

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**

Scopul etapei III a proiectului l-a constituit demonstrarea funcționalității materialelor compozite preparate conform protocoalelor stabilite în etapele anterioare. Testarea funcționalității suporturilor 3D magnetice biomimetice s-a realizat *in vivo*, pe animale model.

Activitate III.1. Studii privind posibilitatea de includere de RPP pentru reducerea răspunsului inflamator. Evaluarea funcționalității in vitro - continuare

A. Obținerea suporturilor magnetice bioactive 3D pentru teste pe animale model

În vederea obținerii suporturilor s-a utilizat metoda biomimetică de co-precipitare a fosfaților de calciu din precursorii săi în soluții/suspensii de biopolimeri, studiată în etapa 2021. În compozitele preparate s-a introdus factor de creștere. Factorul de creștere selectat a fost bone morphogenetic protein 2 – BMP-2 (human recombinant protein, animal free, puritate > 98%, GF319, producător: EMD Milipore Corp., USA, affiliated of Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Soluția a fost obținută prin adăugarea a 200 μ L apă ultra pură tip I (dispozitiv Arium® mini Bench Top System US Ultrapure water, Sartorius) în flaconul conținând 10 μ g BMP-2. Din punct de vedere chimic, BMP-2 este o proteină homodimerică legată de disulfură, de 26,0 kDa, formată din două lanțuri identice de 115 aminoacizi. BMP-2 a fost aleasă pentru studiul de față deoarece este o citokină osteoinductivă, capabilă să inducă formarea osului și a cartilajului în asociere cu un material osteoconductiv, cum ar fi colagenul și hidroxiapatita sintetică, componente sintetizate și în cadrul proiectului.

B. Pregătirea suporturilor 3D în corelație cu aplicația (tratamentul tumorilor osoase).

Având în vedere că scopul principal al proiectului este obținerea de suporturi pentru tratamentul defectelor osoase grave, atenția a fost direcționată spre condițiile de utilizare a acestora în schema de tratament a tumorilor osoase. S-a preparat suport de formă cilindrică și a fost iradiat cu aceeași doză de radiații utilizată în timpul unei ședințe de radioterapie utilizând un computer tomograf CT-Sim Siemens Somatom Definition (Siemens, Erlangen, Germany) și codificat cu S9 R.

Etape preliminare iradierii:

1. Proba a fost introdusă într-un cub cu latura de 4cm, obținut din 4 straturi adiacente de 1cm x 4cm x 4cm de material cu densitate similară țesuturilor moi, utilizat în iradierea tumorilor superficiale ca bolus pentru reducerea efectului de build-up și obținerea unei distribuții omogene a dozei de radiații în întregul volum.
2. Pe suprafața volumului de iradiat au fost plasați 3 markeri radioopaci ca repere de origine, anterior pe linia mediană și lateral dreapta, respectiv stânga, la intersecția laserelor de poziționare, la o înălțime față de planul mesei simulatorului de 2,5cm (HT=2,5cm) .
3. S-a efectuat simularea planului de iradiere prin scanarea cu ajutorul unui computer tomograf, 20 slice-uri. Proba a fost conturată pe secțiunile CT realizate.
Iradierea probei s-a efectuat la accelerator liniar de particule, în doză de 8Gy/1 fracție, după realizarea calculului dozimetric, utilizând două fascicule opuse,

izocentrice, (anterior, la 0^0 și posterior, la 180^0), cu fotoni X folosind energie de 6MV.

Doza de 8Gy/1 fracție reprezintă indicație frecventă de iradiere a metastazelor osoase.

Caracterizarea suporturilor magnetice bioactive 3D încărcate cu factori de creștere și iradiate cu raze X. Structura chimică a suporturilor - Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier cu modul de reflexie totală atenuată (ATR-FTIR). Proprietăți mecanice și magnetice

Pentru a analiza structura chimică a suporturilor cu/fără factor de creștere, s-a utilizat tehnica ATR-FTIR (Spectrometru FT-IR Nicolet Summit Pro cu accesoriu Everest ATR, Thermo Scientific™, Germania). Spectrele au înregistrate în domeniul $4000-400\text{ cm}^{-1}$ (16 scanări, rezoluție de 4 cm^{-1}). Se identifică în spectre modificări datorate prezenței factorului de creștere, în special în domeniul $1400\text{ cm}^{-1}-1650\text{ cm}^{-1}$, la picurile grupărilor amidice.

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).

Evaluarea proprietăților magnetice. Pentru analize s-a utilizat balanța de susceptibilitate magnetică Johnson Matthey, care determină proprietățile magnetice la temperatura camerei, ale solidelor și lichidelor paramagnetice sau diamagnetice. 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.

Atât proprietățile mecanice, cât și valorile pentru susceptibilitatea magnetică recomandă suporturile în aplicația vizată.

Testarea *in vitro* a suporturilor obținute, în contact cu linia celulară

Pentru testele de citotoxicitate s-a utilizat **metoda contactului direct**. Osteosarcoame umane (linia celulară MG-63) au fost incubate pentru 24 ore (5% CO_2 , 37°C , 95% umiditate relativă) în mediu de cultură DMEM îmbogățit cu 10% BFS și 1% P/S/N, în plăci de 48 godeuri (10000 celule/godeu pentru testul MTT și testul cu Calceină AM, respectiv 5000 celule/godeu pentru testul cu Alizarin Red). Toate etapele și procedeele au fost realizate în condiții sterile, într-o hotă microbiologică cu flux de aer laminar (clasa II).

Rezultatele au arătat faptul că materialele compozite au un comportament non-citotoxic și eliberează lent factor de creștere, la 72 ore fiind observată o valoare a viabilității celulare de peste 130 %. La 48 și 72 ore, valorile pentru suporturile cu factori de creștere și DOX, au valori mai mari decât cele cu DOX, ceea ce indică capacitatea suporturilor de a încorpora și elibera concomitent, diferite tipuri de molecule bioactive. Datele obținute la testul MTT sunt susținute și de datele testului de viabilitate celulară cu Calceină-AM.

Se constată următoarele:

- prezența factorului de creștere în compozite stimulează procesul de proliferare a celulelor osteoblaste, la 72 ore de la contactul direct cultură celulară-material;

- comparând sistemele care conțin medicamentul Doxorubicină, se observă un proces de reactivare a culturii celulare după exercitarea efectului medicamentului.

Capacitatea suporturilor de a susține mineralizarea. Alizarin Red este un colorant util în evidențierea potențialului de mineralizare a suporturilor pentru ingineria tisulară a osului, acționând prin colorarea în roșu/maro a depozitelor de fosfați de calciu formate în celule.

Colorarea cu Alizarin Red s-a realizat la 15, respectiv 25 zile de la începerea experimentului, ziua 0, fiind considerată ziua în care s-au adăugat fragmentele de material. Etapele testului sunt următoarele:

- a fost aspirat mediul de cultură din fiecare godeu;
- stratul de celule a fost spălat cu HBSS (cu Ca și Mg), de 4 ori, pentru a îndepărta complet mediul de cultură;
- celulele au fost fixate cu paraformaldehidă 10% timp de 30 minute la temperatura camerei;
- celulele au fost spălate cu apă ultra pură sterilă;
- celulele au fost colorate cu soluție apoasă 1% (g/v) sare de sodiu Alizarin Red S (Alfa Aesar) timp de 40 min, la temperatura camerei și la întuneric;
- s-a îndepărtat colorantul, iar stratul de celule s-a spălat de patru ori cu apă ultra pură sterilă;
- Celulele au fost observate la microscop inversat cu contrast de fază (Leica, Germania) și s-au preluat imagini (obiectiv 10X și 20X).

S-a putut observa faptul că prin adaos de cocktail de diferențiere celulele încep să producă fosfați de calciu, în timp ce în controlul negativ celulele se desprind de pe placa de cultură. S-a evidențiat caracterul stimulator al materialelor; s-a putut observa formarea de depozite de fosfați de calciu, ceea ce indică capacitatea suporturilor de a susține procesul de mineralizare osoasă. S-au identificat diferențe între materiale, determinate de compoziția și structura acestora.

Capacitatea suporturilor a îngloba RPP. Pentru a realiza procedurile experimentale, șobolanii au fost anesteziați prin injectare intramusculară de xilazină (6 mg/kg) și ketamina (70 mg/kg). Prin utilizarea unei seringi de unică folosință de 5 ml care conține 0,35 ml de citrat de sodiu 10%, s-au recoltat 3,15 ml din fiecare sânge de animal (vena jugulară). Cantitate de sânge a fost înlocuită prin injectarea de soluții saline sterile. S-a îndepărtat canula plasată în vena jugulară și s-a aplicat local o soluție hemostatică. Țesuturile au fost repositionate și suturate. Sângele colectat a fost mai întâi centrifugat la 160 G, timp de 20 de minute, la temperatura camerei. Se separă două fracții: o fracție inferioară roșie (componenta globulelor roșii) și o fracție tulbure superioară galben-pai (componenta serică). Proba a fost apoi supusă unei noi centrifugări la 400 G, timp de 15 minute, rezultând al treilea strat în partea inferioară (RPP). S-au obținut 0.92ml RPP care s-a diluat până la 2ml cu PBS. Din materialul S9, 3 probe cântărite au fost imersate în 500μl soluție RPP și au fost menținute în contact timp de 24 ore. Final, materialele au fost uscate și cântărite. S-a calculat un procent mediu de 19.3 mg RPP/g material.

Activitate III.2. Teste *in vivo* pe animale model (oi, în prezența și absența de magnet extern). În acest studiu experimental au fost utilizate patru oi adulte, femele, în vârstă de 2 ani și cu o greutate corporală medie de 50 kg. Experimentul a fost realizat cu acordul

Comitetului de Etica Cercetării al Facultății de Medicină Veterinară, Iași-România, în conformitate cu reglementările instituționale, legile naționale și a directivei UE 63/2010.

Design experimental. Înainte de intervenția chirurgicală, animalele au fost examinate clinic, deparazitate și adăpostite într-un spațiu special pregătit, timp de 2 săptămâni. Pe întreaga perioadă a experimentului, oile au avut acces liber la hrană și apă. Cu 24 de ore înainte de intervenția chirurgicală și anestezie, hrana a fost retrasă fiind permis accesul la apă (ad libitum). Protocolul de implantare a folosit un număr limitat de oi, adică două grupuri cu câte două animale în fiecare grup, 4 fiind numărul maxim de locuri de implantare pentru fiecare oaie. Locurile de implantare au fost distribuite astfel încât materialele să nu interacționeze cu alți factori locali.

Protocol chirurgical pre - și postoperator. Pregătirea preoperatorie a regiunilor chirurgicale s-a făcut în mod obișnuit prin tunderea și dezinfecția regiunii toracolombare cu soluții antiseptice alcoolice și iodate. Toate intervențiile chirurgicale au fost efectuate sub anestezie generală în condiții aseptice. Înainte de inducerea anesteziei, oilor li s-au administrat ca premedicație atropină (0,02 mg/kg SC; Atropina 1% Romvac S.A., România). Anestezia a fost indusă și menținută cu xilazină (200 mg/kg IM; Narcoxyl 2%, Bioveta, Intervet). Implantarea materialelor s-a realizat la nivelul vertebrelor lombare. Analgezia peri- și postoperatorie s-a făcut cu Novasul 1500 mg/kg i.m.; (Richter Pharma, Austria), iar antibioterapia cu 7,5 mg/kg amoxicilină; (Amoxicilin, Dopharma, Olanda), fiind administrate profilactic fiecărui animal. După recuperare, oile au fost ținute în boxe mici pentru perioade scurte și verificate zilnic pentru evaluarea clinică. Analgezia și antibioterapia au fost continuate timp de 7 zile după intervenția chirurgicală. După perioade definite (1 lună, 2 luni) din zonă implantată au fost recoltate preparate, imediat după euthanasia animalelor, și pregătite pentru histologie. În urma evaluărilor clinice nu se observă modificări ale țesuturilor adiacente implantului: integritatea țesuturilor nu este modificată. La rândul lor, datele histologice susțin ipoteza biocompatibilității suporturilor magnetice inteligente 3D cu țesuturile vii, dar cu remarcă că în cazul utilizării magnetului osteointegrarea osoasă a fost mai activă, densitatea osului fiind mult mai dură la secționare comparativ cu structurile care nu au beneficiat de prezența magnetului.

Activitate III.4. Analiza critică a rezultatelor. Realizarea documentației pentru demonstrarea stadiului TRL4 al proiectului

1). La începutul proiectului, nivelul TRL corespunde nivelului TRL3 (Testarea ipotezei și demonstrarea inițială a conceptului); suporturi magnetice la scară de laborator (investigații experimentale ale diferitelor compoziții, raporturi de particule magnetice, metode de sterilizare); teste de laborator privind optimizarea compoziției (comparație fizico-chimică a performanțelor suporturilor, umflături, biodegradabilitate în vitro, analize mecanice și magnetice); validarea conceptului și tehnologiei - studii in vitro și in vivo (testele toxicologice inițiale pe animale mici).

2). La sfârșitul proiectului, nivelul TRL al conceptului atinge nivelul TRL4: funcționalitatea compozitelor 3D este demonstrată pe model animal definit, așa cum este definit pentru dispozitivele medicale sau produsele pentru medicina regenerativă. Astfel:

- s-au realizat la nivel de laborator (non-GMP) suporturi magnetice formulate și optimizate (suport magnetic cu factori de creștere/medicament);

- s-a dezvoltat model animal și s-au realizat teste de implantare și demonstrare a funcționalității pe model animal (ovine); s-a demonstrat efectul de stimulare a procesului de regenerare cu ajutorul magneților externi.

Diseminarea rezultatelor

Rezultatele experimentale din cadrul proiectului au fost diseminate astfel:

Lucrări publicate în reviste cotate ISI

1. Chiriac AP, Stoleru E, Rosca I, Serban A, Nita LE, Rusu AG, Ghilan A, Macsim AM, Mititelu-Tartau L, Development of a new polymer network system carrier of essential oils, Biomedicine & Pharmacotherapy, Volume 149, May 2022, 112919 (IF 6.529)
2. Chiriac AP, Asandulesa M, Stoica I, Tudorachi N, Rusu AG, Nita LE, Chiriac VM, Timpu D, Comparative study on the properties of a bio-based copolymacrolactone system, Polymer Testing, Volume 109, May 2022, 107555 (IF 4.931)
3. Cojocaru FD, Balan V, Verestiuc L, 3D Advanced smart magnetic scaffolds for bone tissue engineering and regeneration, trimisă spre publicare – International Journal of Molecular Sciences

Lucrări publicate la conferințe indexate ISI

4. Cojocaru FD, Balan V, Istrate B, Butnaru M, Verestiuc L, A comparative study on the morphology and in vitro behaviour of biopolymers/ceramic-based scaffolds obtained by drying and lyophilization techniques, acceptata în volumul indexat ISI; the 10th IEEE International Conference on E-Health and Bioengineering - EHB 2022; November 17-19, 2022, Romania

Lucrări publicate la conferințe naționale

5. Botezatu I, Cobzariu I, Verestiuc L, Suporturi compozite bioimprimare 3D pentru ingineria tisulară a osului, BENG CONFERENCE, Conferința Națională de Bioinginerie pentru Studenți și Tineri Cercetători, Ediția a XXIV-a, 14-17 Aprilie 2022, Iași, Romania, ISSN 2285-1348, pag 168-174

Lucrări prezentate la conferințe internaționale

1. Verestiuc L, 3D Scaffolded Biomaterials for Regenerative Medicine, 9th International Conference “Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices” BIOMMEDD’2022, Bucharest (Romania), July 20-22th, 2022
2. Cojocaru FD, Balan V, Butnaru M, Mares M, Nastata V, Pasca AS, Verestiuc L, 3D composite scaffolds with potential use for bone tissue engineering, 9th International Conference “Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices” BIOMMEDD’2022, Bucharest (Romania), July 20-22th, 2022
3. Botezatu I, Cobzariu I, Cojocaru FD, Balan V, Nita LE, Verestiuc L, 3D-printable functionalised gelatin/chitosan, hyaluronic acid, hydroxyapatite and magnetic nanoparticle scaffolds for bone regeneration, în cadrul Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS) European Chapter Conference 2022, 28 Iunie – 1 Iulie, la Cracovia, Polonia
4. Cojocaru FD, Balan V, Butnaru M, Mares M, Nastata V, Pasca AS, Verestiuc L, *In vitro* and *in vivo* evaluation of composite scaffolds with magnetic nanoparticles for tissue engineering applications, 19th International Conference on Nanosciences & Nanotechnologies (NN22), 5-8 July 2022, Thessaloniki, Greece

5. Cojocaru FD, Balan V, Istrate B, Butnaru M, Verestiuc L, A comparative study on the morphology and in vitro behaviour of biopolymers/ceramic-based scaffolds obtained by drying and lyophilization techniques, acceptata in volumul indexat ISI; the 10th IEEE International Conference on E-Health and Bioengineering - EHB 2022; November 17-19, 2022, Romania

Lucrari prezentate la conferințe naționale

1. Botezatu I, Cobzariu I, Verestiuc L, Suporturi compozite bioimprimabile 3d pentru ingineria tisulară a osului, BENG CONFERENCE, Conferința Națională de Bioinginerie pentru Studenți și Tineri Cercetători, Ediția a XXIV-a, 14-17 Aprilie 2022, Iași, Romania

Brevet de invenție pe tematica proiectului.

Bibliografie selectivă: 1. Patel DK, Dutta SD, Shin WC, Ganguly K, Lim KT. *Fabrication and characterization of 3D printable nanocellulose-based hydrogels for tissue engineering*. RSC Adv. 2021 Feb 15;11(13):7466-7478; 2. Biswal T. *Biopolymers for tissue engineering applications: A review*. Materials Today: Proceedings 2021; 41:397-402; 3. Flood-Garibay AJ, Mendez-Rojas MA, *Synthesis and characterization of magnetic wrinkled mesoporous silica nanocomposites containing Fe₃O₄ or CoFe₂O₄ nanoparticles for potential biomedical applications*. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 2021; 615; 4. Gilarska A, Lewandowska-Łańcucka J, Horak W, Nowakowska M. *Collagen/chitosan/hyaluronic acid – based injectable hydrogels for tissue engineering applications – design, physicochemical and biological characterization*. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces 2018; 170:152-162; 5. Koons GL, Diba M, Mikos AG. *Materials design for bone-tissue engineering*. Nature Reviews Materials 2020; 5:584-603; 6. Lopes D, Martins-Cruz C, Oliveira BM, Mano FJ. *Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies*. Biomaterials 2018; 185:240-275; 7. Oryan A, Kamali A, Moshiri A, Baharvand H, Daemi H. *Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds*. Int. J. Biol. Macromol. 2018; 107: 678-688; 8. Peng J, Zhao J, Long Y, Xie Y, Nie J, Chen L. *Magnetic Materials in Promoting Bone Regeneration*. Frontiers in Materials 2019; 6; 9. Ramesh S, Harrysson OLA, Rao PK, Tamayol A, Cormier DR, Zhang Y, Rivero IV. *Extrusion bioprinting: Recent progress, challenges, and future opportunities*. Bioprinting 2021; 21; 10. Vieira S, Vial S, Reis RL, Oliveira JM. *Nanoparticles for Bone Tissue Engineering*. Biotechnology Progress 2017; 33(3):590-611; 11. Wang C, Huang W, Zhou Y, He L, He Z, Chen Z, He X, Tian S, Liao J, Lu B, Weid Y, Wang M. *3D printing of bone tissue engineering scaffolds*. Bioactive Materials 2020; 5(1):82-91; 12. Zhu G, Zhang T, Chen M, Yao K, Huang X, Zhang B, Li Y, Wang Y, Liu J, Zhao Z. *Bone physiological microenvironment and healing mechanism: Basis for future bone-tissue engineering scaffolds*. Bioactive Materials 2021; 6(11):4119-4140.