

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA

ȘCOALA DOCTORALĂ



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

*SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA UNUI MATERIAL
COMPOZIT, BIOCOMPATIBIL DE TIP
HIDROXIAPATITĂ - COLAGEN - ANTIBIOTIC*

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:
PROF. UNIV. DR. JOHNY NEAMȚU**

STUDENT-DOCTORAND:

Filip (Ionescu) Oana-Liliana

**CRAIOVA
2022**

CUPRINS

1. INTRODUCERE

2. STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

2.1. Evoluția generațiilor de biomateriale

2.4. Hidroxiapatita

2.4.1. Compoziția și structura chimică a hidroxiapatitei

2.4.3. Metode de sinteză pentru hidroxiapatită

2.5. Colagenul

2.5.1. Structura și organizarea ierarhică a colagenului

2.6. Compozit pe bază de hidroxiapatită și colagen

2.7. Gentamicina și Ciprofloxacina în managementul infecțiilor osoase

2.8. Ciprofloxacina

2.8.2. Structura chimică

2.8.4. Toxicitate

2.9. Gentamicina

2.9.2. Structura chimică

2.9.3. Mecanismul de acțiune

2.9.4. Toxicitate

3. CONTRIBUȚII PROPRII

3.1. Ipoteza de lucru și obiectivele generale

3.2. Metodologia cercetării

3.2.1. Abordarea temei

3.2.1.1. Incidența osteomielitei

3.2.1.2. Limitele protocoalelor terapeutice actuale și perspective de tratament

3.2.2. Materiale și metode

3.2.2.1.1 Sinteza *in situ*-co precipitarea HA în matricea Col

3.2.2.2. Adiția ciprofloxacinei în structura biocompozitului Col - HA

3.2.2.3. Determinarea cantității de ciprofloxacina prin HPLC

- 3.2.2.4. Eliberarea *in vitro* a ciprofloxacinei
- 3.2.2.5. Adiția gentamicinei la compozitul Col - HA și determinarea eficienței de încapsulare a gentamicinei prin metoda HPLC
- 3.2.2.6. Determinarea gentamicinei din materialul Col - HA - gentamicină
- 3.2.2.7. Eliberarea *in vitro* a gentamicinei
- 3.2.2.8. Tehnici de caracterizare structurală și morfologică
 - 3.2.2.8.1. Analiza prin microscopie electronică de baleiaj
 - 3.2.2.8.2. Analiza Dynamic Light Scattering
 - 3.2.2.8.3. Analiza spectrometrică cu transformată Fourier -FTIR
- 3.2.2.9. Activitatea antibacteriană
- 3.2.2.10. Teste de Biocompatibilitate pe culturi celulare
 - 3.2.2.10.1. Analiza proliferării celulare prin test MTS
 - 3.2.2.10.2. Adeziunea celulară prin microscopie de fluorescență
 - 3.2.2.10.3. Analiza activității enzimactice a fosfatazei alcaline active, la nivelul osteblastelor diferențiate

3.3. REZULTATE

- 3.3.1. Sinteza *in situ* co-precipitarea hidroxipatitei în matricea colagenică
- 3.3.2. Adiția ciprofloxacinei în structura biocompozitului Col - HA
- 3.3.3. Determinarea eficienței de încapsulare a ciprofloxacinei prin HPLC
- 3.3.4. Eliberarea *in vitro* a ciprofloxacinei
- 3.3.5. Determinarea eficienței de încapsulare a gentamicinei prin metoda HPLC
- 3.3.6. Eliberarea *in vitro* a gentamicinei
- 3.3.7. Tehnici de caracterizare structurală și morfologică
- 3.3.8. Activitatea antibacteriană
- 3.3.9. Teste de biocompatibilitate pe culturi celulare

4. DISCUȚII ȘI PERSPECTIVE DE CERCETARE

5. BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

Cuvinte cheie: biocompozite, colagen, hidroxipatită, colagen - hidroxipatită-ciprofloxacina, colagen- hidroxipatită- gentamicină, teste biocompatibilitate

INTRODUCERE

Domeniul de cercetare a biomaterialelor a ajuns astăzi la cea de-a patra generație dar abordul evoluției lor nu trebuie urmărit cronologic ci conceptual pentru că fiecare generație a fost dezvoltată în funcție de proprietățile sale corelat cu nevoile aplicației pentru care a fost proiectată.

Magnitudinea la care a ajuns progresul în cercetarea biomaterialelor, exprimă dimensiunea nevoilor identificate în practica medicală.

Domeniile medicale care beneficiază astăzi cu succes de avantajele biomaterialelor sunt: cardiovascular, ortopedie, stomatologie, chirurgie plastică și reconstructivă.

Ortopedia a contribuit prin cercetare la dezvoltarea științei biomaterialelor, mai mult decât oricare altă specialitate medicală sau farmaceutică încă de la începutul secolului al-XVIII-lea.

Chiar și astăzi când vorbim despre medicina modernă, specialitatea ortopedie se confruntă cu o mare provocare și anume pierderea de țesut cauzată de un traumatism, leziune sau boală precum și tratarea infecțiilor deoarece agenții terapeutici utilizați, ridică probleme de solubilitate și toxicitate.

Strategia actuală, de tratament a osteomielitei cuprinde procedurile chirurgicale de debridare completă a biofilmului format și a țesuturilor necrotice, terapia sistemică și orală cu antibiotice și utilizarea clinică a cementurilor și biomaterialelor, ca materiale de umplere a defectului osos și ca sisteme de cedare a agenților terapeutici.

CONSIDERAȚII GENERALE

Infecția osoasă (osteomielita) a fost și rămâne încă, un risc dificil de gestionat în chirurgia ortopedică și traumatologică.

Deși nu există date epidemiologice exacte, incidența osteomielitei acute și cronice nu este mare, comparativ cu alte patologii dar implicațiile ei sunt invalidante afectând atât calitatea vieții pacienților cât și sistemul de sănătate datorită costurilor generate.

Incidența crește cu vârsta, în principal datorită creșterii prevalenței comorbidităților precum diabetul zaharat și boala vasculară periferică dar și prevalența crescută a traumatismelor.

Deși multe organisme pot cauza infecții ale scheletului osos, *Staphylococcus aureus*, rămâne agentul patogen cel mai răspândit și cu consecințele cele mai devastatoare. Aceasta deoarece *S.A* (dar și alte bacterii), poate adera la os și la dispozitivele implantate chirurgical, exprimă rezistență fenotipică la terapia cu antibiotice și supraviețuiește intracelular.

Așa se explică persistența infecțiilor osoase și rata mare de eșec la tratamentul antimicrobian pe perioade scurte.

Tratamentul tipic în osteomielită prevede îndepărtarea chirurgicală a țesutului afectat urmată de administrarea prelungită a antibioticelor, ceea ce poate duce la efecte adverse, inclusiv afectare renală și hepatică dar și la instalarea rezistenței bacteriene la antibiotice.

Medicina modernă a înregistrat o serie de progrese științifice în tratarea infecției osoase prin dezvoltarea unor dispozitive cu proprietăți antimicrobiene.

Plecând de la faptul că majoritatea țesuturilor umane, cum ar fi oasele, tendoanele, ligamentele, pielea, dinții etc, sunt compozite, acest lucru a permis ulterior sinteza unor compozite capabile să imite aceste țesuturi biologice, să imite comportamentul mecanic pentru a restabili o funcție a unui țesut deteriorat.

Țesutul osos este un compozit natural cu o proporție remarcabilă de hidroxiapatită și colagen, componente esențiale pentru o arhitectură osoasă, optimă pentru procesele de atașare, proliferare, migrare, interacțiune și diferențiere celulară.

Având în vedere avascularizația relativă a osului și penetrabilitatea scăzută a antibioticelor la nivelul țesutului osos, se preferă calea de administrare parenterală pentru a asigura concentrații plasmatice care să permită ulterior o penetrabilitate bună la nivelul osului.

Tratamentul prelungit cu antibiotice implică însă riscul de apariție a efectelor adverse și a rezistenței la antibiotice dar și costuri ridicate pentru sistemul de sănătate.

Din acest motiv s-au înregistrat progrese suplimentare în utilizarea materialelor polimerice biodegradabile pentru aplicații farmacologice, cum ar fi vehiculele de cedare controlată și susținută a medicamentului.

Preocuparea actuală vizează proiectarea acestor materiale astfel încât să imite proprietățile biologice și mecanice ale compozitului natural și să permită în același timp vascularizarea osului.

Începând cu generația a doua de biomateriale, o atenție deosebită se acordă cercetării ceramicilor, în scopul utilizării lor în afecțiuni ale sistemului musculo-scheletal ce necesită înlocuire de țesut osos.

Dintre acestea, HA devine cea mai utilizată pentru aplicații biomedicale: acoperirea implanturilor metalice, greafă de țesut osos, agent de cedare a medicamentelor, material de protecție a rănilor, substrat în culturi celulare, sistem pentru imobilizarea enzimelor și proteză osoasă.

Similitudinea cu componenta anorganică a osului natural, biocompatibilitatea excelentă și osteoconductivitatea sunt câteva din proprietățile care o recomandă ca material biomimetic în aplicațiile medicale.

Faptul că HA este un material bioactiv înseamnă că țesutul osos nou crește direct pe el atunci când este utilizat sub formă de implant deoarece HA poate stabili legături chimice cu țesutul viu datorită asemănării cu apatita din structura acestuia.

S-a emis însă ipoteza că dezvoltarea unui biocompozit cu o compoziție similară țesutului osos ar prezenta o performanță biologică superioară comparativ cu HA singură.

Utilizarea colagenului ca matrice în domeniul biomaterialelor are la bază caracteristici esențiale. Biocompatibilitatea excelentă datorată antigenității slabe și

siguranța datorată biodegradabilității, fac colagenul un polimer natural perfect pentru dispozitive medicale implantabile sub formă de bureți poroși, membrane și fire pentru aplicații chirurgicale sau matrici de culturi celulare.

Sunt bine cunoscute meritele matricei de colagen pur care pot servi ca platforme excelente în repararea și reconstrucția țesuturilor dar în ciuda caracteristicilor sale excelente, prezintă proprietăți mecanice slabe și stabilitate redusă.

Strategia de combinare a unei componente bioactive (colagenul) cu alte materiale cum ar fi polimeri naturali, sintetici și materiale anorganice, este frecvent utilizată pentru a spori rezistența mecanică a matricelor de colagen.

Hidroxiapatita oferă rigiditate și duritate iar colagenul, rezistență la tracțiune și flexibilitate. Funcția biomimetică a celor două materiale este dată și de interacțiuni de natură supramoleculară (legături de hidrogen, forțe electrostatice, efecte de împachetare a matricei organice) sau a unor fenomene de împachetare moleculară datorate complementarității funcționale între componentele compozitului.

În plus, apatita poate forma legături directe cu țesutul osos gazdă ceea ce poate contribui la o legătură mai rapidă și mai bună între suportul biocompozit și țesutul osos gazdă.

În tratamentul osteomielitei, pentru a depăși problema difuziei osoase, s-a preferat calea de administrare parenterală pentru a asigura concentrații plasmatice care să permită ulterior o penetrabilitate bună la nivelul osului.

În cazul infecțiilor osoase se impune tratament prelungit cu antibiotice prin urmare calea parenterală are o serie de limitări. Fie că vorbim despre calea intramusculară care este dificil de abordat în tratament prelungit, sau calea intravenoasă care expune pacientul la evenimente infecțioase, trombotice, se generează costuri suplimentare. În consecință, o atenție deosebită se acordă antibioticelor orale cu biodisponibilitate ridicată.

Alegerea antibioticului se face luând în considerare un cumul de factori: epidemiologia locală, susceptibilitatea antimicrobiană, biodisponibilitatea, istoricul anterior al infecțiilor, contraindicații, alergii, reacții adverse, interacțiuni medicamentoase, grad de penetrabilitate, etc.

Ciprofloxacina nu este utilizată în practica zilnică doar pentru spectrul său înalt de acțiune ci și pentru o bună disponibilitate și penetrabilitate ososă ridicată, datorată parțial legării chinolonelor de calciul din os.

Este utilizată pentru tratarea unui număr mare de infecții datorită spectrului de acțiune care include majoritatea agenților patogeni. În tratamentul infecțiilor se folosește atât în monoterapie cât și în combinație cu alte antibiotice.

Aminoglicozidele (din care face parte și **Gentamicina**) au un spectru larg de acțiune care acoperă organisme aere inclusiv bacteriile gram negative (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*) și micobacteriile.

Efectul bactericid este dependent de doză: concentrațiile mari se corelează cu o distrugere antimicrobiană mai mare. O caracteristică importantă a aminoglicozidelor o reprezintă supresia regenerării bacteriene care persistă la câteva ore după ce concentrația de antibiotic scade sub concentrația minimă inhibitorie (MIC).

Aminoglicozidele pot provoca nefrotoxicitate și ototoxicitate, atât în timpul tratamentului infecțiilor complicate cât și în timpul tratamentului profilactic chiar dacă este vorba de o expunere pe termen scurt. De aceea clinicienii trebuie să echilibreze potențialul toxic și eficacitatea terapeutică. Prin urmare ele sunt menținute ca antibioterapie de linia a doua.

Pentru a putea exploata în continuare potențialul terapeutic al aminoglicozidelor, cercetările continuă și încearcă să dezvolte strategii alternative precum folosirea lor în combinație cu alte clase terapeutice, optimizarea concentrației active, modificarea condițiilor de mediu, formularea lor în materiale purtătoare, biocompatibile.

OBIECTIVE PROPUSE

Obiectivul principal al proiectului de cercetare îl constituie obținerea unui material biocompozit dopat cu antibiotic și utilizat ca *sistem de cedare* pentru a asigura niveluri terapeutice constante, fără a atinge niveluri toxice, pe o perioadă îndelungată de timp, ca avantaj față de calea de administrare sistemică convențională.

În acest studiu vom utiliza biomateriale de generația a III a datorită proprietăților lor bioactive și bioresorbabile care fac ca materialul implantat să se resoarbă în timp, locul lui fiind luat de țesut nou format.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

Cercetarea doctorală se constituie dintr-o parte generală (**stadiul actual al cunoașterii**) structurată în subcapitole care reprezintă un up date al informațiilor existente în literatura de specialitate. Aici am revizuit noțiunile privind evoluția generațiilor de biomateriale, proprietățile biomaterialelor, impactul medical și social al infecției osoase asupra populației și sistemului medical precum și importanța a două clase de antibiotice, în tratarea infecției osoase.

Cunoașterea fiziopatologiei osoase și a cercetărilor recente expuse în literatura de specialitate ajută la o mai bună înțelegere a bolii și a abordării acesteia de către specialiștii implicați în managementul ei.

În acest scop am accesat bazele de date PubMed, Medscape și Google Scholar.

Partea de **contributie personală** (originală) o regăsim în Capitolul al trei-lea, structurată pe trei subcapitole importante.

Subcapitolul 3.1 Sumarizează **ipoteza de lucru și obiectivele secundare** care au susținut proiectul în dinamica sa.

Ipoteza de lucru a fost formulată plecând de la nevoia de optimizare a managementului terapeutic al osteomielitei în vederea limitării caracterului invalidant atât pentru pacient cât și pentru sistemul de sănătate.

Am stabilit care sunt **constituenții sistemului compozit** (colagenul și hidroxiapatita), bazându-ne pe asemănarea lor cu țesutul fiziologic (osul) și am inițiat procesul de **sinteză a biocompozitului**.

Am ales să dopam materialul de testat, prin **adiția a două antibiotice** (ciprofloxacina și gentamicina) din clase diferite (fluorocinolone și aminoglicozide) datorită spectrului lor de acțiune și penetrabilității la nivelul țesutului osos.

Ținând cont de tipul materialelor folosite, metoda lor de sinteză, caracteristicile structurale și funcționale, metoda de sterilizare agreată dar și de tipul de interacțiune pe care îl are sistemul cu țesutul fiziologic, am stabilit modul de **evaluare a citotoxicității materialului compozit**.

O dată testată biocompatibilitatea, am considerat absolut necesară confirmarea eficacității prin **evaluarea activității sale antibacteriene**.

Subcapitolul 3.2. stabilește **medodologia cercetării** abordând datele de incidență a osteomielitei, o statistică încă necunoscută chiar și la nivelul țărilor dezvoltate. În ciuda protocoalelor terapeutice, existente în osteomielită, au fost totuși identificate limite care au deschis noi perspective pentru cercetare.

Subcapitolul 3.2.2 descrie **materialele și metodele** folosite la **sinteza biocompozitului** și ulterior **adiția antibioticului Gentamicină (Genta)** și **chemisorbția antibioticului Ciprofloxacina (Cipro)**. Analizele cantitative și calitative au permis punerea în evidență a antibioticului dar și exprimarea procentuală a acestuia.

Pentru informații referitoare la dimensiunea, forma și tendința de aglomerare a particulelor dar și caracterul poros, am ales tehnici de **analiză structurală și morfologică** (microscopie electronică de baleiaj, difuzia dinamică a luminii).

Metodele de spectrometrie (MTT/MTS, imunofluorescența, activitatea ALP, SEM) au fost folosite la **evaluarea parametrilor de biocompatibilitate**.

Am preferat să testăm **activitatea antibacteriană** a materialului compozit, folosind metode curente de laborator (frotiu Gram, oxidaza test, coagulaza test, citrat test, TSI -test, MIU-test) și metode automate (BD Phoenix și VITEK 2 SYSTEMS).

Subcapitolul 3.3 centralizează **rezultatele** fiecărei etape din cercetare, stabilite anterior.

Subcapitolul 3.3.1. Ca metodă de **sinteză a biocompozitului**, am abordat sinteza *in situ*, co - precipitarea hidroxiapatitei în matricea colagenică, într-o singură etapă.

Are loc o autoasamblare concomitentă între precursorii de hidroxiapatită și gelul de colagen. Procesul, permite un grad înalt de interacțiune între componentele organice și anorganice ale compozitului, aspect important pentru proprietățile finale ale compozitului. De asemenea, reticularea chimică la care am supus materialul, a optimizat legăturile chimice dintre constituenți. Faptul că am ales sinteza în laborator a hidroxiapatitei, pornind de la precursori, ne-a permis un control mai bun asupra dimensiunii și morfologiei particulelor, substituției ionilor și parametrilor de sinteză precum și evitarea unor posibile impurități. Este o metodă de laborator, fiabilă și rapidă.

Ca și recomandări speciale în timpul sintezei: menținerea gelului de colagen pe baie de gheață pentru a preveni denaturarea lui și este esențial menținerea amestecului la un $\text{pH} < 9$ pentru a se produce precipitarea și fibrinoliza colagenului.

Subcapitolele 3.3.2, 3.3.3 și 3.3.4 prezintă rezultatele obținute la **adiția, încapsularea și eliberarea ciprofloxacinei** în/din structura biocompozitului Col- HA. Între adsorbant (biocompozitul) și medicament, are loc o reacție chimică în urma căreia hidroxiapatita se leagă de medicament la nivelul atomilor de calciu și oxigen din gruparea carboxil. Procentul de ciprofloxacină legată, a fost de 18,027%, similar cu alte metode, cu un profil de cedare lentă de 32% în primele 10 zile urmată de o cedare explozivă 89%, până la finalul studiului. Acest comportament de eliberare *in vitro* al Cipro din sistemul de cedare biocompozit Col-HA, poate fi explicat prin faptul că Cipro se rupe mai greu din legăturile formate cu atomii de Ca din structura HA.

Profilul de eliberare al ciprofloxacinei a fost analizat și cu ajutorul unor modele cinetice de ordin 0 (I) de ordin 1 (II) dar și aplicând două modele cinetice: Higuchi (III) și Rigter-Peppas (IV). La ambele modele s-a obținut un coeficient de corelare similar, sugerând astfel un proces de eliberare a medicamentului, pe de-o parte prin difuzie dar și eroziune de suprafață și respectiv desorbție.

Subcapitolele 3.3.5 și 3.3.6 evidențiază **eficiența de încapsulare și eliberare a gentamicinei**. Și în cazul gentamicinei s-a obținut un coeficient însemnat de încapsulare de 15,92%, care se poate datora porozității suportului biocompozit, determinată de colagen. Profilul de cedare a debutat exploziv într-un procent de 50% în primele zece zile și a continuat cu o cedare lentă de 93,33% în următoarele douăzeci de zile.

Eliberarea explozivă poate fi o consecință a eliberării gentamicinei prezentă pe suprafața biocompozitului iar eliberarea lentă poate fi descrisă la cedarea gentamicinei care a difuzat în interiorul materialului biocompozit. În cazul gentamicinei, nu are loc o reacție chimică între HA și antibiotic.

Acest comportament de eliberare *in vivo* a Genta este foarte important atât pentru prevenirea riscului de infecție în primele 10 zile post operator când riscul de infecție este mare cât și prin menținerea susținută pe termen lung a unei concentrații optime pentru acțiunea sa antibacteriană.

Și în cazul gentamicinei, am realizat un studiu cinetic cu ajutorul modelelor Higuchi și Rigter-Peppas, care au arătat o cinetică mixtă cu o diferență nesemnificativă a coeficientului de corelare care sugerează că procesele principale de eliberare a gentamicinei din biocompozitul analizat, au loc concomitent, cumulativ: eroziune de suprafață, difuzie și desorbție.

În **subcapitolul 3.3.7** regăsim rezultatele obținute prin **tehnicele de caracterizare structurală și morfologică**.

Analiza prin microscopie electronică de baleiaj- SEM efectuată pentru cele trei probe (Col- HA, Co- HA- Cipro și Col- HA- Genta), la magnificații 100x a evidențiat structura tridimensională a colagenului, pori interconectați, cu dimensiuni mai mari de 100 μm ceea ce o face un candidat ideal pentru a fi suport de regenerare osoasă.

La magnificații superioare, se pot remarca fibrele de colagen, întrepătrunse, având aspectul unei foi pliate, în cazul tuturor materialelor analizate.

În toate cele trei probe, matricea de colagen este mineralizată cu particule de hidroxiapatită, evidențiate prin prezența unor aglomerate de mari dimensiuni, atât la suprafață, cât și în interiorul materialelor poroase, demonstrând distribuția omogenă a acestora, datorată metodei *in-situ*, de obținere a HA, în matricea de Col.

În urma adăugării fazei anorganice, se observă o scădere a volumului de macropori din matricea colagenică precum și apariția de pori cu dimensiuni mai reduse, de doar câțiva microni. Adăugarea medicamentului, nu modifică substanțial morfologia materialului, substanța activă fiind cel mai probabil absorbită în interiorul porilor sau pe suprafața HA. Metoda de sinteză folosită la obținerea biocompozitului de Col-HA, metoda de liofilizare, au contribuit la obținerea structurii spongioase care expune proprietăți excelente de absorbție, permeabilitate la oxigen, care ulterior vor influența fenomenele de adeziune și proliferare celulară, rata de dispersie și cedare a antibioticului.

Folosind **tehnica de difuzie a luminii (DLS)** am putut evalua distribuția granulometrică (diametrul hidrodinamic), a particulelor de Col-HA și potențialul zeta. Rezultatele obținute pe materialul biocompozit poros, indică o distribuție numerică în care dimensiunile particulelor de pulbere se situează în intervalul [457-779] nm cu cea mai mare reprezentare (41,84%) pentru dimensiunea 457,2 nm și cea mai mică reprezentare la limita superioară a intervalului 779 nm. În ceea ce privește distribuția volumetrică, aceasta descrie o evoluție biomodală cu două intervale, primul cuprins între [457-779] nm iar cel de-al doilea interval se situează între [5-9] μm . Se constată că în cazul distribuției numerice, particulele micronice lipsesc sau sunt practic nedetectabile.

Valorile înregistrate pentru potențialului zeta se situează în intervalul negativ -6,5mV și -12mV, se încadrează în intervalul [-30,+30] mv, ceea ce înseamnă că particulele rămân stabile, cu premise favorabile asupra atașării și proliferării celulare. Rezultatele noastre

Își găsesc argumente într-o serie de studii care au arătat că un material care are o sarcină de suprafață electronegativă, este mai accesibil pentru atașarea și proliferarea osteoblastelor deoarece speciile încărcate negativ (celulele mezenchimale și osteoblastele) se atrag când se află în contact intim.

Analiza spectrometrică cu transformata Fourier- FT-IR ne-a furnizat informații cu privire la lungimile de undă la care apar peak-urile caracteristice vibrațiilor grupării PO_4^{3-} și grupărilor – OH din structura HA.

Comparând lungimea de undă la care apar peak-uri caracteristice hidroxiapatitei din biocompozit (Col-HA), cu cele din spectrul hidroxiapatitei comerciale utilizate ca standard s-a observat că în biocompozitul Col-HA, acestea apar la lungimi de undă identice, ceea ce ne conduce către concluzia că între atomii de Ca din HA și ciprofloxacina inserată prin chemisorbție în biocompozit, nu există legături chimice puternice, care ar fi condus la o deplasare a frecvențelor din spectru, ci probabil acționează forțe de atracție intermoleculară slabe.

În spectrul FTIR al ciprofloxacinei comerciale (Sigma Aldrich, Germany) se constată apariția peak-ului de la 1616 cm^{-1} caracteristic -C=O din ciprofloxacina.

Peak-ul din Col-HA-Cipro este deplasat la aproximativ 1630 cm^{-1} , ceea ce se poate datora legării ionului de calciu din HA la Cipro prin oxigenul carbonilic al ciprofloxacinei.

La $2840\text{-}2845\text{ cm}^{-1}$ se observă atât în spectrul ciprofloxacinei (intensitate mai mare) cât și în spectrul compozitului (intensitate mai mică) o bandă caracteristică vibrației atomului de N din grupa piperazinil. Intensitatea mai redusă a benzii în spectrul compozitului indică o formă zwitterionică a atomului de azot deci acest atom nu poate să realizeze legături coordinative cu ionul de calciu. Faptul că ciprofloxacina se găsește ca amfion în biocompozit este caracterizat și prin absența vibrației de întindere simetrică a grupării carboxilice, vibrație care este însă prezentă în spectrul ciprofloxacinei pure la 1375 cm^{-1} alături de cea de întindere asimetrică la 1590 cm^{-1} . Supoziția noastră este că ciprofloxacina este coordonată bidentat.

Subcapitolul 3.3.8 a fost alocat unui studiu de testare a **activității antibacteriene** pe care suportul tridimensional dezvoltat de noi, dopat cu antibiotic, o exercită asupra unor bacterii incriminate în formarea biofilmelor în cazul intervențiilor chirurgicale din sfera ortopedică.

Testele au demonstrat că proprietățile antibacteriene ale suportului tridimensional biocompozit de Col-HA sunt evidente la o concentrație de 18,27% Cipro și 15,92% Genta, evidențiind zone de inhibiție cuprinse între 30 mm - 40 mm pentru Cipro și 21mm - 25 mm pentru Genta, în cazul tuturor tulpinilor testate.

Între diametrele de inhibiție pentru antibioticele standard și diametrele de inhibiție pentru biocompozitul nostru dopat cu antibiotic, se observă o ușoară diferență în sensul scăderii diametrelor pe material biocompozit - antibiotic. Acest lucru însă nu poate fi interpretat în sensul unei activități antibacteriene mai mici, influențată de materialul biocompozit deoarece toate valorile obținute, se află în intervalul de referință ale antibioticelor conform Ghidului CLSI.

Subcapitolul 3.3.9 se referă la rezultatele obținute la **testele de biocompatibilitate pe culturi celulare**. Rezultatele **testului MTS** au arătat că celulele osteoprogenitoare cultivate pe suportul tridimensional pe bază de hidroxiapatită și matrice colagenică își păstrează activitatea metabolică mitocondrială și sunt distribuite relativ uniform pe suprafața materialului.

Celulele viabile identificate pe materialele cu conținut de antibiotice sunt în număr mai mic. În armonie cu aceste observații, semnalul cantitativ dat de măsurarea spectrofotometrică a mediului în care am adăugat substratul MTS arată o tendință de scădere a numărului de celule metabolic active (viabile) pe probele cu antibiotice față de suportul pe bază de HA și matrice colagenică simplă.

S-a efectuat o analiză complementară a viabilității, prin microscopie de fluorescență efectuată pe suportul tridimensional de Col-HA peste care s-au cultivat MSC. Acest test a confirmat că semnalul MTS măsurat este dat de majoritatea celulelor crescute pe material care își mențin viabilitatea. Celulele tind să se infiltreze în porii materialului și cresc de-a lungul fibrelor de colagen care oferă suport pentru adeziunea celulară.

Am repetat testul de viabilitate și pe celule cultivate în prezența celor trei tipuri de material, în mediu de expansiune DMEM.

Analiza la microscopul de fluorescență a arătat că celulele nu își pierd viabilitatea; apreciem că scăderea semnalului MTS se poate datora mai degrabă unei afectări a proliferării celulare sau a metabolismului mitocondrial și nu datorită intrării celulelor în apoptoză.

Pentru a evalua proprietățile materialului de a susține diferențierea osteogenică a MSC, am efectuat apoi teste comparative în mediu de expansiune (DMEM) și mediu de osteoinducție (OIM – *osteinduction media*).

În condiții osteogenice, numărul de celule este ușor scăzut, fapt anticipat deoarece în timpul diferențierii celulele scad rata de proliferare.

Din punct de vedere funcțional s-a efectuat o analiză care pune în evidență fosfataza alcalină (ALP - *alkaline phosphatase*) activă iar rezultatele au arătat că celulele se infiltrează eficient în suporturile tridimensionale simple Col -HA și în cele ce conțin ciprofloxacina dar mult mai puține celule cu ALP activă au fost identificate în probele Col - HA - Genta în condiții de osteoinducție.

Interesant, ambele antibiotice au avut proprietatea de a crește activitatea ALP chiar și în condiții de expansiune (DMEM), în absența factorilor osteoinductori.

Datorită conținutului intrinsec de fosfați de calciu (HA), nu s-a putut efectua o analiză prin colorare cu Alizarin Red pentru evaluarea gradului de mineralizare a probelor.

Materialul a dovedit proprietăți biomimetice care permit adeziunea și proliferarea celulară ceea ce ne îndreptățește să propunem dezvoltarea lui ulterioară pentru aplicații în implantologie.

Considerăm biocompozitul eligibil pentru o posibilă utilizare ca sistem de cedare a antibioticului cu scopul tratării infecțiilor osoase ce survin ca și complicație în urma unei intervenții chirurgicale în secțiile de ortopedie.

Capitolul 4 este alocat **discuțiilor** generate atât de rezultatele obținute cât și de perspectivele de cercetare pe care le oferă rezultatele noastre.

Discuțiile au fost punctate însă în rezultatele prezentate în subcapitolele descrise anterior pentru a asigura continuitatea informației.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Birt MC, Anderson DW, Bruce TE, Wang J. Osteomyelitis: Recent advances in pathophysiology and therapeutic strategies. *J Orthop* 2017; 14:45-52.
2. Ficai Anton, *Biomateriale compozite pe baza de colagen si hidroxiapatita*, 1 ed. Bucharest: Politehnica press, 2011.â
3. Gao C, Peng S, Feng P, Shuai C. Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Research* 2017; 5:17059.
4. Basutkar A, Kolekar A, A Review on Properties and Applications of Ceramic Matrix Composites. 2020.
5. Wang X, Fang L, Wang S et al. Antibiotic treatment regimens for bone infection after debridement: a study of 902 cases. *BMC Musculoskelet Disord* 2020; 21:215.
6. Trucillo P. Drug Carriers: Classification, Administration, Release Profiles, and Industrial Approach. 2021; 9.
7. Kumar GS, Govindan R, Girija EK. In situ synthesis, characterization and in vitro studies of ciprofloxacin loaded hydroxyapatite nanoparticles for the treatment of osteomyelitis. *J Mater Chem B* 2014; 2:5052-60.
8. Arias CF, Herrero MA, Echeverri LF, Oleaga GE, Lopez JM. Bone remodeling: A tissue-level process emerging from cell-level molecular algorithms. *PLoS One* 2018; 13:e0204171.
9. Saeed GK, Essa AF, Said SA-A. Preparation and characterization of hydroxyapatite powder and study of hydroxyapatite - alumina Composite. 2020; 1591:012006.
10. Mohd Pu'ad NAS, Abdul Haq RH, Mohd Noh H, Abdullah HZ, Idris MI, Lee TC. Synthesis method of hydroxyapatite: A review. *Materials Today: Proceedings* 2020; 29:233-9.
11. Meyer M. Processing of collagen based biomaterials and the resulting materials properties. *Biomed Eng Online* 2019; 18:24.

12. Parisi JR, Fernandes KR, Avanzi IR et al. Incorporation of Collagen from Marine Sponges (Spongin) into Hydroxyapatite Samples: Characterization and In Vitro Biological Evaluation. *Mar Biotechnol (NY)* 2019; 21:30-7.
13. Ficai A, Andronescu E, Ghitulica C et al. Collagen / Hydroxyapatite Interactions in Composite Biomaterials. *Materiale Plastice* 2009; 46.
14. Ciocilteu MV, Mocanu A, Mocanu A et al. Hydroxyapatite-ciprofloxacin delivery system: Synthesis, characterisation and antibacterial activity. *Acta Pharmaceutica* 2018; 68:129-44.
15. Oana- Liliana Filip, Andreea Gabriela Mocanu, Ionela Andreea Neacsu, Maria-Viorica Ciocilteu, Gabriela Rau, Johny Neamtu. Biocompatibility Studies on Collagen-Hydroxyapatite Biomaterial. *Current Health Sciences Journal* 2022; 48, no 2:217-25.
16. Ciocilteu Maria, Oana- Liliana Filip (Ionescu), Costel Valentin Manda et al. Physico-Chemical Characterization and Antibacterial Activity of a Controlled Collagen-Hydroxyapatite-Ciprofloxacin Release System. *FARMACIA* 2020; 68:1055-61.