



UNIVERSITATEA POLITEHNICA BUCUREȘTI
FACULTATEA DE CHIMIE APLICATĂ ȘI
ȘTIINȚA MATERIALELOR

proiect PCCE Nr. 248/2008

**Noi concepte si strategii pentru dezvoltarea cunoasterii unor
noi structuri biocompatibile in bioinginerie**

Partener P3

Site <http://pcce248.weebly.com/>

Raport anual de activitate - *Sinteza lucrarii*

Contributia partenerului P3 in etapa III decembrie 2012 a constat în realizarea activităților științifice corespunzatoare de la **Obiectivul 1** intitulat: **“Obținerea de noi structuri suport 3-D destinate cultivării de osteoblaste și celule stem din măduva osoasă umană (*hMSC*), în vederea obținerii de construcții celule-suport caracterizate arhitectural și mecanic, utilizabile în ingineria țesutului osos”** și respectiv de la **Obiectivul 2** intitulat **“Studiul efectelor cultivării în sistem 3-D și a factorilor de creștere asupra diferențierii condrogenice a celulelor ADAS în vederea obținerii unor modele de investigare a potențialului lor de regenerare a țesutului cartilajinos”**. Activitățile conform planului de realizare au fost îndeplinite în totalitate.

Conform planului de realizare pentru activitățile 1.5, 3.2, 3.5 s-au întocmit buletine de analiză conform rezultatelor prognozate pe etapă pentru analize mecanice, termice (DSC, DTA și DTG), spectroscopice (XPS și FT-IR) și morfologice (absorbție de apă și SEM), iar pentru activitățile 1.1, 1.3, 3.1 și 3.2 au fost obținute atât mostre de probe cât și buletine de analiză. P3 a realizat mai multe serii de suporturi polimerice sub formă de filme și membrane, hidrogeluri sau rețele 3D poroase obținute din diverse componente naturale polimerice (colagen, sericina, acid hialuronic, condroitin sulfat) sau minerale (nano-hidroxiapatita și ceramica bioactivă furnizată de partenerul P7) care au fost caracterizate complet din punct de vedere fizico-chimic (FTIR, XPS), termic (DSC și TGA/DTG), morfologic (SEM, absorbție de apă – cinetica și la echilibru), mecanic, al biodegradabilității și eliberării de proteină. Aceste suporturi au fost furnizate către P1 și P2 în vederea testării biologice. Din rezultatele obținute în urma acestor activități de sinteză și caracterizare s-a întocmit raportul de cercetare pe 2012. În continuare vor fi prezentate exemplele cele mai reprezentative de materiale dezvoltate de către P3 în cadrul acestei etape care pot fi

adaptate pentru a fi utilizate atat in ingineria tesuturilor dure (os) cat si a celor semi-dure (tesut cartilagos).

Suporturi 3D superporoase collagen-sericina-hidroxiapatita – sinteza si caracterizare

Geluri compozite - Coll: SS: HA - au fost obtinute din gel de collagen (Coll), sericina (SS) si nano-hidroxiapatita, iar raportul masic dintre aceste compozitii au fost: 1:0:0, 1:0.2:0, 1:0.4:0, 1:0:0.3, 1:0.2:0.3, 0:0.4:0.3. Atât concentratiile de sericina cat si cele de collagen au fost selectate tinând cont de rezultatele noastre anterioare prezentate in etapa II / 2011 si publicate in JAPS, 2013, 127(3), 2269-2279.

Toate gelurile compozite au avut aceeasi concentratie de collagen (1,2% raportat la substanta uscata) si au fost reticulate cu 0,5% glutaraldehida conform cu metoda descrisa anterior. După procesul de reticulare, gelurile compozite au fost liofilizate cu liofilizatorul Martin Christ Delta 2-24 LSC (Germania), conform programului de liofilizare prezentat in figura 1.

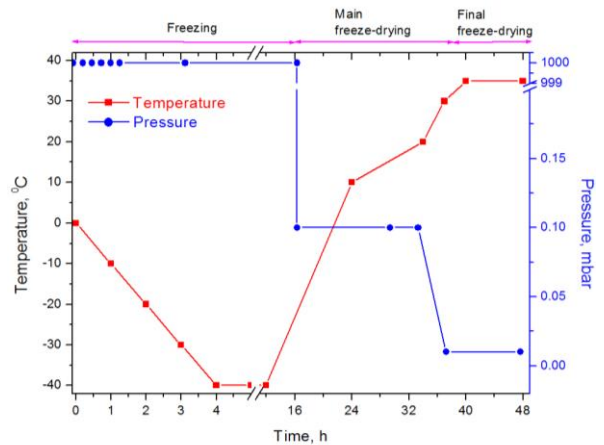


Fig. 1. Diagrama procesului de liofilizare

Astfel, s-au obtinut suporturi 3D superporoase pe baza de collagen-sericina-hidroxiapatita cu compozitiile prezentate in tabelul 1 si aspectul prezentat in figura 2.

Tabelul 1. Compozitia suporturilor 3D superporoase

Denumire proba	Compozitia Coll:SS:HA (w/w)
Coll	1.2% (1:0:0)
Coll-SS-20	1 : 0.2 : 0
Coll-SS-40	1 : 0.4 : 0
Coll-HA	1 : 0 : 0.3
Coll-SS-20-HA	1 : 0.2 : 0.3
Coll-SS-40-HA	1 : 0.4 : 0.3

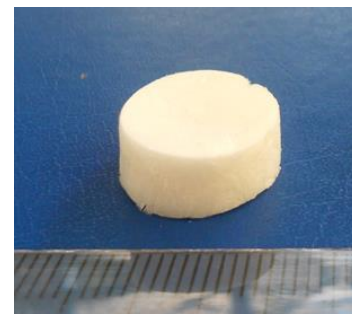


Fig. 2. Suport 3D superporos

Probele prezentate in Tabelul 1 au fost analizate prin spectroscopie FT-IR, analize termice (DSC, TGA/DTG), morfologice (absorbție de apa si SEM) si stabilitatea la degradare enzimatica.

Din spectrele FT-IR se pot observa benzile tipice de collagen: amidă A, B, I, II si III. Asa cum se poate vedea din figura 3, banda amida A se deplaseaza catre numere de undă mai mici (de la 3313 la 3299 cm^{-1}) odata cu adaugarea sericinei, la formarea legăturilor de hidrogen. Maximul benzii amida II se deplaseaza catre numere de unda mai mici odata cu marirea procentului de sericina adaugata, ceea ce produce o destabilizare în structura secundară a collagenului. Cu toate acestea, la concentratia cea mai mare de continut de sericina din suporturi (40%), triplul helix al collagenului nu a fost afectat, mentinându-si integritatea.

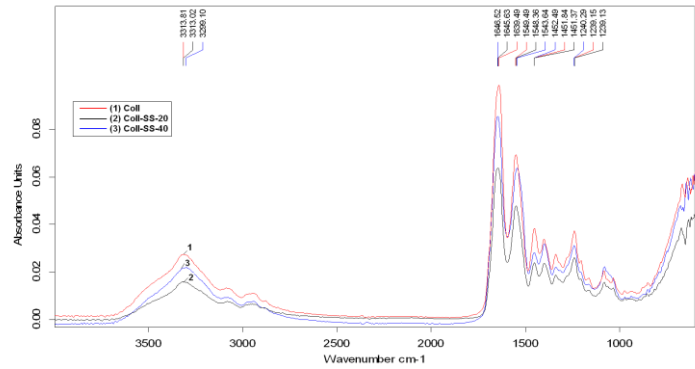
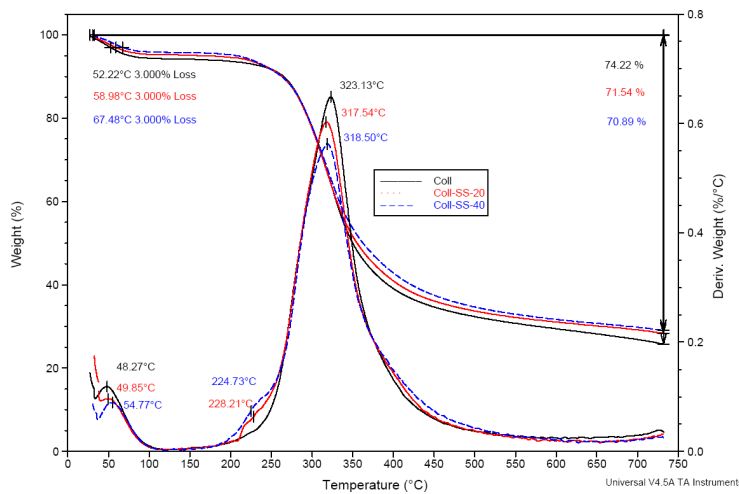


Fig. 3. Spectrele FT-IR ale suporturilor Coll-SS

Comparand suporturile din collagen cu cele care contin collagen si nano-hidroxiapatita se poate observa banda fosfat intre 900-1200 cm^{-1} . Aceasta banda se pastreaza in toate suporturile collagen-sericina-hidroxiapatita.

Curbele TGA / DTG arată o pierdere in greutate in timpul procesului de încălzire. În prima etapă are loc deshidratarea probelor la 48, 49 si 54^oC (figura 4). În a doua etapă de termo-oxidare



apa legata a fost eliminată din collagen si catenele laterale ale aminoacizilor se desfac si legaturile peptidice se rup. De asemenea se remarca faptul ca masa reziduală la 700^oC scade cu adaos de sericina.

Aceiasi tendinta descrescatoare se poate observa si pentru probele care contin hidroxiapatită.

Fig. 4. Curbele TGA si DTG pentru suporturile Coll, Coll-SS-20 si Coll-SS-40

Imaginile SEM ale suporturilor Coll-SS-HA ne prezinta structuri superporoase cu pori interconectati prin fibrile si microfibrile de collagen, asa cum se vede si din morfologia generala a Coll-SS-20-HA (Figura 5). Dimensiunile porilor scad atunci când se adauga sericina, diametrul

porilor fiind de 90-150 μm pentru proba martor (Coll) si 60-130 μm si 5-90 micrometri pentru probele cu 20 si respectiv 40% sericina. După cum se poate vedea în imaginile SEM dimensiunile porilor sunt similare si pentru probele cu hidroxiapatită, dimensiunea porilor variind între 45-115 micrometri.

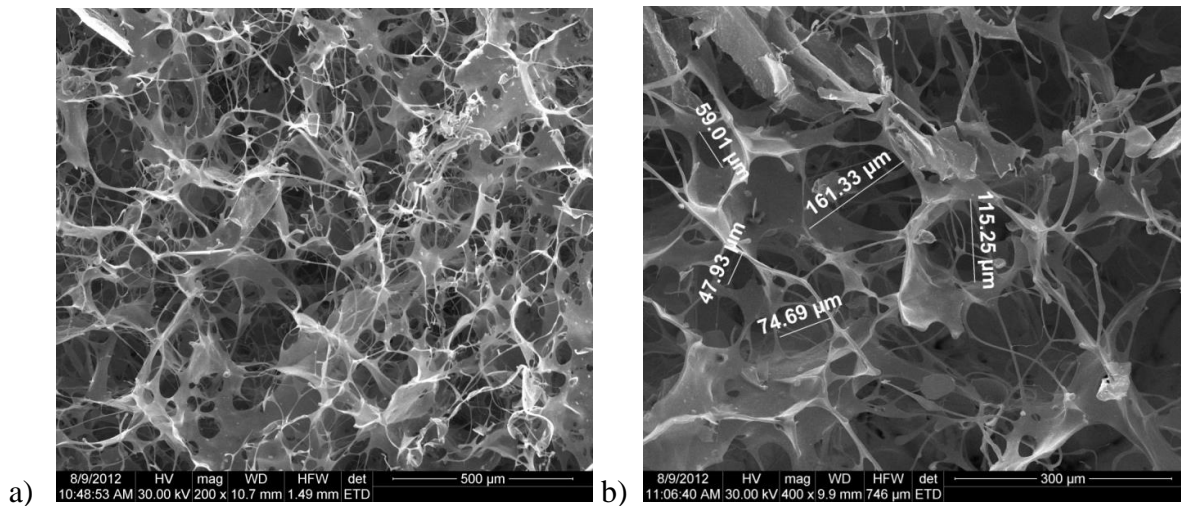


Fig. 5. Morfologie generala a suportului Coll-SS-20-HA - imagini SEM la mariri de:
a) 200 x si b) 400 x

Acest lucru a fost posibil din cauza ca nano-hidroxiapatita interactioneaza si acopera fibrilele si microfibrilele de collagen fiind observate (Figura 6) pe si în structura de collagen.

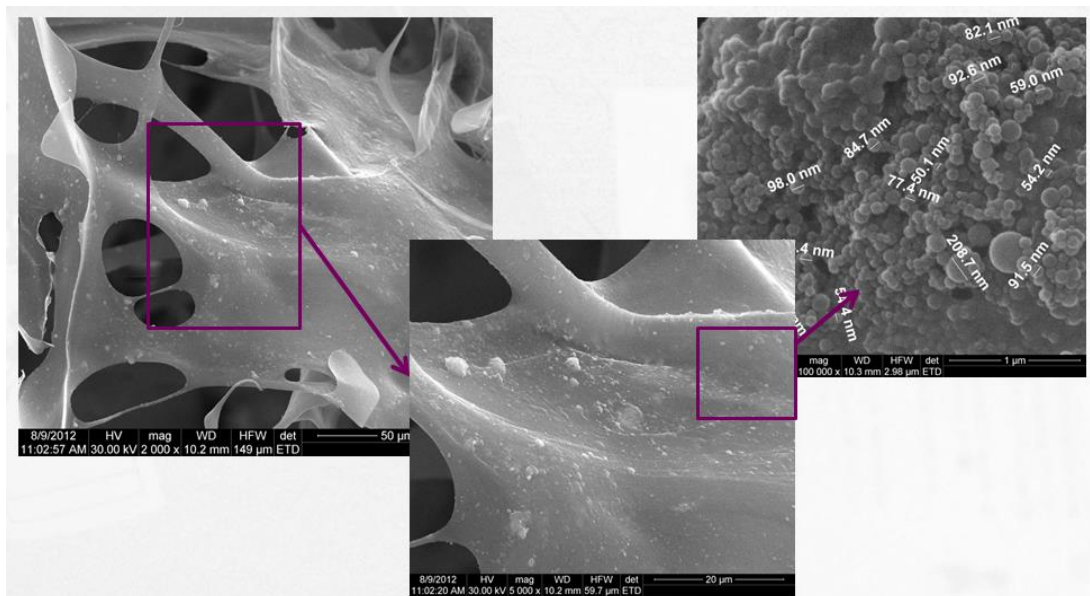


Fig. 6. Morfologie detaliata pentru Coll-SS-20-HA - imagini SEM la mariri de:
2000 x, 5000 x si 100000 x

Studiul absorbției de apă confirmă analiza SEM. Probele cu o dimensiune mai mare a porilor, cum ar fi proba martor de collagen, rețin o cantitate mai mare de apă, iar cele cu structuri mai dense, mai ales cele cu hidroxiapatită absorb chiar și cu 30% mai puțin decât collagenul martor (Figura 7).

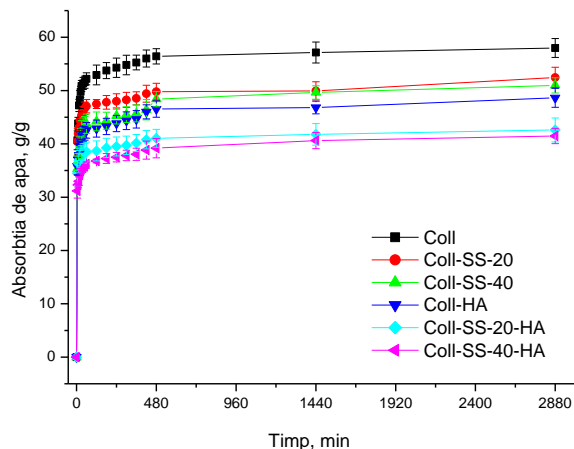


Fig. 7. Absorbția de apă în timp pentru suporturile 3D

Degradarea *in vitro* a fost efectuată în soluție collagenază la 37°C. După o oră, probele de collagen și collagen-sericina au fost degradate în proporție de 15-20%, iar cele care conțin hidroxiapatită au fost degradate în procent de 3 - 8%.

Probele care conțin doar collagen și sericina au fost degradate înainte de 3 zile. Rezultatele sunt în conformitate cu rezultatele analizelor termice. Suportul cel mai rezistent la degradarea cu collagenază a fost Coll-SS-20-HA (Figura 8).

Rezultatele biologice au aratat că atât sericina cât și hidroxiapatita îmbunătățesc viabilitatea celulară și diferențierea celulelor osteoprogenitoare în osteoblaste.

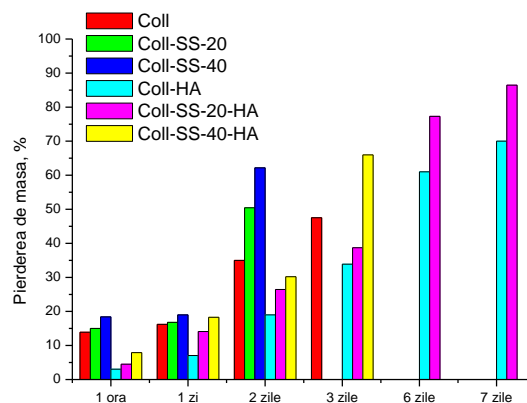


Fig. 8. Degradarea *in vitro* a suporturilor 3D

În concluzie, combinația acestor componente, Coll-SS-HA în procentele stabilite în urma rezultatelor fizico-chimice, mecanice și morfologice, recomandă aceste noi suporturi 3D ca biomateriale promițătoare pentru ingineria țesutului osos.

Hidrogeluri 3D collagen-sericina-acid hialuronic și collagen-sericina-condroitin sulfat - sinteza

Hidrogelurile 3D s-au realizat pornind de la 4 biopolimeri: collagen, sericina, acid hialuronic și condroitin sulfat, în diferite combinații. Ținând cont de rezultatele obținute în etapa anterioară și etapa curentă, s-a ales ca martor suportul Coll-SS40, având compoziția prezentată în tabelul 1.

Pentru realizarea suporturilor cu utilizari in ingineria tesutului cartilajinos, pe langa suportul martor s-au utilizat glicozaminoglicani in proportii de 5 si 10%.

S-au obtinut 5 compozitii de hidrogeluri (Figura 9) cu un continut constant in Coll (1.2%) si 0.4% sericina, astfel:

Proba martor : Coll:SS = 100:40 (Coll - collagen, SS - sericina)

Proba 1: Coll:SS:AH = 100:40:10 (AH - acid hialuronic)

Proba 2: Coll:SS:AH = 100:40:5

Proba 3: Coll:SS: CHS = 100:40:10 (CHS - Chondroitin sulfat)

Proba 4: Coll:SS: CHS = 100:40:5

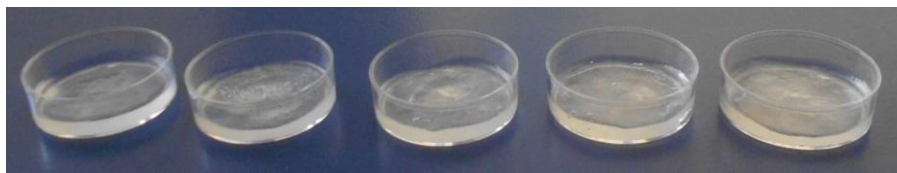


Fig. 9. Hidrogeluri 3D pentru ingineria tesutului cartilajinos

Stabilirea numarului de probe si a formei lor de prezentare, in vederea parcurgerii complete in conditii optime a intregului set de teste pentru biocompatibilitate si diferentiere s-a stabilit impreuna cu partenerul P1. Probele au fost realizate in placi de 12 godeuri, cate 6 probe din fiecare compozitie, cu diametru de 1.2 cm si grosime de 0.2 cm (Figura 10) pentru testarea biocompatibilitatii (3 timpi de testare, 2 suporturi/timp), conform activitatii 3.4 din obiectivul 2, din planul de realizare.

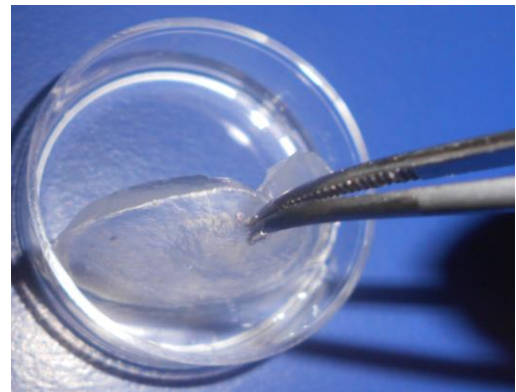


Fig. 10. Hidrogel Coll:SS: CHS = 100:40:5

O parte din rezultatele obtinute au fost publicate / trimise spre publicare astfel:

1. Lungu, M.G. Albu, I.C. Stancu, N.M. Florea, E. Vasile, H. Iovu, Superporous collagen-sericin scaffolds, *Journal of Applied Polymer Science* (IF 1.289), 2013, 127(3), 2269-2279 acceptat
2. C. Zaharia, M. R. Tudora, I. C. Stancu, B. Galateanu, A. Lungu, C. Cincu, Characterization and deposition behaviour of silk hydrogels soaked in simulated body fluid, *Materials Science and Engineering C* (IF 2.686), 2012, 32(4), 945-952 (colaborare P3 / P1) acceptat

3. Capitol carte - ***Concept and design of polymer scaffolds with controlled biodegradability and porosity for tissue engineering applications***

sau comunicate la diverse conferinte / congrese internationale

1. A. Lungu, M.G. Albu, I.C. Stancu, E. Vasile, I. Titorencu, H. Iovu, *Development of innovative superporous collagen-sericine scaffolds loaded with hydroxyapatite designed for bone regeneration*, 9th World Biomaterials Congress (WBC), 1-5 iunie 2012, Chengdu, China.
2. M.G. Albu, A. Lungu, I. Titorencu, I.C. Stancu, E. Vasile, V. Pruna, H. Iovu, *Collagen-sericin-hydroxyapatite composites for bone tissue engineering*, 5th International Conference “Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices” BiomMedD’2012, 29 august – 1 septembrie 2012, Constanta, Romania.
3. 6th International Meeting on Molecular Electronic, 02-07.12.2012, Grenoble, Franta –
sau comunicate in cadrul workshop PCCE 13-14 iulie 2012, Bucuresti, Romania.
4. M.G. Albu, A. Lungu, I.C. Stancu, E. Vasile, H. Iovu, *Superporous sericin-collagen scaffolds*,
5. M.G.Albu, A. Lungu, I. C. Stancu, N. M. Florea, E. Vasile, H. Iovu, *Collagen-chondroitin sulfate scaffolds for bone tissue engineering*,