



(12) **CERERE DE BREVET DE INVENȚIE**

(21) Nr. cerere: **a 2017 00699**

(22) Data de depozit: **22/09/2017**

(41) Data publicării cererii:
29/03/2019 BOPI nr. **3/2019**

(71) Solicitant:
• **UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **ZAHARIA CĂTĂLIN, STR. CERNIȘOARA,
NR. 43, BL.012, SC. B, ET.1, AP. 62,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **GĂLĂȚEANU BIANCA, ȘOS. OLTENIȚEI
NR. 48, BL. 7A, SC. 3, ET. 6, AP. 94,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **VASILE EUGENIA,
STR. NADA FLORILOR, NR.2, BL.2, SC.2,
ET.7, AP.74, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B,
RO;**
• **STĂNESCU PAUL OCTAVIAN,
STR.VATRA DORNEI NR.9, BL.E 4, SC.2,
AP.30, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **BIOCOMPOZITE PE BAZĂ DE FIBROINĂ DIN MĂTASE
NATURALĂ ȘI NANOPARTICULE MAGNETICE
CU APLICAȚII ÎN INGINERIA ȚESUTULUI OSOS,
ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un biocompozit polimeric cu aplicații în ingineria țesutului osos, și la un procedeu de obținere a acestuia. Biocompozitul conform invenției este constituit, în procente volumetriche, din 10...30% fibroină din mătase naturală, 90...50% agent de reticulare de tip poli(2-hidroxietil metacrilat) și 1% magnetită. Procedeu conform invenției constă în

dispersarea nanoparticulelor de magnetită în fibroină, prin ultrasonare timp de 1 h, urmată de adăugarea unei soluții de monomer și agent de reticulare, rezultând un amestec care se formează în matrițe la temperatura de 60°C, la presiune atmosferică, timp de 4 zile.

Revendicări: 6



BIOCOMPOZITE PE BAZA DE FIBROINA DIN MATASE NATURALA SI NANOPARTICULE MAGNETICE CU APLICATII IN INGINERIA TESUTULUI OSOS SI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTORA

Inventia se refera la materiale compozite pe baza de fibroina din matase naturala si nanoparticule magnetice si la un procedeu de laborator de obtinere a acestora. Compozitele, conform inventiei sunt constituite din fibroina din matase naturala (SF), poli(2-hidroxietyl metacrilat) (PHEMA) si nanoparticule magnetice de magnetita (MAG). Procedeu conform inventiei consta in dispersarea nanoparticulelor de magnetita in solutie de fibroina prin ultrasonicare timp de o ora, urmata de adaugarea unei solutii de monomer, initiator si agent de reticulare (2-hidroxietyl metacrilat, persulfat de potasiu si etilenglicol dimetacrilat). Aceste amestecuri cu compozitii diferite sunt turnate in matrite de cauciuc (forma patrata) la o temperatura de 60 °C, presiune atmosferica, si mentinute timp de patru zile pentru intarire.

Compozitele polimerice pentru aplicatii in ingineria tesutului osos sunt caracterizate prin aceea **ca sunt constituite** din amestecuri cu compozitii variate (procente volum): raport SF/PHEMA, 10/90, 30/70 si 50/50, concentratia nanoparticulelor magnetice fiind constanta 1% fata de amestecul initial de fibroina si monomer metacrilic (2-hidroxietyl metacrilat).

INTRODUCERE

Se cunosc din literatura de specialitate compozite polimerice pentru aplicatii in ingineria tesutului osos[1-10]. Aceste sisteme combina sisteme polimerice naturale sau sintetice cu materiale de tip hidroxiapatita, particule magnetice, grafene sau nanotuburi de carbon pentru obtinerea unor scaffold-uri cu proprietati similare cu ale osului ce ar putea deveni o alternativa viabila la grefele existente pe piata.

Nevoia de a reconstrui osul chirurgical a crescut in ultimii ani odata cu imbatranirea populatiei dar si cu cresterea accidentelor care duc la traume serioase ale oaselor [11]. Desi modalitatile actuale de tratament pentru defectele osoase includ autogrefe, alogrefe sau os artificial toate acestea ridica probleme legate de siguranta, performanta si disponibilitate. Se pune astfel problema de a dezvolta materiale inovative pentru os cu bune proprietati mecanice, structura si porozitate controlate, biocompatibilitate ridicata, biodegradabilitate si proprietati osteoconductive si osteoinductive [11]. Autogrefele sunt inca vazute ca materiale optime pentru reconstructie in lipsa unor materiale sintetice care sa le depaseasca in performante. Totusi, in ortopedie, cererea de materiale sintetice poate fi completata prin folosirea unor structuri compozite. In acest fel este posibila simularea structurilor organismelor vii cum ar fi osul, cartilajul sau dintii cu ajutorul compozitelor.

Se cunosc din brevetul **US8614189 B2** scaffold-uri compozite pe baza de polimeri biodegradabili (PLGA) de tip microsferă și nanotuburi de carbon cu bună biodegradabilitate și proprietăți mecanice îmbunătățite. Acest brevet descrie metoda de obținere a acestor sisteme compozite, dar și un procedeu de reparare a defectelor osoase cu aceste scaffold-uri. Procedeu constă în umplerea defectului sau a zonei cu defect osos cu un material compozit biocompatibil care să conducă în final la regenerare osoasă în zona afectată.

Într-un alt brevet, **US20110307073 A1** sunt prezentate scaffold-uri bioresorbabile pentru repararea osului și a ingineria oaselor lungi. Scaffold-urile sunt poroase și conțin canale multiple. Acestea sunt realizate din straturi de mese micro-filamentare pe baza de policaprolactonă (PCL) sau un compozit de policaprolactonă. Acest material compozit are un canal central ce poate fi umplut sau încărcat cu agenți bioactivi și posedă proprietăți mecanice adecvate pentru ingineria osului. Viteza mică de degradare a scaffold-ului 3D este suficientă pentru a își menține integritatea structurală și proprietățile mecanice în timpul procesului de remodelare.

Se cunoaște și din brevetul **EP1426066 A4** un produs de tip scaffold pentru ingineria țesutului osos uman. Acesta este constituit din microparticule bioactive care pot duce la regenerarea osoasă dorită. Este propus un compozit pe baza de polimer organic și siliciu, calciu și fosfor (ca substanțe bioactive) cu structură tridimensională ce mimează osul uman. Compozitul poate fi folosit în siguranță și cu costuri reduse pentru repararea defectelor osoase rezultate în urma traumelor sau accidentelor. Brevetul de față descrie și metodele pentru prepararea acestor scaffold-uri.

Un alt brevet, **US6103255 A** propune scaffold-uri polimerice poroase pentru ingineria țesutului. În acest caz se obțin materiale poroase pe baza de polimeri biodegradabili (polihidroxialcanoati, polycaprolactonă, policarbonati etc) ca fază continuă având o distribuție bimodală interconectată a dimensiunii porilor deschisi (50-500 micrometri cei mari și sub 20 micrometri cei mici). Brevetul evidențiază și metodele de obținere a acestor sisteme poroase interconectate.

Brevetul **WO2014152113 A3** se referă la implanturi osoase pe baza de materiale compozite poroase ce conțin sticlă (material ceramic) și polimeri pentru o mai bună manipulare. Astfel de materiale implantabile pot fi folosite cu succes în tratarea defectelor osoase prin stimularea osteoinducției.

Ca o concluzie putem afirma că există brevete de invenție ce propun utilizarea materialelor compozite polimerice pentru managementul țesutului osos, dar se remarcă lipsa informațiilor

brevetate in domeniul compozitelor cu continut de nanaoparticule magnetice in aceasta directie.

Problema tehnica pe care o rezolva inventia consta in obtinerea unei compozite pe baza de fibroina din matase naturala si nanoparticule magnetice de magnetita care prezinta caracteristici fizico-mecanice si biologice adecvate utilizarii in ingineria tisulara osoasa si la un procedeu de obtinere a acestora. Biocompozitele obtinute in cadrul inventiei prezinta proprietati fizico-chimice, mecanice si biologice adecvate, ceea ce le poate recomanda pentru obtinere de scaffold-uri in domeniul tratarii defectelor osoase. Inventia de fata ofera o solutie simpla si economica pentru obtinerea de compozite polimerice cu structura 3D interconectata, cu proprietati fizico-mecanice si biologice imbunatatite si capacitate de a stimula formarea de hidroxiapatita in medii simulate.

Dezvoltarea continua a tehnologiei din ultimii ani a atras dupa sine o schimbare de directie in domeniul cercetarii stiintifice. Daca in urma cu doua decenii activitatea de cercetare avea ca punct de interes materialele sintetice, de origine fosila, in prezent grija pentru mediu si pentru sanatatea umana orienteaza cercetatorii spre materiale naturale, care prezinta o toxicitate scazuta, sau chiar absenta, in functie de domeniul de utilizare. In acelasi timp, nevoia de aplicatii din ce in ce mai numeroase ale materialelor necesita proprietati complexe ale acestora si o performanta ridicata, iar in acest caz s-a demonstrat ca originea acestora are un rol important: materialele de origine naturala poseda proprietati fizice si chimice greu, sau imposibil de reprodus prin sinteza.

Matasea naturala este una dintre cele mai vechi fibre cunoscute, folosite in domenii diferite. Versatilitatea acesteia a transformat-o intr-un candidat excelent in domeniul medical, incepand cu suturile chirurgicale. Fiind compusa din fibroina si sericina, doua proteine cu proprietati pe cat de diferite, pe atat de complementare, matasea prezinta un interes deosebit pentru cercetatori in prezent, intr-o continua ascensiune. Fibroina reprezinta un material ce se preteaza foarte bine domeniului biomedical datorita rezistentei mecanice superioare in stare umeda, bicompatibilitatii acesteia, permeabilitatii pentru oxigen si vaporii de apa, precum si rezistentei ridicate la degradarea enzimatica. Datorita acestor beneficii, aplicatiile in domeniul medical au fost sugerate pentru suturi chirurgicale, cosmetica, imobilizarea enzimelor, acoperirea ranilor, substrat pentru cultura celulara, medicamente cu eliberare controlata si schelet pentru ingineria tesuturilor [12-14].

Fibroina poate fi utilizata la realizarea diferitelor tipuri de pansamente in chirurgie, deoarece accelereaza procesul de vindecare a ranilor si arsurilor si pot fi usor indepartate fara a deteriora tesutul nou format [15, 16]. Fibroina simpla sau modificata chimic cu functiuni

COOH sau OH serveste la obtinerea unor compozite hidroxiapatita-fibroina folosite ca os artificial. Prin dizolvare in anumiti solventi si reconstituire prin precipitare fibroina poate fi prelucrata in filme: geluri, pudre, spume sau chiar tuburi, avand peretii porosi pentru inlocuirea vaselor de sange. Din solutie se pot obtine microparticule pentru eliberarea controlata de principii active sau suporturi de diferite forme pentru culturi de celule pentru studii ori in vederea reconstructiei diferitelor tesuturi.

Fibrele de matase naturala prezinta proprietati care pot concura cu cei mai avansati polimeri sintetici, dar spre deosebire de acestia, se obtin in conditii mai putin dure, din materii prime regenerabile si sunt materiale biodegradabile. De foarte multi ani aceste fibre au aplicatii in industria textila de lux, urmate mai apoi de utilizari industriale si biomedicale. Proprietatile matasii naturale se datoreaza legaturilor de hidrogen extinse, naturii hidrofobice a proteinei si a cristalinitatii insemnate.

Matasea este un material insolubil in majoritatea solventilor, inclusiv apa, solutii diluate de acizi sau baze, inasa este solubila intr-un numar limitat de solventi precum solutiile apoase de saruri de litiu (LiBr, LiSCN), NaSCN sau sistemele $\text{CaCl}_2/\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH}$ si $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2/\text{MeOH}$.

Modulul de elasticitate al matasii produse de *Bombyx mori* este cuprins intre 15-17 GPa, iar rezistenta la tractiune variaza intre 610-690 MPa.

Fibrele de matase prezinta o stabilitate termica buna pana la temperatura de 200 °C. Sub 140 °C nu se constata modificari chimice, iar la temperaturi de peste 200 °C incep sa se formeze gaze (CO , CO_2 , NH_3) prin degradarea gruparilor laterale ale aminoacizilor.

Magnetita este un mineral din grupa oxizilor de fier cu formula chimica Fe_3O_4 , ce prezinta proprietati feromagnetice, fiind oxidul de fier cel mai rezistent fata de acizi si baze. Ionul de fier din mineral poate fi fier bivalent sau trivalent. Magnetita are duritatea pe scara lui Mohs de 5,5 - 6,5, culoare neagra si un luciu mat, metalic. Magnetita este cunoscuta cel mai mult pentru proprietatea sa de a fi puternic atrasa de magneti. Unele forme de magnetita din localitati specifice sunt singurele minerale care actioneaza un magnet natural.

Nanoparticulele de magnetita au un rol foarte important intr-o gama larga de aplicatii datorita proprietatilor precum caracterul super paramagnetic, antimicrobian si non-citotoxic, susceptibilitatea magnetica ridicata, biocompatibilitatea, favorizarea adeziunii celulare, stimularea formarii hidroxiapatitei in organism [17].

Cercetarile recente in domeniul ingineriei osului cer dezvoltarea unor materiale care nu numai ca ar trebui sa inlocuiasca osul, dar sa si regenereze tesutul afectat pe baza unor stimuli externi/interni. Materialele magnetice in scaffold-uri osoase sunt considerate un factor de stimulare a vindecarii osoase, in special cand terapia este insotita de o stimulare magnetica

externa [18]. Multe studii au fost orientate pe materiale compozite si a treia componenta de tip gelatina [19], acid polilactic [20], collagen [21], nanoparticule de argint , nanotuburi de carbon si carboximetil celuloza. Magnetita este un element important in compozite biodegradabile cu aplicatii ca biosenzori, imagistica medicala, hipertermia etc. Nanoparticule de ferita acoperita cu hidroxiapatita sunt unele din cele mai promitatoare materiale cu magnetizare rapida in prezenta campului magnetic [22, 23]. O lucrare recenta arata ca prezenta oxidului de fier in hidroxiapatita poate imbunatati radio-opacitatea si proliferarea osteoblastelor [24]. HA dopata cu Fe_3O_4 prezinta solubilitate crescuta in solutii fiziologice in comparatie cu hidroxiapatita simpla [25].

In concluzie, plecand de la datele de literarura existente la ora actuala, propunerea de fata se refera la prepararea unor biomateriale compozite pe baza de polimeri naturali biocompatibili (fibroina din matase naturala), polimeri sintetici (poli(2-hidroxietyl metacrilat) si nanoparticule magnetice ca scaffold-uri biocompatibile pentru ingineria tesutului osos. Cererea evidentiaza metoda de prepare a acestor compozite cu compozitii variate, metode de caracterizare fizico-chimica si morfologica, teste de biomineralizare in solutii ce mimeaza plasma sangvina si teste biologice pe linii celulare specifice privind biocompatibilitatea acestora.

In continuare se vor descrie materialele folosite in studiu experimental cat si metodele alese pentru prepararea si caracterizarea materialelor compozite propuse in cadrul inventiei.

2. MATERIALE SI METODE

2.1. MATERIALE

Materialele folosite in vederea intocmirii prezentei cereri de brevet au fost urmatoarele: coconi de matase *Bombyx mori*, nanoparticule de magnetita (MAG, obtinuta in laborator), 2-hidroxietyl metacrilat (HEMA, SIGMA), agenta de reticulare etilenglicol dimetacrilat (EGDMA, SIGMA-ALDRICH), sisteme de initiere: persulfat de potasiu cu intiere termica la 60 °C, alte substante folosite: apa distilata, bromura de litiu (Sigma-Aldrich), membrane de dializa.

Fibrele de matase sunt alcatuite din doua proteine diferite: o proteina structurala interioara denumita **fibroina** si stratul de ceara protector denumit sericina. Acestea au o structura de tip miez-teaca, aratand ca matasea este formata din doua filamente de fibroina care sunt acoperite cu sericina. Fibroina este compusa dintr-o secventa repetitiva de aminoacizi: glicina, alanina si serina, nefiind solubila in apa.

Magnetita (Fe_3O_4) a fost preparata prin metoda coprecipitarii pornind de la clorura ferica ($FeCl_3$), sulfura de fier heptahidratat ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) si hidroxid de amoniu (NH_4OH). Clorura

ferica a fost dizolvata in apa la temperatura camerei pentru a se obtine o solutie clara. La solutia astfel obtinuta se adauga sulfura de fier la temperatura camerei, sub agitare magnetica. Solutia amestec obtinuta este apoi introdusa intr-o solutie apoasa de hidroxid de amoniu. Precipitatul de Fe_3O_4 se separa din mediul de reactivi cu ajutorul unui magnet puternic si se spala de mai multe ori cu alcool etilic si apa distilata pana cand se atinge un pH neutru ($\text{pH}=7$) in mediul de spalare. Dupa spalare, precipitatul de Fe_3O_4 este uscat in etuva, la $60\text{ }^\circ\text{C}$, timp de 12 ore.

Poli(2-hidroxietil metacrilatul) (PHEMA) este de asemenea un polimer biocompatibil, netoxic, format din unitati repetitive de 2-hidroxietil metacrilat (HEMA), un monomer cu masa moleculara $130,14\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, cu urmatoarele proprietati fizice: lichid incolor, densitate $1,07\text{ g/cm}^3$, punct de topire $-99\text{ }^\circ\text{C}$, punct de fierbere $213\text{ }^\circ\text{C}$, presiune de vapori $0,08\text{ hPa}$.

Monomerul poate fi polimerizat sau copolimerizat fara dificultate (ca majoritatea polimerilor metacrilici), iar functiunile alcoolice primare permit formarea de derivati HEMA cu legatura dubla neschimbata. Polimerul permite la randul sau asemenea substitutii, ceea ce conduce la formarea unei game largi de derivati PHEMA pentru aplicatii in majoritatea ramurilor medicale (oftalmologie, chirurgie, lentile de contact, ortopedie etc).

Etilenglicol dimetacrilatul (EGDMA) este un monomer lichid incolor, cu masa molară de $198,22\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ folosit ca intermediar in producția polimerilor in industria chimica, inclusiv pentru a crea compozite HAP/PMMA si ca agent de reticulare pentru 2-hidroxietil metacrilat.

Persulfatul de potasiu (KP) este un compus anorganic solid si alb, foarte solubil in apa, cu formula chimica $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ si masa moleculara $270,322\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Totodata, aceasta sare este un puternic antioxidant folosit in mod uzual in iniierea polimerizarilor radicalice.

2.2. METODE

2.2.1. Obținerea fibroinei din coconi de matase *Bombyx mori*

Coconii de matase din viermi *Bombyx mori* sunt supusi unui proces de degomare pentru a indeparta sericina din suprafata fibrelor de matase. Acest proces consta in maruntirea coconilor si fierberea acestora pentru 30 de minute intr-o solutie de carbonat acid de sodiu (NaHCO_3 , 0,05%) in care s-a adaugat un agent tensioactiv (dodecilsulfat de sodiu). Acest ciclu se reia de 3 ori in vederea purificarii avansate a fibroinei. Fibrele de fibroina degomate sunt uscate in etuva la o temperatura de $40\text{-}45\text{ }^\circ\text{C}$ timp de 24h.

2.2.2. Obținerea solutiei de fibroina

Datorita gradului mare de cristalinitate si a legaturilor de hidrogen, fibroina este insolubila in majoritatea solvenailor cunoscuai. Totusi, fibroina se dizolva in soluaii de bromura de litiu concentrate sau in amestecuri precum cel de $\text{CaCl}_2/\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-OH}/\text{H}_2\text{O}$.

Obtinerea soluaiei de fibroina rezulta prin dizolvarea fibroinei in soluaie apoasa de LiBr 9,3 M, la temperatura de 55-60 °C, timp de 8 ore, evitandu-se degradarea acesteia (fibroina se degradeaza la aproximativ 190 °C). Solutia rezultata este apoi filtrata pe hartie de filtru cutat pentru indepartarea impuritatilor si dializata timp de 5 zile pentru inlaturarea ionilor rezultati. Dializa si pastrarea solutiei rezultate se opereaza la frigider pentru a putea fi utilizata ulterior deoarece aceasta solutie este metastabila si poate precipita. Concentratia finala a solutiei de fibroina a fost 3%.

2.2.3. Obtinerea compozitelor pe baza de fibroina din matase naturala si nanoparticule magnetice (protocol de lucru)

Procedeul de lucru consta in dispersarea nanoparticulelor de magnetita in solutie de fibroina prin ultrasonicare timp de o ora, urmata de adaugarea unei solutii de monomer, initiator si agent de reticulare (2-hidroxietyl metacrilat, persulfat de potasiu si etilenglicol dimetacrilat) (fig. 1). Aceste amestecuri cu compozitii diferite sunt turnate/injectate in matrite de cauciuc (forma patrata) la o temperatura de 60 °C, presiune atmosferica, timp de patru zile pentru intarire. Au fost obtinute biocompozite cu rapoarte variate intre solutia de fibroina si cea de monomer: SF/PHEMA, 10/90, 30/70, 50/50. Concentratia magnetitei (MAG) in solutia initiala a fost mentinuta constanta pentru toate cazurile (1% fata de amestec). Au fost obtinute si loturi martor fara nanoparticule de magnetita prin acelasi protocol.

Dizpozitivul de obtinere a biocompozitelor este alcatuit din doua placi de sticla si o matrita de cauciuc dispuse in format sandwich, prinse cu cleme pentru ermetizare (fig. 2).

2.2.3. Caracterizarea fizico-chimica si morfologica a biocompozitelor SF/PHEMA/MAG

Analiza spectroscopica Raman a fost realizata pe un dispozitiv LabRAM HR Evolution de la Horiba (Jobin Yvon).

Analiza prin difractie de raze X (XRD) a fost realizata cu ajutorul unui difractometru Panalytical X'PERT MPD, in domeniul $2\theta = 10-80$. Un fascicul de raze X caracteristic radiatiei Cu K α a fost utilizat ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$).

Analiza prin microscopie electronica de baleiaj (SEM) a fost efectuata cu un echipament SEM QUANTA INSPECT F cu tun de emisie (FEG) cu rezolutia de 1,2 nm si cu EDS. Probele au fost acoperite in prealabil cu nanoparticule de aur in vederea asigurarea conductivitatii. Analiza TEM a fost realizata cu un microscop electronic de transmisie de ultra rezolutie (HR-TEM) TECNAI F30 G2 S-TWIN operat la 300 kV echipat cu EDAX.

2.2.4. Evaluarea comportamentului la biomineralizare a compozitelor cu magnetita prin imersare in solutii alternante de calciu si fosfor

Tetsushi Taguchi si colaboratorii sai [26, 27] au aratat ca se pot forma *in vitro* in/pe o matrice polimerica de tip hidrogel structuri de tipul os-apatita la temperaturi si presiuni normale folosindu-se metoda ciclurilor alternante.

Metoda ciclurilor alternante este un proces care implica imersarea alternanta a probelor in doua solutii: o solutie apoasa de CaCl_2 / tris(hidroxiometil)aminometan (Tris) si HCl concentrat (pH=7,4), solutie Ca 200 mM; o solutie apoasa de Na_2HPO_4 120 mM. Probele cu si fara nanoparticule magnetice au fost imersate pe rand in cele doua solutii timp de 4 zile. La final, probele au fost spalate cu apa distilata, uscate si supuse investigatiilor morfologice prin analiza SEM.

2.2.5. Evaluarea biocompatibilitatii biomaterialelor pe linii celulare specifice

In acest studiu au fost utilizate pre-osteoblaste de soarece, apartinand liniei celulare MC3T3-E1, tulpina C57BL/6. Celulele MC3T3-E1 au fost cultivate in mediu de cultura Dulbecco's modified Eagle's Medium *low glucose* (DMEM lg) (Sigma-Aldrich, cod D2902), suplimentat cu 3,5 g glucoza, 1,5 g NaHCO_3 , 1% antibiotic-antimicotic (ABAM) (Sigma-Aldrich, cod A5955) si 10% ser fetal bovin (SFB) (Gibco, cod 10106-151). Incubarea s-a realizat la 37°C , intr-o atmosfera umeda de 5% CO_2 , iar mediul de cultura a fost schimbat la fiecare trei zile.

Pentru multiplicare, celulele MC3T3-E1 ajunse la confluenta au fost desprinse de pe substrat cu o solutie de 2,5% tripsina – 0,53mM EDTA si recultivate la o densitate celulara inferioara.

Realizarea bioconstructului de tip celule/suport

Celulele MC3T3-E1 au fost desprinse de pe suprafata de cultura, numarate intr-o camera de numarare Burkert-turk si centrifugate, timp de 10 minute, la 420g. In paralel, hidrogelurile au fost sterilizate prin expunere la UV cate 12h pe fiecare fata si apoi gonflata in tampon tampon PBS, suplimentat cu 1% ABAM, la 4°C , timp de 24h.

Sedimentul celular obtinut dupa centrifugare a fost reluat in mediu de cultura astfel incat, pe suprafata fiecarui suport steril a fost distribuit un volum de 150 μL suspensie celulara care contine 10^6 celule. Dupa insamantare, suporturile nu au fost miscate timp de 30 de minute pentru aderarea celulelor la material. In final a fost adaugat mediul de cultura si sistemele celule-suport au fost incubate in conditii standard de cultivare in vederea realizarii experimentelor propuse.

Campul magnetic la care au fost expuse probele a fost generat magneti de Neodymium N35 plasati sub bioconstructele 3D si a avut o intensitate de 120 mT.

Evaluarea viabilitatii celulelor in contact cu scaffold-urile - Testul Live/Dead

Viabilitatea celulelor MC3T3-E1 a fost evaluata calitativ prin microscopie de fluorescenta dupa 2 zile de la insamantare. Acest test a fost realizat prin marcarea fluorescenta a celulelor



vii și moarte cu ajutorul kitului *LIVE&DEAD* (Invitrogen, cod L3224). Kitul conține două componente cu ajutorul cărora se pot evidenția celulele în fluorescență:

- *CalceinaAM* - o substanță nefluorescentă, permeabilă pentru membrana celulară, care odată ajunsă în citoplasmă, este convertită de esterase într-un compus cu o fluorescență intensă (calceina). Acest compus, cu o fluorescență verde (ex/em: ~ 495 nm/~ 515 nm), este foarte bine reținut în celulele vii;

- *Bromura de etidiu* - un compus care pătrunde în celule doar în cazul în care membrana este deteriorată și se leagă de acizii nucleici, producând o fluorescență puternică, roșie (ex/em: ~ 495 nm/~ 635 nm).

Protocolul de lucru pentru aceste studii a constat în aspirarea mediului de cultură și spălarea sistemelor 3-D celule-suport cu tampon PBS pentru îndepărtarea urmelor de SFB. Probele au fost apoi incubate, la temperatura camerei, la întuneric, 15-20 minute cu soluția de colorare preparată în prealabil conform indicațiilor din kit (2 μM CalceinaAM și 4 μM Bromura de etidiu în mediu fără SFB). După expirarea timpului, structurile au fost așezate pe o lamă de microscop și inspectate în fluorescență, la microscopul Olympus IX 73.

3. REZULTATE OBTINUTE ÎN CADRUL CERERII DE BREVET DE INVENTIE

3.1. Obținerea biocompozitelor pe baza de fibroină și nanoparticule magnetice

În cadrul cererii de brevet au fost obținute materiale compozite pe baza de fibroină, poli(2-hidroxietilmetacrilat) și nanoparticule magnetice (1% față de amestecul inițial) cu diferite compoziții: SF/PHEMA 10:90, 30:70, 50:50 (rapoarte volumetrice între soluțiile de fibroină și HEMA), dar și probele martor prezentate în figura 3 de mai jos.

3.2. Caracterizarea biocompozitelor prin spectrometrie RAMAN

Materialele pe baza de fibroină/PHEMA și nanoparticule magnetice au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic prin tehnica spectroscopiei Raman. Rezultatele sunt evidențiate în figura 4 unde se poate observa prezența peak-ului caracteristic magnetitei în sistemul compozit SF/PHEMA/MAG de la 673 cm⁻¹ deplasat către 668/703 cm⁻¹.

3.3. Caracterizarea morfologică a biocompozitelor (analize SEM/TEM)

Imaginile SEM și spectrele EDAX pe toate compozițiile studiate evidențiază faptul că magnetita s-a dispersat relativ uniform în masa materialelor obținute, în unele părți concentrația să fie mai mare. Zonele luminoase reprezintă zone cu concentrație mare de magnetită (fig.5.(a)-stanga), iar celelalte zone reprezintă suportul cu magnetită în concentrații mai mici. De asemenea, s-a constatat că indiferent de raportul fibroină din matase și PHEMA, modul de dispersie al magnetitei este același.

17

Imaginile TEM de ansamblu (fig.7 sus) evidentiaza mult mai bine prezenta si dispersarea magnetitei in material. In imaginile TEM de detaliu (fig.7. jos) de 20 nm se observa nanoparticulele de magnetita individual, cu diametrul cuprins intre 7 si 15 nm, iar in cele de inalta rezolutie, de 2 nm, sunt evidentiata planele de difractie ale magnetitei. Analizele EDAX (fig.8) facute in TEM si prezentate mai jos confirma de asemenea prezenta fierului in sistemele compozite rezultate.

3.4. Caracterizarea biomaterialelor compozite prin difractie de raze X

Masuratorile de difractie de raze X au fost realizate atat pentru magnetita, cat si pentru sistemele compozite pe baza de fibroina, PHEMA si magnetita si este prezentata in continuare (fig. 9). In difractograma de raze X pentru magnetita se identifica peak-urile sale specifice, dintre care cele mai importante sunt la $2\theta=30,28^\circ$, $35,67^\circ$, $43,36^\circ$ si la $57,36^\circ$.

Pentru toate difractogramele XRD ale materialelor, se observa prezenta peak-ului de la $35,67^\circ$ cel mai pronuntat, deplasat in functie de compozitie. Totodata, majoritatea peak-urilor magnetitei se regasesc in structura biocompozitelor.

3.5. Evaluarea capacitatii de biomineralizare a compozitelor obtinute

Protocolul ales pentru biomineralizarea materialelor a fost metoda ciclurilor alternante. Aceasta presupune prepararea unei solutii de clorura de calciu, imersarea probelor in solutie timp de 24 de ore, spalarea lor cu apa si imersarea in solutie Na_2HPO_4 pentru încă 24 de ore, in doua cicluri alternante (durata test patru zile). Testul a fost realizat la 37°C si presiune atmosferica.

In vederea evidențierii cristalelor de hidroxiapatita, au fost efectuate caracterizari morfologice SEM pentru materialele supuse metodei ciclurilor alternante, iar rezultatele acestora sunt prezentate in microfotografiile SEM de mai jos (fig. 10).

Rezultatele SEM evidentiaza prezenta uniforma a cristalelor de hidroxiapatita pe toata suprafata compozitelor cu magnetita testate. Prin teste comparative pe materiale fara magnetita, se remarcă rolul benefic al magnetitei in procesul de biomineralizare.

3.6. Teste de biocompatibilitate pentru materialele compozite pe baza de fibroina/PHEMA si magnetita

Imaginile de microscopie arata ce celulele au aderat la biomaterialele studiate, indiferent de compozitie. Totusi, distributia celulelor pare a fi organizata diferit in functie de prezenta sau absenta magnetitei in compozitia biomaterialului. Astfel, in cazul compozitiilor fara magnetita, celulele s-au distribuit intr-un monostrat uniform, iar in prezenta magnetitei celulele au prezentat o distributie mai grupata. Acesta observatie poate fi de folos in cazul in care se doreste controlarea distributiei celulelor in biomaterial. In ceea ce priveste,

viabilitatea, majoritatea celulelor au fost marcate cu calceina, ceea ce indica faptul ca ee au supravietuit pe respectivele suporturi.

CONCLUZII

Pe baza rezultatelor obtinute in urma realizării acestor studii se pot formula urmatoarele concluzii:

- Au fost obtinute compozite pe baza de fibroina din matase naturala si nanoparticule magnetice cu compozitii variate (3 compozitii propuse).
- Compozitele obtinute au fost caracterizate prin spectrometrie RAMAN si difractie de raze X iar caracterizarea morfologica prin analize SEM si TEM.
- Au fost realizate teste de biomineralizare pentru materialele obtinute prin metoda ciclurilor alternante (protocol T. Taguchi) ce au condus la rezultate pozitive, in sensul stimulării formării de hidroxiapatita pe suprafata materialelor.
- A fost evaluată biocompatibilitatea biomaterialelor pe linii celulare specifice prin teste de viabilitate Live/Dead si microscopie confocala ce demonstreaza ca toate celulele au aderat la biomaterialele studiate.
- Materialele compozite rezultate prezintă potentiale aplicatii biologice si medicale de tip scaffold-uri pentru ingineria tesutului osos.

In concluzie, scopul si obiectivele cererii de brevet au fost indeplinite, acesta contribuind la dezvoltarea cunostiintelor in domeniul obtinerii si utilizarii biomaterialelor cu proprietati imbunatatite pentru ingineria tesuturilor prin sinteza scaffold-urilor pe baza de matase naturala, polimeri sintetici si nanoparticule de magnetita pentru ingineria tesutului osos.

LEGENDA FIGURI



Fig.1. Dispersarea MAG in amestecul initial

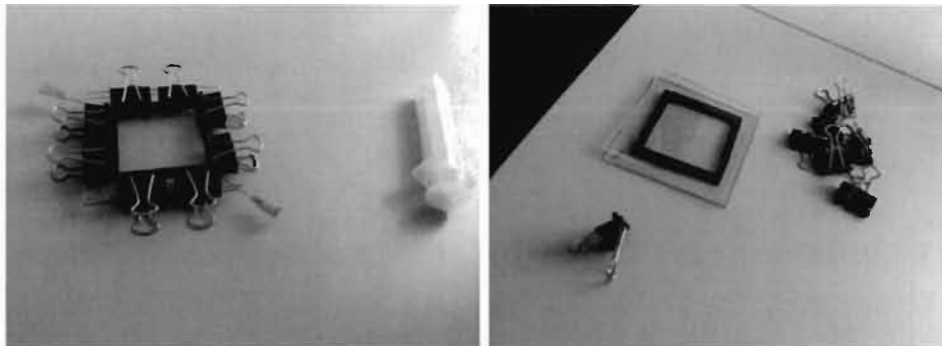


Fig.2. Dispozitiv de obtinere a biocompozitelor SF/PHEMA/MAG

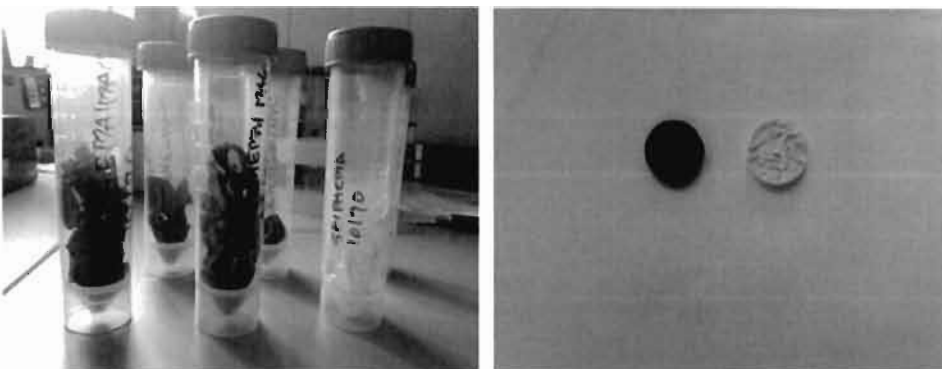


Fig.3. Materiale compozite pe baza de fibroina/PHEMA cu si fara magnetita

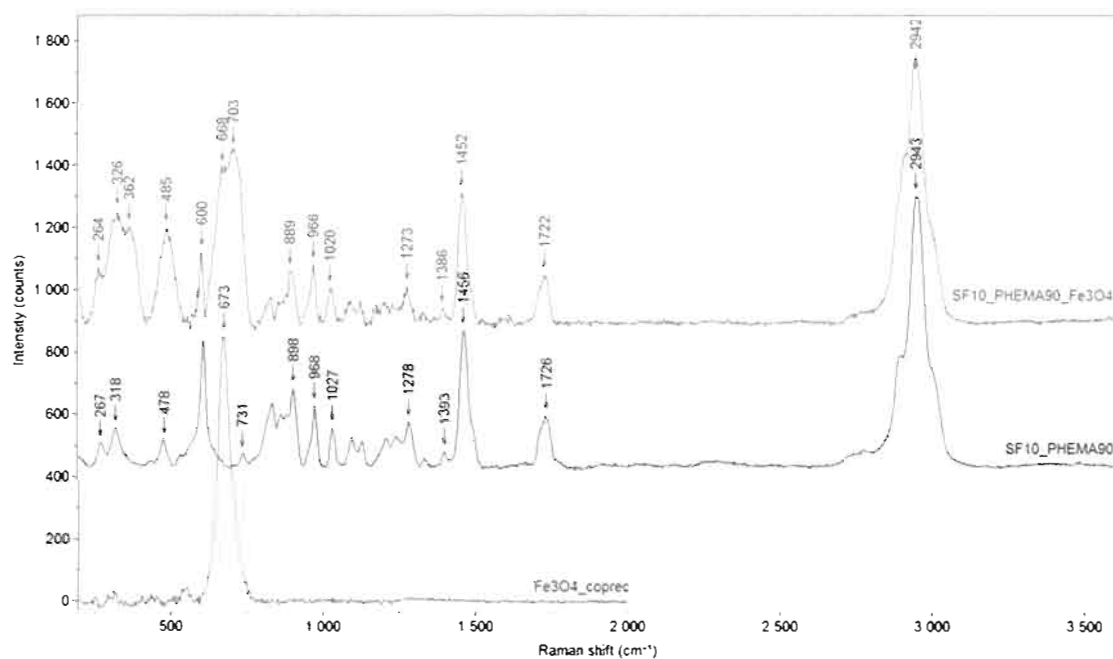


Fig.4. Spectre RAMAN comparative pentru magnetita, biomateriale SF10/PHEMA90/MAG si martor SF10/PHEMA90

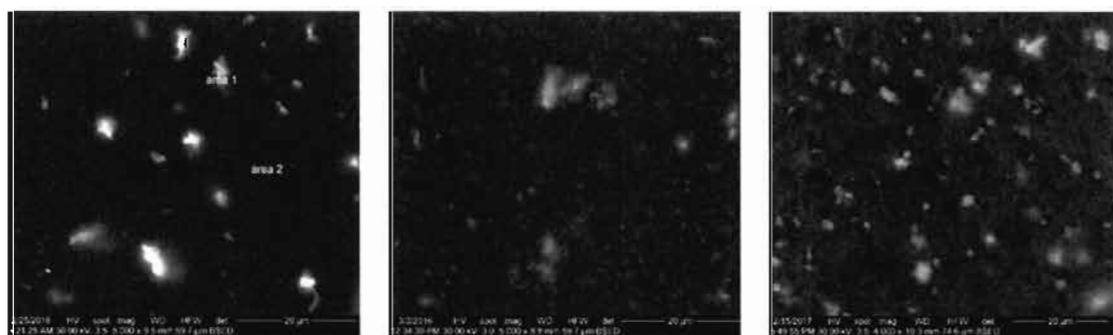
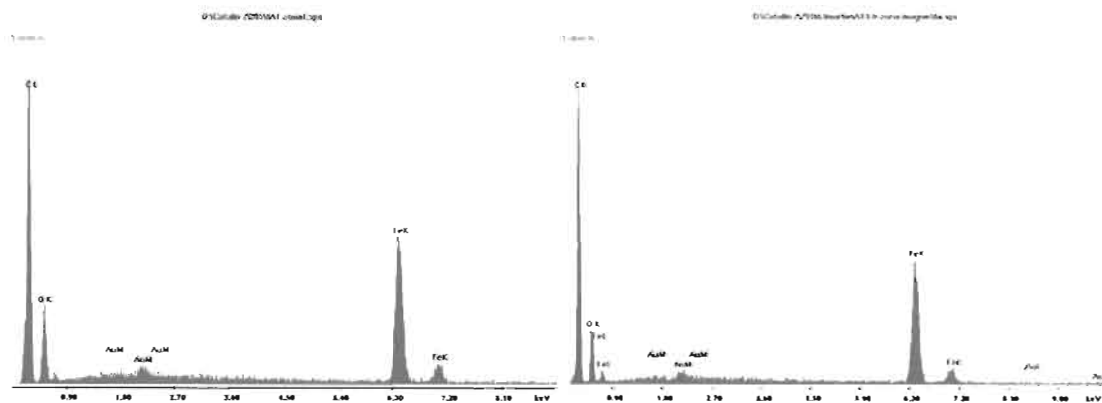


Fig.5. Microfotografiile SEM pentru materiale (a) SF10/PHEMA90/MAG1%, (b) SF30/PHEMA70/MAG1% și (c) SF50/PHEMA50/MAG 1%



50

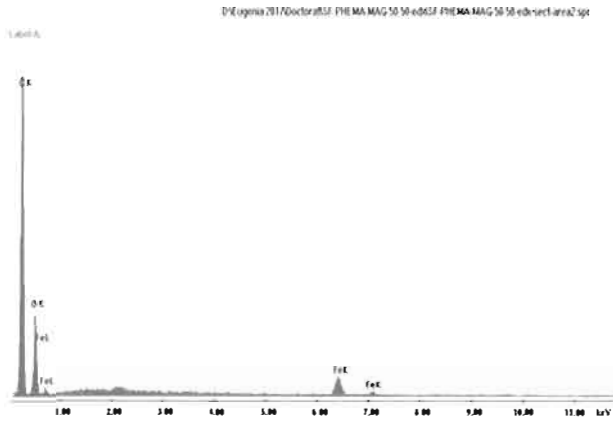


Fig.6. Spectre EDAX pentru materiale(a) SF10/PHEMA90/MAG1%,
(b) SF30/PHEMA70/MAG1% și (c)SF50/PHEMA50/MAG 1%

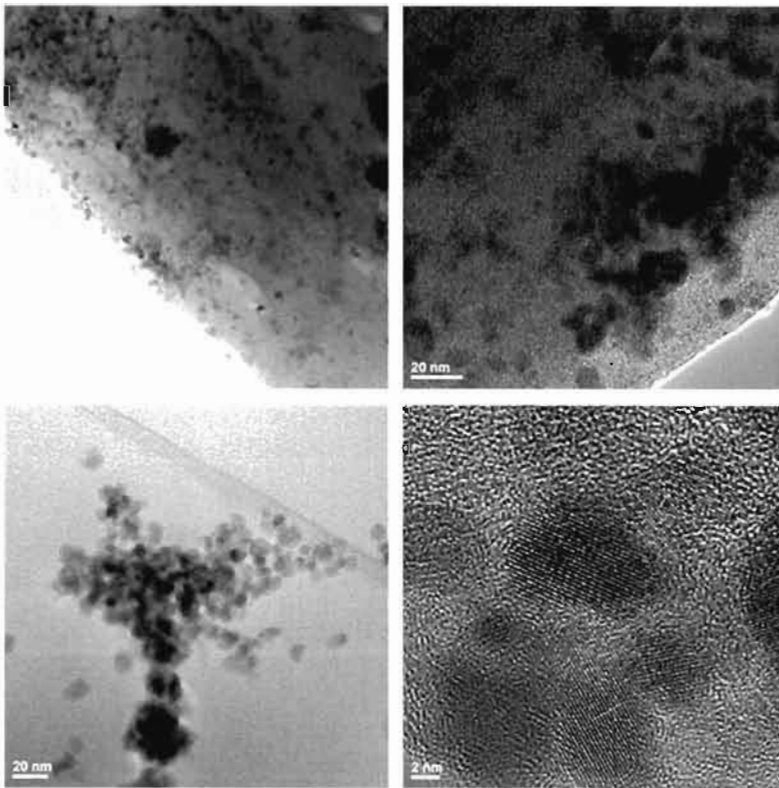


Fig.7. Imagini TEM/HRTEM pentru composite pe bază de SF
50/PHEMA50/MAG 1%

130

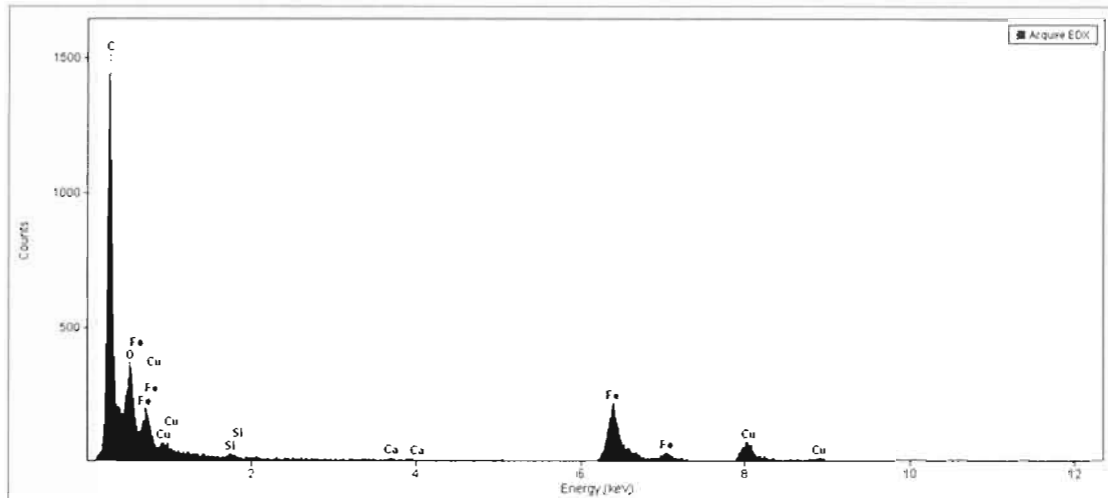


Fig.8. Spectru EDAX pentru materiale SF10/PHEMA90/MAG1%

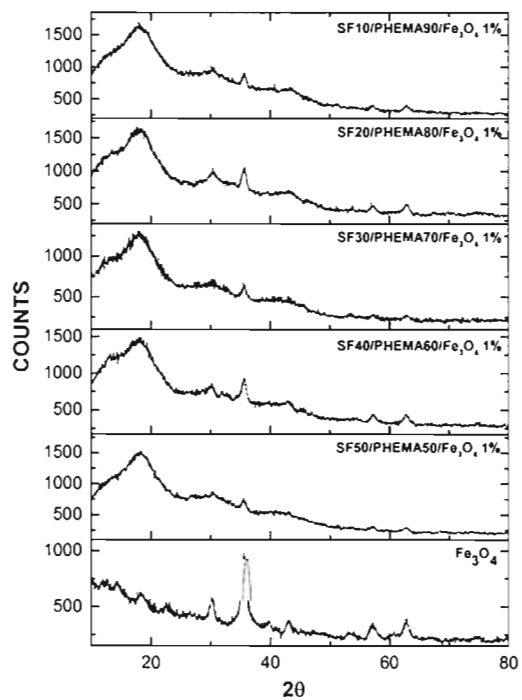


Fig.9. Diffractograme XRD pentru SF/PHEMA/MAG: peak-uri - $35,67^\circ$ deplasat la $35,72^\circ$ pentru SF/PHEMA, 10/90; la $35,85^\circ$ pentru SF/PHEMA, 30/70 si la $35,62^\circ$ pentru SF/PHEMA, 50/50

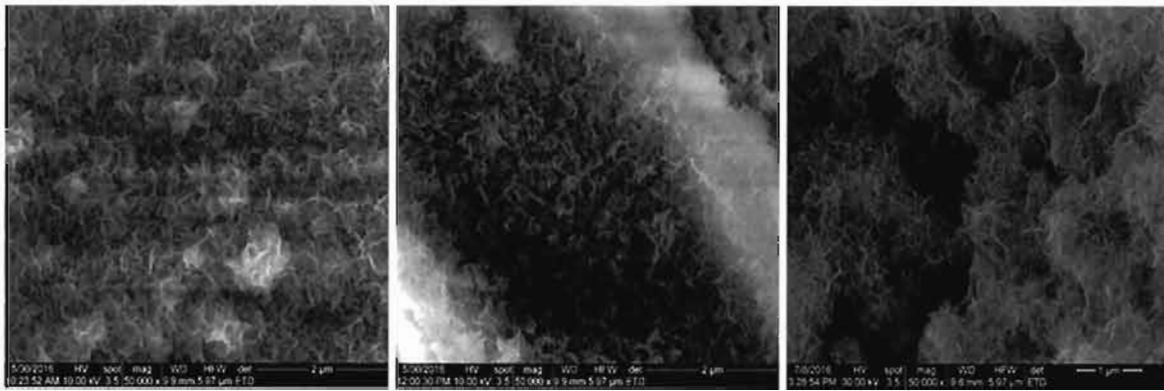


Fig.10. Microfotografii SEM cu cristale de HAp pe suprafața materialelor SF/PHEMA/MAG: 10/90, 30/70 și 50/50

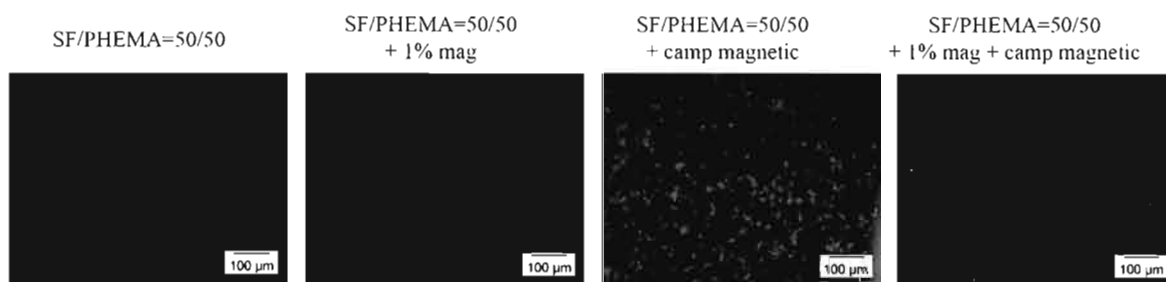


Fig.11. Imagini de microscopie de fluorescență în care se pot observa celule vii (fluorescență verde) și moarte (fluorescență roșie) cultivate 2 zile în contact cu sistemele 3D pe baza de fibroină și PHEMA (50/50), cu și fără magnetită, cu și fără câmp magnetic

REVENDICARI

1. Biocompozitele polimerice pentru aplicatii in ingineria tesutului osos caracterizate prin aceea **ca sunt constituite** din amestecuri pe baza de: fibroina din matase naturala (SF), poli(2-hidroxiethyl metacrilat) (PHEMA) si nanoparticule magnetice de magnetita (MAG). Procedul conform inventiei consta in dispersarea nanoparticulelor de magnetita in solutie de fibroina prin ultrasonicare timp de o ora, urmata de adaugarea unei solutii de monomer, initiator si agent de reticulare (2-hidroxiethyl metacrilat, persulfat de potasiu si etilenglicol dimetacrilat). Aceste amestecuri cu compozitii diferite sunt turnate in matrite de cauciuc (forma patrata) la o temperatura de 60 °C, presiune atmosferica, timp de patru zile pentru intarire.

2. Biocompozite polimerice conform revendicarea 1 **caracterizate prin aceea ca sunt constituite** din amestecuri formate din: 10 % SF, 90 % PHEMA și 1 % magnetita (rapoare volumetrice).

3. Biocompozite polimerice conform revendicarea 1 **caracterizate prin aceea ca sunt constituite** din amestecuri formate din: 30 % SF, 70 % PHEMA și 1 % magnetita (rapoarte volumetrice).

4. Biocompozite polimerice conform revendicarea 1 **caracterizate prin aceea ca sunt constituite** din amestecuri formate din: 50 % SF, 50 % PHEMA și 1 % magnetita (rapoarte volumetrice).

5. Biocompozite polimerice conform revendicarile 1 si 4 cu **biocompatibilitate ridicata** evidentiata prin teste pe linii celulare de soarece.

6. Biocompozite polimerice conform revendicarile 1, 2, 3 si 4 cu **abilitate ridicata de a stimula formarea de hidroxiapatita in solutii de Ca si P** (protocol cicluri alternante).