5.11. Viabilitatea celulară în urma contactului direct cu suporturile S1, S3, S13: A. Celule stem, B. Osteoblaste

În urma contactului direct al suporturilor pentru 24 ore, 48 ore, respectiv 72 ore cu celule stem, rezultate redate în Figura 5.11.A, s-au obținut valori ale viabilității celulare ce cresc în timp, ajungând la 72 ore la valori de 97 % (S1), 98 % (S13) și 99 % (S3) ceea ce indică o bună citocompatibilitate a materialelor.

Suporturile S1, S3 și S13 au fost aduse în contact direct și cu osteoblaste, rezultate fiind redate în Figura 5.11.B, valorile de viabilitate celulară încadrându-se după 72 ore de contact, între 78% și 92%, sugerând faptul că suporturile S1 și S3 prezintă o compatibilitate tisulară adecvată.

#### 5.2.9. Toxicitatea in vivo a suporturilor

După Hench și Best, dacă biomaterialul este (I) toxic, țesuturile din jur mor; (II) netoxic și biologic inactiv (aproape inert), apare un țesut fibros de formă și grosime variabilă; (III) netoxic și biologic activ (bioactiv), se produce o legătură interfacială strânsă materialstructură biologică; (IV) netoxic și se dizolvă, țesuturile din jur îl înlocuiesc [185].

În cazul bioimplanturilor, diferite tipuri de celule interacționează și conduc la răspunsuri specifice, iar înțelegerea acestor mecanisme ne conduc către realizare unor suprafețe de implant cu o mult mai mare compatibilitate cu structurile biologice.

Toxicitatea *in vivo* a suporturilor din acest lot a fost studiată pe șoareci femele din linia CD1, în vârstă de 6 săptămâni și cu greutatea medie de  $28 \pm 3$  grame, într-o stare de întreținere foarte bună, găzduițiți în condițiile adecvate.

Pentru implant, materialele au fost secționate sub forma unor discuri cu diametrul de 15 mm ( $A = 176,71 \text{ mm}^2$ ), apoi au fost sterilizate prin expunerea la radiații ultraviolete timp de 10 minute. Animalele au fost grupate în 3 loturi: lotul 7 (corespunzător suportului S7), lotul 8 (corespunzător suportului S8) și lotul 9 (corespunzător suportului S9), fiecare lot cuprinzând un număr de 12 animale. Durata studiului a fost de 64 de zile. La finalul primelor 48 ore de experiment au fost sacrificați câte 3 șoareci din fiecare lot (7, 8, 9), apoi câte alți 3 din fiecare lot la intervale de 12, 34, respectiv 64 de zile.

Reacția organismului, este evidentă în primele 48 de ore de la implantare, manifestată printr-un proces inflamator accentuat la suporturile S7 (Figura 5.13) și S8 (Figura 5.14), și mai redus ca intensitate în cazul suportului S9. Se constată un aflux celular semnificativ, reprezentat de macrofage, neutrofile, leucocite, rare limfocite, fibroblaste și fibre de colagen. Infiltratul inflamator a fost mai redus, caracterizat prin prezența de rare leucocite, neutrofile și macrofage, la S9. La 10 zile de la prima evaluare (12 zile de la debutul experimentului), la

suporturile S7 și S8, reacția fibroasă periferică este mai intens exprimată prin fibroblaste și fibre de colagen cu orientare concentrică.



Figura 5.13. Suportul S7 la 48 ore, 12 zile, 34 zile și 64 zile post-implantare. Col. tricromică Masson

După 64 de zile de la implantare, se înregistrează o tendință evidentă de asimilare și resorbție a celor trei tipuri de biomateriale și delimitarea acestora în insule mici izolate de țesut fibros.



Figura 5.14. Suportul S8 la 48 ore, 12 zile, 34 zile și 64 zile post-implantare. Col. tricromică Masson

Răspunsul organismului, a fost unul normal pentru toate suporturile, caracterizat printro reacție inflamatorie acută, a cărei intensitate s-a redus după primele 48 de ore.

#### 5.3. Concluzii

✓ Datele FTIR au evidențiat prezența de picuri caracteristice pentru toate componentele suporturilor. Suporturile au fost sterilizate prin expunere la radiații UV timp de 4 ore. Comparând datele FTIR pentru suporturile expuse la UV și cele ne-expuse, nu s-au observat diferențe, benzile reprezentative ale grupărilor funcționale specifice componentelor suporturilor având valori foarte apropiate sau chiar egale.

✓ Datele XRD și EDS au determinat tipurile de fosfați de calciu formate pe matricea polimerică, cele mai reprezentative forme identificate fiind: fosfat dicalcic – CaHPO<sub>4</sub>, hidroxiapatită – Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub> · (OH)<sub>2</sub> și fosfatul tetracalcic – Ca<sub>4</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>O.

✓ Datele SEM, au evidențiat structura poroasă a materialelor, CP și MNPs fiind distribuite uniform în matricea polimerică. Ca și în cazul datelor FTIR s-a studiat în paralel și morfologia suporturilor expuse la radiații UV, demonstrându-se că acest tip de sterilizare nu influențează morfologia acestora. Un studiu mai detaliat al morfologiei a fost efectuat cu ajutorul analizei microCT.

✓ Valorile obținute pentru modulul Young se situează în intervalul 76,28 MPa – 279,47 MPa. Rezultatele sunt încurajatoare, deoarece pentru osul spongios, acest parametru se încadrează între 20 MPa și 500 MPa. În ceea ce privește proprietățile magnetice ale suporturilor, s-a calculat magnetizarea, valorile obținute fiind cuprinse între 22,41 și 67,33 emu/g. Aceste valori indică faptul cu suporturile sunt superparamagnetice.

✓ Gradul de retenție al fluidelor în suporturile compozite are valori foarte mari, cuprinse între 945 % și 2248 %, valori corelate cu structura poroasă și proprietățile hidrofile ale biopolimerilor din compoziție. Degradarea enzimatică a suporturilor s-a realizat cu o viteză constantă în timp, atât pentru Cs cât și pentru Col.

✓ Citotoxicitatea *in vitro* a suporturilor a fost testată pe trei linii celulare diferite: fibroblaste, osteoblaste și celule STEM. Un test MTT standard a fost realizat la 24 ore, 48 ore și 72 ore, la fiecare timp calculându-se viabilitatea celulară. Suporturile nu au efect citotoxic asupra celulelor, cele mai bune rezultate fiind observate pentru celulele STEM.

✓ Toxicitatea *in vivo* a suporturilor a fost studiată pe o perioadă de 64 zile de la implantarea subcutanată la șoareci a fragmentelor sterilizate de suporturi. Analizând în amănunt datele histologice obținute la diverse intervale de timp, la sfârșitul testului s-a ajuns la concluzia că suporturile nu au efect toxic *in vivo*.

# Capitol 6. Studii privind reproductibilitatea metodei de preparare a suporturilor biomimetice pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu cu incluziune de particule magnetice și utilizarea acestora în radio-chimioterapia tumorilor osoase maligne

# 6.1. Reproductibilitatea metodei de preparare a suporturilor biomimetice pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu, cu incluziune de particule magnetice

Reproductibilitatea este una din ipotezele de bază în experimentele științifice. Dacă un experiment nu este reproductibil, rezultatele lui nu poate fi dovedite deci, prin urmare, nu pot fi acceptate. În ceea ce privește reproductibilitatea rezultatele științelor biomedicale, problema principală este dată de complexitatea proceselor de cercetare științifice.

În capitolele 4 și 5 au fost prezentate prepararea și caracterizarea a două loturi de suporturi, ambele fiind realizate printr-un procedeu biomimetic de co-precipitare.

Diferența dintre cele două loturi de material este data de modalitatea de incluziune a particulelor magnetice în etapa de sinteză a suporturilor, obținându-se în cele din urmă:

 Lot numărul 1: Suporturi biomimetice pe bază de biopolimeri (chitosan, colagen, acid hialuronic) și fosfați de calciu cu incluziune de particule magnetice sub formă uscată;
 Lot numărul 2: Suporturi biomimetice pe bază de biopolimeri (chitosan, colagen, acid hialuronic) și fosfați de calciu cu incluziune de suspensie coloidală de particule magnetice.

#### 6.1.1. Obținerea suporturilor

În urma unor analize riguroase ale celor două loturi de suporturi, lotul numărul 2 s-a dovedit a avea proprietăți adecvate pentru aplicația vizată, iar din acest lot, suportul numărul 9 – S9 s-a dovedit a fi cel mai aproape de un suport ideal.

Astfel, pentru a demonstra reproductibilitatea metodei, obiectivele următoare au fost obținerea și caracterizarea a 7 suporturi având compoziția teoretică a suportului 9; suporturile obținute au fost notate S9.1 – S9.7.

#### 6.1.2.1. Structura chimică a suporturilor

Rezultatele redate în Figura 6.1. indică prezența picurilor caracteristice tuturor componentelor, cei trei biopolimeri, fosfații de calciu și nanoparticule magnetice [136]. După cum se poate observa în Figura 6.1. suporturile analizate prin FTIR au structură chimică

asemănătoare, componentele din structura lor având benzile reprezentative apropiate sau chiar egale.



Figura 6.1. Spectre FTIR pentru suportul S9.2 și suportul S9.7

## 6.1.2.2. Morofologia suporturilor

Morfologia suporturilor a fost analizată în ansamblu cu ajutorul SEM (Figura 6.2.). Nu se observă diferențe de morfologie între suporturile analizate, o structură tridimensională cu pori intercomunicabili fiind identificată la ordine de mărire diferite.



Figura 6.2. Imagini de microscopie electronică pentru suportul S9.2 și suportul S9.7, la diferite grade de mărire

#### 6.1.2.3. Proprietățile mecanice ale suporturilor

Rezultatele experimentale sunt prezentate în Figura 6.4. Valorile obținute pentru rezistența la compresiune se situează în jurul valorii de 5,8 MPa, iar valorile modulului Young sunt cuprinse între 215 MPa și 220 MPa, valori determinate în mare parte de porozitatea ridicată a compozitelor obținute prin procedeul de liofilizare. Se observă valori apropiate ale rezistenței la compresiune a suporturilor, precum și a modului Young calculat, metoda este deci reproductibilă și din punct de vedere al proprietăților mecanice ale suporturilor obținute.



Figura 6.4. A. Rezistența la compresiune a suporturilor; B. Modulul Young pentru suporturi

#### 6.1.2.4. Interacțiunea suporturilor cu fluide de interes biologic

Rezultatele obținute în urma studiului de determinare a retenției fluidelor de interes biologic sunt redate în Figura 6.5.



Figura 6.5. Grad de retenție PBS (%) pentru suporturile S9.1-S9.7

Valorile mari ale gradului de retenție pot fi explicate de structura poroasă a suporturilor, dovedită de datele de microscopie electronică de baleiaj (Figura 6.2). Acestea sunt cuprinse între 685% și 909%, cu o medie a valorilor obținute de 781%. Această diferență de 224% între valoarea maximă și valoarea minimă obținute poate fi explicată de faptul că dimensiunea porilor nu este uniformă, conform tabelului 6.2 această este de  $121 \pm 56$ , pentru suportul S9.4.

#### 6.1.2.5. Degradare enzimatică in vitro a suporturilor

Degradarea enzimatică este cea mai utilizată metodă de caracterizare a biodegradabilității unui suport. Suporturile S9.1 – S9.7 au fost supuse degradării enzimatice determinându-se concentrațiile de chitosan și colagen degradat, la intervale stabilite.

Se observă o creștere graduală în timp a concentrație de chitosan degradat (Figura 6.6) ceea ce indică o degradare controlată a suporturilor, proprietate foarte importantă pentru aplicația vizată, deoarece o viteză de degradare prea rapidă implică o refacere incompletă a țesutului osos, iar o viteză de degradare prea lentă, poate duce la o fractură, sau la o deformație a osului. Se pot observa valori apropiate ale concentrație de chitosan degradat ceea ce indică reproductibilitatea metodei de sinteză.



Figura 6.6. Concentrația de chitosan degradat

În ceea ce privește concentrația de colagen degradat, rezultatele sunt prezentate în Figura 6.7. Se observă valori constante în timp ale concentrație de colagen degradat.



Figura 6.7. Concentrația de colagen degradat

Degradarea colagenului se realizeză gradual, pe măsură ce enzima, în cazul de față colagenaza, reușește să străbată matricea anorganică formată din fosfați de calciu și să ajungă la matricea organică, polimerică. Valorile obținute pentru cele 7 suporturi analizate sunt apropiate, procesul de degragare gradual fiind observată pentru toate cazurile.

#### 6.1.2.6. Evaluarea citotoxicității in vitro a suporturilor

Fragmente de suporturi au fost puse în contact direct cu osteoblaste, rezultatele fiind redate în Figura 6.8.A. Valorile obținute pentru viabilitatea celulară sunt în jur de 80% pentru toate intervalele de contact, ceea ce indică faptul sunt lipsite de citotxicitate.



Figura 6.8. Viabilitatea celulară în urma contactului direct cu suporturilor: A. Osteoblate; B. Fibroblaste

În urma contactului direct al suporturilor cu fibroblaste, rezultate redate în Figura 6.8.B, s-au obținut valori ale viabilității celulare ce cresc în timp, ajungând la 72 ore la valori de aproximativ 100% suporturile analizate, ceea ce indică a foarte bună citocompatibilitate.

Pentru a reconfirma citotoxicității suporturile la contactul direct cu fibroblastele și reproductibilitatea metodei de sinteză, s-a realizat și un test de viabilitate celulară cu calceină-AM, rezultatele obținute fiind prezentate în Figura 6.9.



Figura 6.9. Structura și morfologia celulelor cultivate pe compozite (72 ore, marcare Calcein AM)

# 6.2. Studii privind potențiala aplicație a suporturilor în radio-chimioterapia tumorilor osoase maligne

Tratamentul tumorilor osoase maligne reprezintă o adevărată provocare clinică, deoarece rezecția chirurgicală a tumorii și radioterapia nu reușesc să elimine complet țesutul tumoral. În mod particular, protocolul de tratament al osteosarcoamelor începe cu rezecția chirurgicală a tumorii osoase primare și a eventualelor metastaze. Defectul osos obținut este acoperit cu un material de substituție osoasă, pentru a preveni fracturile sau deformațiile osoase [206]. Deoarce tumorile osoase sunt aproape imposibil de îndepărtat în totalitate, intervențiile chirurgicale sunt urmate de radio/chimioterapie [207]. Chimioterapia, care precede de regulă celelalte două tehnici, are efecte adverse semnificative și totodată, în unele cazuri poate apărea o rezistență la aceste medicament [204].

Radioterapia se încadrează adesea în schemele de tratament a diferitelor tipuri de cancer, rezultatele obținute de-a lungul timpului în practica clinică fiind eficiente. Utilizând radiații ionizate, raze X, radioterapia generează stres oxidativ excesiv și induce denaturarea ADN-ului, ce va conduce la moartea celulelor tumorale [208].

Suporturile obținute în capitolele anterioare, au potențial de a fi utilizate pentru umplerea defectului osos rezultat după rejecția chirurgicală a tumorii, și pentru eliberarea țintită de chimioterapice încorporate în nanoparticulele magnetice din structura lor. Scopul strategiilor experimentale descrise în cele ce urmează a fost testare potențialului suporturilor obținute de a fi utilizate în radio-chimioterapia tumorilor osoase maligne. Inițial, suporturile au fost expuse la radiații X pentru a stabili influența asupra structurii și proprietăților acestora. În etapa următoare, s-a studiat încărcarea și eliberarea de chimioterapice (doxorubicină – DOX) din nanoparticulele magnetice incluse în suporturi [213].

#### 6.2.1. Obținerea suporturilor

Șase suporturi au fost preparate după protocolul descris în capitolul 5. Pe scurt, suporturile au fost obținute prin co-precipitarea  $CaCl_2$  și a  $NaH_2PO_4$  pe un substrat de biopolimeri (Cs, Col, Hya) și MNPs, în prezența unei soluții apoase de amoniac (NH<sub>4</sub>OH). În tabelul 6.3 sunt detaliate codificările, compoziția și caracteristicile distinctive ale suporturilor.

Suporturile preparate au fost testate în vederea unei potențiale utilizări în radiochimioterapia tumorilor osoase maligne, tehnică redată schematic în Figura 6.12.

Suport	Compoziția biopolimerică	Ca/P	Concentrația de MNPs	Caracteristica distinctivă
S5	28.79% Col, 71.21% Cs	1.65	5% MNPs	Control
<b>S</b> 9	50 % Cs, 50% Col	1.65	5% MNPs	Control
S5R	28.79% Col, 71.21% Cs	1.65	5% MNPs	Iradiate cu raze X
S9R	50 % Cs, 50% Col	1.65	5% MNPs	Iradiate cu raze X
S5-DOX	28.79% Col, 71.21% Cs	1.65	5% MNPs-DOX	MNPs încărcate cu DOX
S9-DOX	50 % Cs, 50% Col	1.65	5% MNPs-DOX	MNPs încărcate cu DOX

Tabel 6.3. Codificarea și compoziția suporturile obținute și caracteristica lor distinctivă



Figura 6.12. Obținerea suporturilor și aplicarea în tratamentul tumorilor osoase maligne utilizând tehnici de radioterapie și chimioterapie

#### 6.2.2. Tehnica de iradierea cu raze X a suporturilor

Iradierea suporturilor cu raze X s-a realizat cu ajutorul dispozitivului CT-Sim Siemens (figura 6.10), respectând parametrii și condițiile utilizate în cazul metastazelor osoase, fiind aplicată o doza de radiații de 8 Gy/fracțiune unică [214-216]. Planul de tratament a fost realizat utilizând software-ul Eclipse<sup>™</sup> Planning Treatment System. Pentru o distribuție omogenă a dozei în volumul materialului, a fost plasat un bolus de 10 mm grosime pe suprafața materialului, rezultând o includere suficientă în izodoza 95 (prezentată în verde, în Figura 6.10.B) pentru V2.



Figura 6.10. A. Conturarea volumului țintă pe imaginile CT ale eșantionului; B. Distribuția dozei de radiații în volum de suport după aplicarea bolusului

#### 6.2.3. Teste *in vitro* de încărcare/eliberare de medicament (doxorubicină)

În vederea încărcării cu medicament a nanoparticulele magnetice într-o suspensie coloidală de 1% MNPs în apă s-a solubilizat doxorubicină, astfel încât concentrația de medicament să fie 0.125 %, nanoparticulele astfel obținute fiind notate cu MNPs-DOX. Suspensia finală a fost utilizată la prepararea suporturilor S5-DOX și S9-DOX, conform datelor experimentale din tabelul 6.3.

Pentru evaluarea suporturilor s-au analizat: structura și morfologia acestora, eliberarea controlată de medicamente antitumorale și citotoxicitatea *in vitro* la contactul direct cu celule tumorale. Structura chimică a suporturilor preparate a fost analizată cu ajutorul spectroscopiei FTIR, iar morfologia lor cu ajutorul microscopiei electronice SEM.

Pentru suporturile S5, S5R, S9, S9R a fost analizată interacțiunea cu PBS (grad de retenție maxim PBS) și s-au efectuat studii de degradare *in vitro* utilizând un amestec de enzime: lizozim (1200  $\mu$ g/ml) și colagenază (100  $\mu$ g/ml). De asemenea, a fost studiată citotoxicitatea suporturilor sterilizate (expuse la o oră la radiațiile UV) utilizând celule osoase din linia MG-63. Un test MTT standard a fost efectuat la 24, 48 și 72 de ore și a fost calculată viabilitatea celulară.

Pentru suporturile S5-DOX și S9-DOX s-a analizat eliberarea de medicament *in vitro* și interacțiunea cu celule MG-63. Suporturile au fost sterilizate tot prin expunere la UV pentru o oră, după care au fost puse în contact direct cu celulele. În paralel o soluție stoc de doxorubincină a fost preparată în condiții sterile, diferite concentrații fiind analizate din punct de vedere al interacțiunii cu același tip de celulele. Viabilitatea celulară a fost calculată cu ajutorul unui test MTT standard.

#### 6.2.4. Rezultate și discuții

#### 6.2.4.1. Structura chimică și morfologia suporturilor

Analiza FTIR a fost utilizată pentru studiul structurii chimice a suporturilor, rezultatele fiind redate în Figura 6.13.

Între suporturile iradiate și neiradiate (Figura 6.13.A) nu se observă diferențe de structură chimică, benzile de absorbție caracteristice biopolimerilor, nanopaticulelor magnetice și fosfaților de calciu fiind observate în toate spectrele FTIR. În ceea ce privește biopolimerii, se pot observa următoarele picuri caracteristice: 3439 cm<sup>-1</sup>, 3434 cm<sup>-1</sup> și 3489 cm<sup>-1</sup> pentru gruparea hidroxil, 2925 cm<sup>-1</sup>, 2924 cm<sup>-1</sup> și 2927 cm<sup>-1</sup> pentru -CH<sub>2</sub>; 1652 cm<sup>-1</sup>, 1654 cm<sup>-1</sup> și 1649 cm<sup>-1</sup> pentru amida I, 1552 cm<sup>-1</sup> și 1554 cm<sup>-1</sup> pentru amida II [219].



Figura 6.13. Spectrele FTIR ale suporturilor

Spectrele FTIR ale suporturilor conținând MNPs-DOX și al DOX sunt redate în Figura 6.13.B. Spectrul DOX prezintă următoarele benzi caracteristice: 2929 cm<sup>-1</sup> pentru vibrația de întindere a legăturii C-H, 1730 cm<sup>-1</sup> pentru vibrația de întindere a legăturii C=O, 1617 cm<sup>-1</sup> și 1525 cm<sup>-1</sup> pentru legătura N–H, 1411 cm<sup>-1</sup> pentru vibrația de întindere a legăturii C–C și 1286 cm<sup>-1</sup> pentru vibrația de întindere a legăturii C–O–C. O parte din aceste benzi au fost observate și pe spectrele corespunzătoare suporturilor S5-DOX și S9-DOX ceea ce confirmă prezența medicamentului alături de celelalte componente ale suporturilor.

Morfologia suporturilor realizate cu scopul de a fi utilizate în regenerarea osoasă este o caracteristică foarte importantă de care trebuie să se țină cont în procesul de sinteză. Aceste

suporturi trebuie să aibă porozitatea și dimensiunea porilor adecvate aplicației vizate. Rețelele cu pori interconectați influențează puternic procesul de nutriție a celulelor, proliferarea și migrarea acestora, precum și vascularizare suportului [220].

# 6.2.4.2. Interacțiunea suporturilor cu fluide de interes biologic și degradarea enzimatică a acestora

Rezultatele obținute cu privire la interacțiunea suporturilor cu fluide de interes biologic sunt prezentate în Figura 6.15. Diferența dintre valorile gradului de retenție pentru S5 și S5R este de aproximativ 45%, iar între S9 și S9R este nesemnificativă. În cazul suporturilor S5 și S5R diferență poate fi explicată de dimensiunea neuniformă a porilor, la fel ca și în cazul suporturilor realizate pentru studiul reproductibilității.



Figura 6.15. Gradul de retenție a PBS-ului în suporturile iradiate și acelor neiradiate

Degradarea enzimatică a suporturilor a fost studiată utilizând un amestec de două enzime: lizozim și colagenază. Potrivit lui Brouwer și colaboratorii [221], concentrația de lizozimă în serul uman este de 950-2450 µg/L, dar niveluri crescute pot fi observate în bolile benigne: bolile inflamatorii intestinale, unele afecțiuni hematologice (policitemia vera, mielomul multiplu) și procesele maligne cum ar fi leucemiile [222]. În ceea ce privește aceste date din literatură, s-a ales o concentrație de 1200 µg/ml, dat fiind că suporturile sunt destinate tratamentului tumorilor osoase și, probabil, un nivel ridicat de lizozim va fi găsit în os. Deoarece colagenul este cea mai predominantă proteină din corpul uman, nivelurile de colagenază sunt greu de măsurat cu precizie, această enzimă fiind găsită în toate țesuturile/ organele în care există colagen. Colagenaza interstițială are un rol-cheie în remodelarea normală și patologică a matricelor extracelulare colagen, inclusiv a țesutului osos și a țesutului conjunctiv [224].

Rezultatele studiului au fost redate în Figura 6.16.A – reprezentând cantitatea de chitosan degradat și 6.16.B – reprezentând cantitatea de colagen degradat.



Figura 6.16. A. Concentrația de chitosan degradat; B. Concentrația de colagen degradat

Se observă în ambele cazuri o creștere graduală a cantității de polimer degradat, chitosan, respective colagen. Valorile obținute sunt comparabile, ceea ce indică că radiațiile X nu influențează nici interacțiunea suporturilor cu fluide biologice simulate, în cazul de față un amestec de enzime în PBS ( pH=7.2, 0.01M).

#### 6.2.4.3. Citotoxicitatea in vitro a suporturilor

Citotoxicitatea suporturilor a fost analizată prin metoda contactul direct a suporturilor cu osteoblastele liniei MG-63 (Figura 6.17). La 72 ore de la contactul direct al celulelor cu fragmente de suport se observă o diferență de aproximativ 10 procente între suporturile care nu au fost expuse radiațiilor și cele care au fost expuse. Rezultatul nu trebuie interpretat ca fiind negativ, în condițiile în care rolul radiațiilor este de a distruge ceulele tumorale, osteoblastele Mg-63 fiind o linie de celule tumorale (osteosarcoame). Radiațiile au fost absorbite de aceste suporturi, cu o posibilă formare de radicali liberi, fără însă a influența structura lor chimică, morfologia și interacțiunea cu medii biologice simulate.

În ceea ce privește eliberarea *in vitro* a DOX din suporturi, o eliberare treptată poate fi observată (Figura 6.18). Sistemele magnetice de eliberare controlată a medicamentelor au multiple avantaje față de metodele normale, cum ar fi capacitatea de a viza un anumit loc țintă în organism și reducerea cantității de medicament necesară pentru a atinge o anumită concentrație la locul țintă, ceea ce implică o reducere a concentrației medicamentului în organele din vecinătate, fiind minimizate efectele secundare [226].

Doxorubicina - DOX este un medicament pentru tratamentul metastazelor osoase și a tumorilor osoase, utilizarea sa fiind limitată de efectele secundare sistemice. DOX este un antibiotic antraciclinic, care, la nivel molecular, interacționează cu ADN-ul și interferează cu sinteza acidului nucleic, având efect asupra transcripției ADN-ului [227, 228].



Figura 6.17. Viabilitatea celulară a osteoblastelorFigura 6.18. Curbele cinetice de eliberare aîn urma contactului direct cu suporturileDOX din suporturi

Pentru suportul S5-DOX eliberarea a fost mai constantă în timp. De remarcat este faptul că aceast suport are o cantitate considerabilă de chitosan în compoziție, comparativ cu S9-DOX. Trebuie reamintit fapul că toate MNPs utilizate în teza de față au fost acoperite cu chitosan pentru o mai bună citocompatibiliate și pentru a putea lega principii active.

# 6.2.4.5. Interacțiunea cu celule a suporturilor conținând MNPs-DOX și a medicamentului antitumoral

Interacțiunea suporturilor preparate în sub-capitolul de față a fost studiată în paralel cu interacțiunea suporturilor fără medicament încorporat. S-a optat pentru contactul direct al fragmentelor de suport, iar drept celule tumorale, s-au utilizat tot osteoblaste din linia MG-63. Rezultatele studiului sunt redate în Figura 6.18. Viabilitatea celulară a suporturilor a fost aproape de 100% la primii 2 timpi de contact: 24 și 48 ore, atât pentru suporturile cu medicament cât și pentru cele fără medicament. Însă la 72 ore de contact a suporturilor cu osteoblastele s-a observat o scădere semnificativă a viabilității acestora, valorile obținute fiind: 64% pentru S5-DOX, respectiv 75% pentru S9-DOX, pentru suporturile fără DOX valorile au scăzut nesemnificativ. Această scădere bruscă de viabilitate, ar putea fi explicată de faptul cu DOX este eliberată treptat din suporturi la un raport relativ scăzut; proprietatea de eliberare lentă a DOX poate fi utilizată și pentru alte medicamente anti-tumorale puternice sau

combinații de medicamente care ar putea fi transportate la zona țintă și eliberate la un raport optim în țesutul tumoral [232].



Figura 6.18. Viabilitatea celulară a osteoblastelor în urma contactului direct A. Cu soluții de DOX de concentrații diferite; B. Cu suporturile având DOX în compoziție și a celor fără DOX

## 6.3. Concluzii

✓ Pentru a demonstra reproductibilitatea metodei, au fost preparate 7 suporturi având compoziția teoretică a suportului S9 și caracterizate din punct de vedere al structurii chimice și a compoziției, din punct de vedere al morfologiei, s-a urmărit comportamentul suporturilor în fluide de interes biologic, degradarea acestora și s-au analizat proprietățile mecanice. Citotoxicitatea suporturilor a fost analizată printr-un test MTT și marcare a celulelor viabile cu Calceină-AM. Toate analizele menționate au demonstrat faptul că metode de preparare propusă este reproductibilă.

✓ În a doua parte a studiului s-a testat potențiala aplicație a suporturilor în radiochimioterapia tumorilor osoase maligne. În primul rând, s-a demonstrat că o doză de radiații X, similară cu cea utilizată în cazul iradierii metastazelor osoase, nu a influențat caracteristicile suporturilor cum ar fi structura, morfologia, proprietățile de degradare *in vitro* și citotoxicitatea *in vitro*. Suporturile conținând MNPs încărcate cu DOX, un medicament chimioterapeutic pentru tratamentul metastazelor și a tumorilor osoase, au prezentat o eliberare graduală și lentă a DOX, sugerând că aceste suporturi pot fi luate în considerare pentru studii viitoare în terapia combinată a tumorilor osoase maligne.

## Concluzii generale

✓ Osul este un țesut care are capacitatea de regenerare și reparare proprie în cazul unor afecțiuni minore, fiind supus de-a lungul vieții la procese biologice complexe de creștere, modelare și remodelare.

✓ Obiectivul central al lucrării de față a fost obținerea și caracterizarea de suporturi compozite printr-un procedeu biomimetic de co-precipitare a precursorilor de fosfați de calciu pe un amestec de biopolimeri și nanoparticule magnetice, pentru a fi testate în regenerarea osoasă. Biopolimeri utilizați au fost: colagen, chitosan, acid hialuronic, albumină serică bovină și gelatină, iar fosfații de calciu au fost obținuți din precursori, pornindu-se de la un raport teoretic Ca/P comparabil cu cel identificat în osul uman. Nanoparticulele magnetice au fost incluse pentru studii ce au vizat încorporarea și eliberarea controlată de principii biologice.

✓ Pentru stabilirea compoziției optime s-au realizat în paralel suporturi pe bază de biopolimer/ amestecuri diferite de biopolimeri (chitosan, chitosan – acid hialuronic, chitosan – albumină serică bovină și chitosan – gelatină) și fosfați de calciu obținuți din precursori, raportul teoretic Ca/P fiind de 1.65. Trei concentrații diferite de nanoparticule (1 %, 3 %, 5 %) au fost încorporate pe rând în sinteza celor patru tipuri de suporturi. S-a calculat magnetizarea suporturilor, concentrația de 5% fiind cea mai apropiată de datele regăsite în alte studii având aceleași obiective. Studiile privind interacțiunea suporturilor cu fluide de interes biologic, soluții enzimatice și celule au indicat o corelație între porozitatea materialelor și proprietațile de interacțiune cu fluide și medii biologice.

✓ Având în vederea datele obținute anterior obiectivul următor a fost optimizarea compoziției, motiv pentru care s-au obținut și caracterizat suporturi pe bază de colagen – chitosan – acid hialuronic, nanoparticule magentice și fosfați de calciu. S-a selectat concentrația de 5 % MNPs pentru a fi inclusă în etapă de sinteză, particulele fiind introduse în formă uscată. S-a utilizat un program experimental cu două variabile, acest lot fiind notat cu *lot numărul 1*. O parte din proprietățile suporturilor au fost studiate în paralel cu cele ale suporturilor expuse la radiații UV timp de 4 ore, în vederea identificării eventuale modificări survenite după această procedură de iradiere, folosită în practica clinică/preclinică pentru sterilizare. Caracterul netoxic al suporturilor a fost evidențiat și *in vivo*, după ce fragmente de suporturi au fost implantate subcutanat la șoareci. După 21 zile aceștia au fost sacrificați, iar fragmentele de țesut cu implant au fost analizate macroscopic și microscopic, confirmând proprietăți adecvate de interacțiune cu țesuturile biologice.  $\checkmark$  Respectând compoziția de biopolimeri și fosfați de calciu precum și concentrația de MNPs un lot nou a fost realizat, diferența față de cel descris anterior fiind dată de metoda de includere a MNPs și anume au fost introduse sub formă de suspensie coloidală în apă, urmărindu-se obținerea unei distribuții mai uniforme a acestora în structura suporturilor, reprezentând *lot numărul 2*. S-au utilizat aceleași tehnici de caracterizare ca cele descrise la punctul anterior. În plus, un studiu mai detaliat al morfologiei a fost realizat cu ajutorul analizei microCT.

 $\checkmark$  Proprietățile mecanice ale suporturilor sunt comparabile cu cele ale țesutului osos spongios, iar din punct de vedere al proprietăților magnetice, suporturile sunt superparamagnetice. Interacțiunea *in vitro* a suporturilor cu celule a fost testată pe: fibroblaste, osteoblaste și celule STEM. Citotoxicitatea *in vivo* a suporturilor a fost studiată pe șoareci femele din linia CD1. Experimentul s-a desfășurat pe o perioadă de 64 zile de la implantarea subcutanată a fragmentelor sterilizate de suporturi, iar în final s-a ajuns la concluzia că suporturile nu au efect toxic *in vivo*.

✓ Pentru evaluarea reproductibilității metodei de obținere, șapte suporturi având compoziția teoretică a compozitului S9 din lot 2, au fost preparate și caracterizate din punct de vedere al structurii chimice și a compoziției, din punct de vedere al morfologiei, s-a urmărit comportamentul suporturilor în fluide de interes biologic, degradarea acestora și s-au analizat proprietățile mecanice. Citotoxicitatea suporturilor a fost analizată printr-un test MTT și printr-un test de viabilitate celulară cu Calceină-AM. Toate analizele menționate au demonstrat faptul că metode de preparare propusă este reproductibilă.

✓ Potențiala aplicație a suporturilor în radio-chimioterapia tumorilor osoase maligne a fost studiată îmtr-o ultimă etapă. Inițial, s-a demonstrat că o doză de radiații X, similară cu cea utilizată în cazul iradierii metastazelor osoase, nu a influențat caracteristicile suporturilor cum ar fi structura, morfologia, proprietățile de degradare *in vitro* și citotoxicitatea *in vitro*. Suporturile conținând MNPs încărcate cu DOX, un medicament chimioterapeutic pentru tratamentul metastazelor osoase și a tumorilor osoase, au prezentat o eliberare graduală și lentă a DOX, sugerând că aceste suporturi pot fi luate în considerare pentru studii viitoare în terapia combinată a tumorilor osoase maligne.

## Diseminarea rezultatelor Publicații și activitate științifică din perioada studiilor de doctorat

## Articole în extenso

## Lucrări publicate în reviste cotate ISI (cu factor de impact)

1. F.D. Cojocaru, V. Balan, M.I. Popa, A. Lobiuc, A. Antoniac, I.V. Antoniac, L. Verestiuc, *Biopolymers – Calcium phosphates composites with inclusions of magnetic nanoparticles for bone tissue engineering*, International Journal of Biological Macromolecules, 125, 2019, 612-620. <u>https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.12.083</u>. IF: 3.9.

2. F.D. Cojocaru, V. Balan, I.M. Popa, A. Munteanu, A. Anghelache, L. Verestiuc, *Magnetic Composite Scaffolds for Potential Applications in Radiochemotherapy of Malignant Bone Tumors*, Medicina 2019, 55, 153. <u>https://doi.org/10.3390/medicina55050153</u>. IF: 1.429.

#### Lucrări publicate în baze de date internaționale (indexate ISI/ ISI proceedings)

3. F.D. Ivan, V. Balan, M. Butnaru, I.M. Popa, L. Verestiuc, *Magnetic Nanoparticles Inclusion into Scaffolds Based on Calcium Phosphates and Biopolymers for Bone Regeneration*, Key Engineering Materials, 745, 2017, 16-25. <u>https://doi.org/10.4028/</u>www.scientific.net/KEM.745.16

4. F.D. Ivan, I.G. Avîrvarei, I.G. Vasilaş, M.A. Varga, V. Bălan, M. Butnaru, I.M. Popa, L. Verestiuc, *Porous magnetic scaffolds for bone tissue engineering and regeneration*, ISI proceedings, E-Health and Bioengineering Conference (EHB), 2017, 713-716. <u>https://doi.org/10.1109/EHB.2017.7995523</u>

5. F.D. Ivan, V. Balan, M. Butnaru, I.M. Popa, L. Verestiuc, *Bio-Inspired Calcium Phosphates-Biopolymer Scaffolds with Inclusions of SPIONs for Bone Tissue Regeneration*, ISI proceedings, E-Health and Bioengineering Conference (EHB), 2015, 1-4. <u>https://doi.org/10.1109/EHB.2015.7391526</u>

#### Lucrări publicate în reviste cotate ISI cu subiecte conexe tezei de doctorat

6. A.G. Rusu, A. P. Chiriac, L.E. Nita, M. Bercea, N. Tudorachi, A. Ghilan, D. Pamfil, D. Rusu, F.D. Cojocaru, Interpenetrated polymer network with modified chitosan in composition and self-healing properties, International Journal of Biological Macromolecules, 132, 2019, 374-384. doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.136. IF: 3.9.

7. A. Munteanu, F.D. Ivan, A. Patrascu, V. Balan, C. Ursache, L. Verestiuc, *Treatment Planning Optimization in Radiotherapy Using the Bolus*, Materiale Plastice 54 (4), 731-734, 2017.<u>http://www.revmaterialeplastice.ro/pdf/26%20MUNTEANU%20ANCA%204%2017.pd</u> <u>f</u>. IF: 1.248.

# Lucrări publicate în baze de date internaționale (indexate ISI/ ISI proceedings) cu subiecte conexe tezei de doctorat

8. I.A. Tanasa, AE Minuti, FD Ivan, S Vasiliu, M Butnaru, L Verestiuc, *Novel natural-synthetic hydrogel scaffolds with applications in skin tissue repair and engineering*, E-Health and Bioengineering Conference (EHB), 2017, 709-712. <u>https://doi.org/10.1109/EHB.2017.7995522</u>

9. F Ivan, A P Chiriac, V Balan, Recent Trends in the Design of Biocompatible Gels for Tissue Engineering and Drug Delivery Applications, Recent Patents on Materials Science 9 (2), 110-115, 2016. <u>https://doi.org/10.2174/1874464810666161215163202</u>

# Participări la conferințe Conferințe naționale:

• 4 postere:

1. *Conferința Națională de Bioinginerie pentru Studenti și Tineri Cercetători*, ediția a XVIIIa, Iași, 14-17 mai 2015.

2. *Conferința Națională de Bioinginerie pentru Studenti și Tineri Cercetători*, ediția a XIX-a, Iași, 12-15 mai 2016.

3. *Conferința Națională de Bioinginerie pentru Studenti și Tineri Cercetători*, ediția a XX-a, Iași, 17-20 mai 2017.

4. *Conferința Națională de Bioinginerie pentru Studenti și Tineri Cercetători*, ediția a XXI-a, Iași, 3-6 mai 2018.

## **Conferințe internaționale:**

• 5 prezentări orale:

1. International Seminar on Biomaterials & Regenerative Medicine, Bioremed 2015, 17-21 septembrie 2015, Oradea, România;

2. *IEEE International Conference on e-Health and Bioengineering*, *EHB 2015*, ediția a 5-a, 19-21 noiembrie 2015, Iași, România;

3. 7<sup>th</sup> International Conference "Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices" BIOMMEDD '2016, 15-17 septembrie 2016, Constanța, România;

4. *IEEE International Conference on e-Health and Bioengineering*, *EHB 2017*, ediția a 6-a, 22-24 iunie 2017, Sinaia, România;

5. International Seminar on Biomaterials and Regenerative Medicine, BioReMed 2017, 5-8 octombrie 2017, Timişoara, România.

• 7 postere:

1. 25<sup>th</sup> Symposium and Annual Meeting of the International Society for Ceramics in Medicine, Bioceramics 25,7-10 noiembrie 2013, București, România;

2. *IEEE International Conference on e-Health and Bioengineering*, *EHB 2013*, ediția a 4-a, 21-23 noiembrie 2013, Iași, România;

3. International Conference "Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices", BIOMMEDD'2014, ediția a 6-a, 17-20 septembrie 2014, Constanța, România;

4. World Biomaterials Congress - WBC 2016, ediția a 10-a, 17-22 mai 2016, Montreal, Canada.

5. BIOMATERIALS FOR HEALTHCARE: Biomaterials for Tissue and Genetic Engineering and the Role of Nanotechnology, BioMaH, prima ediție, 17-20 octombrie 2016, Roma, Italia;

6. 28th Annual Conference of the European Society for Biomaterials (ESB 2017), 4-8 septembrie 2017, Atena, Grecia;

7. 8<sup>th</sup> International Conference "Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices" BIOMMEDD'2016, 27-29 septembrie 2018, Cluj-Napoca, România.

#### Stagii de pregătire:

1. Curs postuniversitar: "Evaluări *in vitro* și *in vivo* pentru medicină regenerativă" Universitatea de Medicină și Farmacie ,Grigore T. Popa" Iași, 24.05-10.06.2017.

#### Contracte de cercetare

1. PN-II-PT-PCCA-2013-4-2287 - "Suporturi magnetice biomimetice ca strategie alternativă pentru ingineria și repararea țesutului osos", contract de finanțare nr. 132/201; Director de proiect: Prof. dr. ing. Liliana Vereștiuc, Universitatea de Medicină și Farmacie "Grigore T. Popa" Iași.

2. PN-II-RU-TE-2014-4-0294, "Sinteza de noi hidrogeluri cu caracteristici de biodegradabilitatea și funcționalitate 3D bine definite pentru bioaplicații", contract de finanțare, nr. 254/1.10.2015; Director de proiect: Dr. Bioing. Loredana Elena Niță, Institutul de Chimie Macromoleculară "Petru Poni" Iași

## **Bibliografie selectivă**

[90] N. Bock, A. Riminucci, C. Dionigi, A. Russo, A. Tampieri, E. Landi, V.A. Goranov, M. Marcacci, V. Dediu, "A novel route in bone tissue engineering: Magnetic biomimetic scaffolds", *Acta Biomaterialia*, vol. 6, 3, pp. 786–796, **2010**.

[91] A. Tampieri, M. Iafisco, M. Sandri, S. Panseri, C. Cunha, S. Sprio, E. Savini, M. Uhlarz, T. Herrmannsdörfer, "Magnetic Bioinspired Hybrid Nanostructured Collagen–Hydroxyapatite Scaffolds Supporting Cell Proliferation and Tuning Regenerative Process", *ACS applied materials & interfaces*, vol. 6, 18, pp. 15697–15707, **2014**.

[92] S. Panseri, A. Russo, M. Sartori, G. Giavaresi, M. Sandri, Fini M, M.C. Maltarell, T. Shelyakova, A. Ortolani, A. Visani, V. Dediu, A. Tampieri, M. Marcacci, "Modifying bone scaffold architecture in vivo with permanent magnets to facilitate fixation of magnetic scaffolds", *Bone*, vol. 56, 2, pp. 432–439, **2013.** 

[99] F. Heidari, M.E. Bahrololoom, D. Vashaee, L. Tayebi, "In situ preparation of iron oxide nanoparticles in natural hydroxyapatite/chitosan matrix for bone tissue engineering application", *Ceramics International*, vol. 41, 2, pp. 3094–3100, **2015**.

[116] V. Balan, V. Redinciuc, N. Tudorachi, L. Verestiuc, "Biotinylated N-palmitoyl chitosan for design of drug loaded self-assembled nanocarriers", *European Polymer Journal*, vol. 81, pp. 284–294, **2016**.

[120] T. Edgard, D. Himmelblau, "Optimization of Chemical Process", McGraw-Hill Higher Education, vol. Second Edition, **1988.** 

[123] M. Taha, M. Hassan, S. Essa, Y. Tartor, "Use of Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) spectroscopy for rapid and accurate identification of Yeasts isolated from human and animals", *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, vol. 1, 1, pp. 15–20, **2013.** 

[136] J. Shi, M.M.Q. Xing, W. Zhong, "Development of Hydrogels and Biomimetic Regulators as Tissue Engineering Scaffolds", *Membranes*, vol. 2, 1, pp. 70–90, **2012.** 

[142] K. Tanaka, T. Goto, T. Miyazaki, Y. Morita, S. Kobayashi, T. Takahashi, "Apatite-coated Hyaluronan for Bone Regeneration", *J Dent Res*, vol. 90, 7, pp. 906–911, **2011.** 

[143] S. Ghanaati, M. Barbeck, U. Hilbig, C. Hoffmann, R.E. Unger, R.A. Sader, F. Peters, C.J. Kirkpatrick, "An injectable bone substitute composed of beta-tricalcium phosphate granules, methylcellulose and hyaluronic acid inhibits connective tissue influx into its implantation bed *in vivo*", *Acta Biomaterialia*, vol. 7, 11, pp. 4018–4028, **2011.** 

[144] F.D. Cojocaru, V. Balan, M.I. Popa, A. Lobiuc, A. Antoniac, I.V. Antoniac, L. Verestiuc, "Biopolymers – Calcium phosphates composites with inclusions of magnetic nanoparticles for bone tissue engineering", *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 125, pp. 612-620, **2019**. [159] C.E. Tanase, M.I. Popa, L. Verestiuc, "Biomimetic chitosan-calcium phosphate composites with potential applications as bone substitutes: Preparation and characterization", *Journal of biomedical materials research*, vol. 100 B, 3, pp. 700–708, **2012**.

[160] V. Balan, I.A. Petrache, M.I. Popa, M. Butnaru, E. Barbu, J. Tsibouklis, L. VerestiuC, "Biotinylated chitosan-based SPIONs with potential in blood-contacting applications", *Journal of Nanoparticle Research*, vol. 14, 2, p. 730, **2012.** 

[161] P. Huang, Z. Li, H. Hu, D. Cui, "Synthesis and Characterization of Bovine Serum Albumin-Conjugated Copper Sulfide Nanocomposites", *Journal of Nanomaterials*, vol. 2010, pp. 1–6, **2010**.

[168] M.A. Velasco, C.A. Narváez-Tovar, D. A. Garzón-Alvarado, "Design, Materials, and Mechanobiology of Biodegradable Scaffolds for Bone Tissue Engineering", *BioMed Research International*, vol. 2015, pp. 1–21, **2015**.

[170] T. Freier, H. S. Koh, K. Kazazian, M. S. Shoichet, "Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation", *Biomaterials*, vol. 26, 29, pp. 5872–5878, **2005.** 

[172] F.D. Ivan, V. Balan, M. Butnaru, I.M. Popa, L. Verestiuc, "Magnetic Nanoparticles Inclusion into Scaffolds Based on Calcium Phosphates and Biopolymers for Bone Regeneration", *Key Engineering Materials*, vol. 745, pp. 16-25, **2017**.

[175] F.D. Ivan, V. Balan, M. Butnaru, I.M. Popa, L. Verestiuc, "Bio-Inspired Calcium Phosphates-Biopolymer Scaffolds with Inclusions of SPIONs for Bone Tissue Regeneration", *ISI proceedings, E-Health and Bioengineering Conference (EHB)*, pp. 1-4, **2015**.

[176] F.D. Ivan, I.G. Avîrvarei, I.G. Vasilaş, M.A. Varga, V. Bălan, M. Butnaru, I.M. Popa, L. Verestiuc, "Porous magnetic scaffolds for bone tissue engineering and regeneration", *ISI proceedings, E-Health and Bioengineering Conference (EHB)*, pp. 713-716, **2017.** 

[182] B. Kaczmarek, A. Sionkowska, A.M. Osyczka, "Physicochemical properties of scaffolds based on mixtures of chitosan, collagen and glycosaminoglycans with nano-hydroxyapatite addition", *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 118, pp. 1880–1883, **2018**.

[183] A.R. Costa-Pinto, A.M. Martins, M.J. Castelhano-Carlos, V.M. Correlo, P.C. Sol, A. Longatto-Filho, M. Battacharya, R.L. Reis, N.M. Neves, "In vitro degradation and in vivo biocompatibility of chitosan–poly(butylene succinate) fiber mesh scaffolds", *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, vol. 29, 2, pp. 137–151, **2014**.

[185] L. Hench, S.M. Best, "Ceramics and glasses", în Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine, 2nd edition., Academic Press, **2004.** 

[201] J. Shi, M.Q. Xing, W. Zhong, "Development of Hydrogels and Biomimetic Regulators as Tissue Engineering Scaffolds", *Membranes*, vol. 2, pp. 70-90, **2010**.

[204] J.S. Wu, M.G. Hochman, "Bone tumors- A Practical Guide to Imaging", Springer-Verlag New York, pp 1-9, **2012.** 

[206] R. Rajani, C.P. Gibbs, "Treatment of Bone Tumors", *Surgical pathology clinics*, vol. 5, pp. 301–318, **2015**.

[207] E. Andronescu, M. Ficai, G. Voicu, D. Ficai, M. Maganu, A. Ficai, "Synthesis and characterization of collagen/hydroxyapatite: magnetite composite material for bone cancer treatment", *Journal of materials science. Materials in medicine*. vol. 21, pp. 2237-2242, **2010**.

[208] K.H. Groenen, M.H. Pouw, G. Hannink, A.J. Hosman, Y.M. van der Linden, N. Verdonschot, E. Tanck, "The effect of radiotherapy, and radiotherapy combined with bisphosphonates or RANK ligand inhibitors on bone quality in bone metastases. A systematic review", *Radiotherapy and Oncology*, vol. 119, pp. 194-201, **2016**.

[213] F.D. Cojocaru, V. Balan, I.M. Popa, A. Munteanu, A. Anghelache, L. Verestiuc, "Magnetic Composite Scaffolds for Potential Applications in Radiochemotherapy of Malignant Bone Tumors", *Medicina*, 55, pp. 153, **2019**.

[214] E. Chow, L. Zeng, N. Salvo et al. "Update on the systematic review of palliative radiotherapy trials for bone metastases", *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, vol. 24, pp. 112-124, **2012.** 

[215] S. Lutz, T. Balboni, J. Jones, S. Lo, J. Petit, S.E. Rich, E. Wong, C. Hahn, "Palliative radiation therapy for bone metastases: Update of an ASTRO Evidence-Based Guideline", *Practical Radiation Oncology*, vol. 7, pp. 4-12, **2017.** 

[216] A. Munteanu, F.D. Ivan, A. Patrascu, V. Balan, C. Ursache, L. Verestiuc, "Treatment Planning Optimization in Radiotherapy Using the Bolus", *Materiale Plastice*, vol. 54, pp. 731-734, **2017.** 

[219] Q.L. Loh, C. Choong, "Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size", *Tissue engineering. Part B, Reviews*, vol. 19, pp. 485-502, **2013**.

[221] J. Brouwer, T. van Leeuwen-Herberts, M. Otting-van de Ruit, "Determination of lysozyme in serum, urine, cerebrospinal fluid and feces by enzyme immunoassay", *Clinica chimica acta*, vol. 142, pp. 21–30, **1984**.

[222] M.P. Daniel, V. Gaikwad, M. Verghese, R. Abraham, R. Kapoor, "Serum Lysozyme (Muramidase) Levels in Intra-Abdominal Abscesses: An Experimental Study", *Indian Journal of Surgery*, vol. 77, pp. 117–119, **2017**.

[224] N.C. Partridge, H.W. Walling, S.R. Bloch, T.H. Omura, P.T. Chan, A.T. Pearman, W.Y. Chou, "The regulation and regulatory role of collagenase in bone", *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, vol. 6, pp. 15-27, **2006**.

[226] S. Kozlu, A. Sahin, G. de Ultav, F. Yerlikaya, S. Calis, Y. Capan, "Development and in vitro evaluation of doxorubicin and celecoxib co-loaded bone targeted nanoparticles", *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 45, pp. 213-219, **2018**.

[227] S. Ghosh, R.S.K. Raju, N. Ghosh, K. Chaudhury, S. Ghosh, I. Banerjee, N. Pramanik, "Development and physicochemical characterization of doxorubicin-encapsulated hydroxyapatite–polyvinyl alcohol nanocomposite for repair of osteosarcoma-affected bone tissues", *Comptes Rendus Chimie*, vol. 22, pp. 46-57, **2019**.

[228] M. Iafisco, C. Drouet, A. Adamiano, P. Pascaud, M. Montesi, S. Panseri, S. Sardab, A. Tampieri, "Superparamagnetic iron-doped nanocrystalline apatite as a delivery system for doxorubicin", *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 4, pp. 57-70, **2016**.

[232] F. Yang, J. Lu, Q. Ke, X. Peng, Y. Guo, X. Xie, "Magnetic Mesoporous Calcium Sillicate/Chitosan Porous Scaffolds for Enhanced Bone Regeneration and Photothermal-Chemotherapy of Osteosarcoma", *Nature, Scientific Reports*, vol. 8, 7345, **2018**.