

Raport științific privind implementarea proiectului
Suporturi magnetice inteligente 3D avansate pentru ingineria și regenerarea tisulară a osului (3D SMARTMAGTISS)

Contract nr.562/2020, Cod proiect: **PN-III-P2-2.1-PED-2019-4524**

Perioada: ianuarie – decembrie 2021

Scopul etapei II a proiectului l-a constituit caracterizarea și optimizarea compozitelor 3D pentru integrarea osoasă prin combinarea de biopolimeri, SPIONs și compuși bioactivi și corelarea cerințelor tehnologice, funcționale și biologice pentru suporturile magnetice cu stabilitatea compușilor bioactivi.

Etapa II. Optimizarea suporturilor magnetice bioactive 3D în corelație cu aplicarea ca implanturi osteointegrabile și structură sensibilă la stimuli externi

Activități

- *Caracterizarea compozitelor 3D pe bază de biopolimeri, fosfați de calciu și SPIONs prin metode biomimetice și includerea de molecule biologice; Stabilirea parametrilor de preparare a compozitelor 3D în corelație cu proprietățile substanțelor bioactive*
- *Influența sterilizării asupra proprietăților suporturilor și moleculelor bioactive*
- *Analiza biomecanică la interfața os – suport 3D*
- *Teste privind eliberarea controlată de medicamente din suporturile 3D în condiții biologice simulate*
- *Evaluarea in vitro în culturi de celule a compozitelor*
- *Designul testelor in vivo (criteriile de includere, procedura de implantare, proiectarea geometriei implantului și a dimensiunilor)*
- *Analiza critică a rezultatelor. Corelații structură – proprietăți-condiții de implantare*
Corelații structură – proprietăți –implantare Prepararea de suporturi 3D, sterilizate, cu geometrie impusă, pentru testele in vivo.
- *Management proiect. Diseminarea rezultatelor*

Evaluarea morfologiei prin microscopie electronică de baleiaj

Microscopia electronică de baleiaj s-a utilizat pentru a studia morfologia și structura compozitelor, în acest scop utilizându-se un microscop Tescan-Vega. Dimensiunea porilor este cuprinsă între 50 μm și 200 μm (Fig.1), domeniu de dimensiuni favorabil atașării și proliferării celulare. De asemenea, se poate observa o uniformitate a distribuției particulelor magnetice și a particulelor de calciu de fosfați de calciu în și pe matricea polimerică.

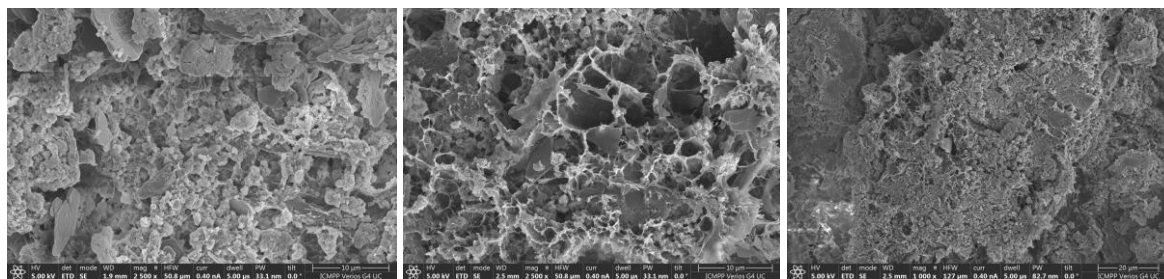


Figura 1. Imagini de microscopie electronică pentru compozitele 3D liofilizate: stânga-7L, central-8L, dreapta – 9L

Degradarea enzimatică a compozitelor 3D

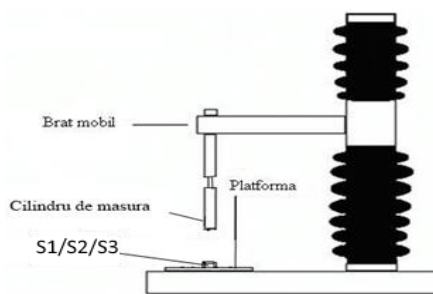
Pentru degradarea enzimatică *in vitro* s-a utilizat un complex alcătuit din două enzime – lizozim și colagenază, evaluându-se cantitatea de polimeri degradați în timp. Pentru evaluare concentrației de colagen degradat s-a utilizat metoda cu ninhidrină (curba de calibrare pentru

determinarea concentrației de grupări NH₂ terminale din collagen s-a realizat utilizând glicină; spectrofotometric, 570 nm), iar pentru determinarea concentrației de chitosan degradat s-a utilizat metoda cu K₃Fe(CN)₆ (curbă de calibrare cu N-acetil-D-grucozamină; spectrofotometric, 420 nm). Analizând degradarea collagenului și chitosanului (Figura 5) s-a observat că raportul Ca/P influențează procesul degradativ al celor 2 biopolimeri.

Colagenaza este o enzimă specifică pentru degradarea *in vivo* a collagenului, care hidrolizează preferențial legăturile X-Gly în următoarele grupe de aminoacizi: glicină-leucină (Gly-Leu), glicină-izoleucină (Gly-Ile), alanin-prolină-glicină (Ala-Pro-Gly). Prezența fosfaților de calciu, care acoperă în mare parte matricea polimerică, îngreunează pătrunderea enzimelor în suportul compozit. Degradarea maximă se constată la un raport Ca/P=1,65, iar compozitele liofilizate sunt mai susceptibile la degradare.

Evaluarea proprietăților magnetice. Metoda folosită pentru măsurarea susceptibilității magnetice se bazează pe principiul probei staționare și a magnetului în mișcare. Balanța de susceptibilitate magnetică (MBS) Johnson Matthey măsoară forța pe care proba o exercită asupra unui magnet permanent suspendat, spre deosebire de balanța Gouy care măsoară forța egală și opusă pe care un magnet o exercită asupra materialului. Sa-u obținut valori pentru Pentru procesul de sterilizare s-a optat pentru sterilizarea cu radiații UV, datorită accesibilității și versatilității procesului. Compozitele 3D au fost introduse în plăci petri pentru culturi celulare (φ=45mm), transparente, după care sistemul s-a introdus in cabina dispozitivului de sterilizare. Timp de sterilizare: 2 ore.

Analiza biomecanică la interfața os – suport 3D. Într-o primă etapă s-au realizat teste pentru evaluarea moduluului de elasticitate a materialului. Comportarea materialelor la compresiune s-a evaluat cu ajutorul aparatului Texture Analyzer AT.XP Plus, cu o forță maximă de aplicare de 2kg. S-au determinat dimensiunile materialelor, după care au fost supuse testului de compresiune folosind parametrii: viteza de pre-test de 1 mm/sec, viteza de testare de 2 mm/sec și distanța de întoarcere de 5 mm. Pentru fiecare tip de material s-a determinat aria, forța, și modulul de elasticitate – cunoscut în literatură sub denumirea de modulul lui Young (Legea lui Hooke).



Schema dispozitivului Texture Analyser

Modul de distribuție al fosfaților de calciu, raportul fază organică/fază anorganică determină valorile moduluului de elasticitate. Astfel se explica valorile mai mari ale moduluului de elasticitate (55 MPa) obținute în cazul materialului 7U. Analiza 3D cu element finit la interfața os-substituent osos sintetizat s-a realizat pentru o poziționare la nivelul femurului. Parametrii mecanici utilizați au fost: Substituent osos: Modul de elasticitate, E=55.02MPa; Coeficientul lui Poisson : $\nu = 0.4$. Prin utilizarea analizei 3D in element finit la interfața os-substituent osos sintetizat s-a evidențiat existența unei tensiuni mai ridicate in os fata de valorile obtinute pentru substituentul osos. In concordanta cu principiul mecano-transductiei, cu parametrii mecanici obtinuti pentru compozitele collagen-HA, osul ar avea o capacitate de regenerare crescuta.

S-au calculat:

Aria: $\frac{\pi d^2}{4}$ (mm²), unde d este diametrul probei

Tensiunea de compresiune: $\sigma = \frac{F}{A} \left(\frac{N}{m^2} \right)$

Forța : $F = \frac{F_{max}}{0.0098} \times 10^3$ (N)

Modulul de elasticitate: $E = \frac{\sigma}{\varepsilon} \left(\frac{N}{m^2} \right)$
 ε – deformația inițială

Încărcarea medicamentelor în suporturi. Dată fiind aplicația vizată a suporturilor – tratamentul tumorilor osoase, aceste compozite 3D au fost încărcate cu două medicamente utilizate în practica clinică în tratamente oncologice: Docetaxel – DOC (0,5 mg/mL alcool etilic absolut) și Doxorubicină – DOX (0,5 mg/mL alcool etilic absolut). Deoarece în unele scheme de tratament, se folosesc două medicamente chimioterapeutice diferite, suporturile au fost încărcate cu medicamente, după cum urmează: a. lot DOX: suporturi încărcate cu DOX; b. lot DOC: suporturi încărcate cu DOC; c. lot DOC + DOX; d. lot DOX + DOC.

Din curbele cinetice de eliberare a medicamentelor din suporturile încărcate cu un compus biologic activ se constată următoarele:

-materialele liofilizate eliberează cantități mai mari de doxorubicină, efect ce este pus pe seama atât a porozității compozitului dar și pe solubilitatea medicamentului în mediul de testare;

-în cazul Docetaxel se constată o eliberare lentă a medicamentului, indiferent de structura și morfologia compozitului. Se consideră că hidrofobicitatea compusului bioactiv joacă un rol primordial în asigurarea profilului de difuzie din matricea compozită.

-Docetaxelul se eliberează în mediul de testare mai repede și la concentrații mai mari, indiferent de ordinea de încărcare cu medicament;

-în general, maximul de medicament eliberat, după 7 zile de testare se atinge pentru compozitele 3D condiționate prin liofilizare;

Evaluarea in vitro in culturi de celule a compozitelor. Pentru testele de citotoxicitate s-a utilizat metoda contactului direct.

Osteosarcoame umane (linia celulară MG-63) au fost incubate pentru 24 ore (5% CO₂, 37°C, 95% umiditate relativă) în mediu de cultură DMEM îmbogățit cu 10% BFS și 1% P/S/N, în plăci de 48 godeuri (12000 celule/godeu). În cadrul acestei etape s-au testat suporturile normale și suporturile încărcate separat cu medicamente antitumorale: docetaxel (0,5 mg/mL alcool etilic absolut) și doxorubicină (0,5 mg/mL alcool etilic absolut).

În cazul suporturilor fără medicament, valorile viabilității celulare după 24, 48 și 72 ore de contact au fost cuprinse între 88,9% și 99,42%, ceea ce indică un caracter non-citotoxic al suporturilor. În ceea ce privește suporturile încărcate cu medicament, pentru DOC valorile au fost cuprinse între 20,69% și 37,5%, iar pentru DOX, între 21,03% și 46,89%. Rezultatele sunt promițătoare pentru aplicația vizată, și anume tratamentul tumorilor osoase, deoarece la 24 ore de contact, se observă o eliberare adecvată a medicamentelor, ceea ce a condus la moartea celulelor tumorale. În cazul DOX are loc o eliberare mai lentă, date ce pot fi corelate cu eliberare de medicamente descrisă la punctul anterior și cu alte studii din literatură care au dovedit această proprietate a DOX. Pentru medicamente s-a determinat și IC₅₀. IC₅₀ pentru IC₅₀ la DOX se situează la concentrații de aprox. 0.499 uM. Pentru Docetaxel s-a constatat o instabilitate a medicamentului.

Testul de viabilitate celulară cu Calceină-AM. Testul cu Calceină a fost realizat și la 72 ore de contact pentru suporturile care nu au fost încărcate cu medicamente. Rezultatele confirmă încă o dată rezultatele testului MTT, lipsa de citotoxicitate a suporturilor obținute. Dacă în proba control se observă o distribuție uniformă a stratului de celule, în cazul includerii medicamentelor se observă doar celule izolate, care își pierd forma, efectul apărând mai pregnant în cazul materialele în care a fost încărcat Docetaxel. Efectul se consideră a fi determinat de efectul toxic mai puternic al acestui medicament și capacității lui de integrare mai rapidă în celula tumorală.

Designul testelor in vivo (criteriile de includere, procedura de implantare, proiectarea geometriei implantului și a dimensiunilor). Pentru stabilirea procedurii de derulare a

testelor *in vivo* este necesar a se considera evaluarea efectului dispozitivului medical asupra țesutului înconjurător (efecte locale), geometrie, sterilizare și implantare aseptică. Având în vedere obiectivul general al proiectului și stabilirea nivelului de maturitate necesar a se atinge la finalul proiectului s-a propus ca model animal de testare animal de talie mare: oaie adultă. S-au stabilit caracteristicile necesare pentru compozitele de testare: formă și dimensiuni, modulul lui Young, grad de umflare în PBS, susceptibilitate magnetică, condiții de sterilizare, condiții de urmărire a experimentului și evaluare finală.

Management proiect. Diseminare rezultate.

Rezultatele experimentale din cadrul proiectului au fost diseminate astfel:

Lucrari publicate în reviste cotate ISI

1. Aurica P. Chiriac, Alina Gabriela Rusu, Loredana Elena Nita, Ana-Maria Macsim, Nita Tudorachi, Irina Rosca, Iuliana Stoica, Daniel Timpu, Magdalena Aflori, Florica Doroftei; Synthesis of Poly(Ethylene brassylate-co-squaric acid) as Potential Essential Oil Carrier; *Pharmaceutics* 2021, 13, 477. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13040477>; Aurica P. Chiriac, Alina G. Rusu, Loredana E. Nita, Vlad M. Chiriac, Iordana Neamtu, Alina Sandu; Polymeric Carriers Designed for Encapsulation of Essential Oils with Biological Activity; *Pharmaceutics* 2021, 13, 631. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13050631>; Funding: This review was funded by the Romanian Ministry of Education and Research, CNCSUEFISCDI, grant number:-562 PED / 2020, PN-III-P2-2.1-PED-2019-2743 “Advanced 3D intelligent magnetic supports for bone tissue engineering and regeneration”, within PNCDI III.

Lucrari publicate la conferințe indexate ISI

1. F.D. Cojocaru, A.S. Mihai, V. Balan, C.A. Peptu, M. Butnaru, L. Verestiuc, Composite scaffolds with inclusion of magnetite nanoparticles for bone tissue engineering, 5th INTERNATIONAL CONFERENCE on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, November 3-5, 2021, Chisinau, Republic of Moldova
2. Alina E. Sandu, Aurica P. Chiriac, Alina G. Rusu, Alexandru M. Serban, Loredana E. Nita, Elvira Gille; New polymeric particles loaded with sea buckthorn essential oil; prezentata oral si publicata in volumul EHB indexat; The 9th IEEE International Conference on E-Health and Bioengineering - EHB 2021; Grigore T. Popa University of Medicine and Pharmacy, Web Conference, Romania, November 18-19, 2021

Lucrari prezentate la conferințe internaționale

1. F.D. Cojocaru, A.S. Mihai, V. Balan, C.A. Peptu, M. Butnaru, L. Verestiuc, Composite scaffolds with inclusion of magnetite nanoparticles for bone tissue engineering, 5th INTERNATIONAL CONFERENCE on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, November 3-5, 2021, Chisinau, Republic of Moldova
2. Alina E. Sandu, Aurica P. Chiriac, Alina G. Rusu, Alexandru M. Serban, Loredana E. Nita, Elvira Gille; New polymeric particles loaded with sea buckthorn essential oil; prezentata oral si publicata in volumul EHB indexat; The 9th IEEE International Conference on E-Health and Bioengineering - EHB 2021; Grigore T. Popa University of Medicine and Pharmacy, Web Conference, Romania, November 18-19, 2021
3. F.D. Cojocaru, V. Balan, A.S. Mihai, M. Butnaru, A.M. Serban, L. Verestiuc SPIONs - biopolymers - calcium phosphates composites as magnetically stimulated scaffolds for bone tissue regeneration, 18th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN21), 6-9 July 2021, Thessaloniki, Greece

Lucrari prezentate la conferințe naționale

1. L. Verestiuc, Materiale și tehnologii avansate pentru medicina regenerativă, Conferința „Rolul Spitalelor Municipale, Orășenești, Mono-specialitate în îmbunătățirea calității actului medical, prezent și perspective” editia a II-a, 03 - 04 septembrie 2021
2. Alexandra – Ștefania Mihai, Claudia – Valentina Toader, Ciomateriale compozite biodegradabile inovative pentru bioingineria și regenerarea țesutului osos, Conferința Națională de Bioinginerie Pentru Studenți și Tineri Cercetători (BENG Conference), EDIȚIA a XXIII-a, 22-25 APRILIE 2021, Iasi, Romania

Bibliografie: T. Winkler, F.A. Sass, G.N. Duda, K. Schmidt-Bleek, *Bone Joint Res*, 7 (2018) 232-243; R.K.Fuchs, S.J.Warden, C.H.Turner, *Bone Repair Biomaterials, 2 - Bone anatomy, physiology and adaptation to mechanical loading*, pp.25-68, 2009; A. Oryan, *Bone Injury and Fracture Healing Biology*, pp 57, 2015; G. Ren, M. Esposito, Y. Kang, *J Molec Medicine*, 93(11), 1203–1212, 2015; E.C. González Díaz, S. Sinha, R.S. Avedian, F. Yang, *Acta Biomaterialia*, 99:18-32, 2019; F. Jafari, S. Javdansirat, S. Sanaie, A. Naseri, A. Shamekh, D. Rostamzadeh, S. Dolati, S., *Annals of Diagnostic Pathology*; 49: 151654, 2020; E. Nazeri, M. Gouran Savadkoohi, A.K.Majidzadeh, R. Esmaili, *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 131, 102–109, 2019; E. de Alava, E., Ewing, *Surgical Pathology Clinics* 10(3):575-585, 2017; **ISO Standard 10993. Biological Evaluation of Medical Devices - Parts 1 – 20; USP 1031. The Biocompatibility of Materials Used In Drug Containers, Medical Devices, and Implants.**

Prof.dr. Liliana Verestiuc