

Raport stiintific

privind implementarea proiectului Innovative BIOactive COATings for orthopaedic implants deposited BY new pulsed LASER methods (Biocoat_By_Laser) 19_RO-FR/2014

in perioada ianuarie 2014 – decembrie 2016

Studiile noastre s-au concentrat in aceasta etapa asupra consolidarii protocolului experimental al unei noi tehnologii de depunere laser in vederea atingerii scopului urmarit in acest proiect, si anume, crearea unei structuri de tip implant capabila sa „mimeze” caracteristici ale tesutului osos si respectiv sa induca osteogeneza.

Astfel, s-au creat structuri pe baza de materiale hibride, anorganic-organic, folosind tehnologii laser avansate, precum depunerea laser pulsata (PLD – pulsed laser deposition) si respectiv evaporarea laser pulsata asistata matriceal (MAPLE – matrix-assisted pulsed laser evaporation). Am plecat de la fosfati de calciu (CaP), in particular hidroxiapatita (HA) sintetica ce are capacitatea vindecarii tesutului osos printr-o adsorbție crescuta a proteinelor serice adezive sau a secventelor peptidice. Cea mai buna adeziune a unor celule precursorae osteoblastelor pe HA in comparatie cu Ti, este direct corelata cu o adsorbție mai mare a acestor proteine, in particular fibronectina (FN), pe aceste bioceramici.

In prezent, o prioritate in chirurgia ortopedica este gasirea unei configuratii de biomateriale osteoinductive inovative pentru a reproduce un mediu fiziologic optim capabil sa recruteze celule stem mezenchimale si sa influenteze comportamentul acestora de diferentiere spre linii celulare osteoblaste.

In aceasta etapa am incercat sa evaluam bioactivitatea unor configuratii mixte de factori de crestere celulara (bone morphogenetic factor-BMP) si FN in solutii sau ca si acoperiri dropcast pe suprafete prelucrate cu laserul, in particular straturi subtiri de HA depuse prin PLD pe suporti de Ti (structuri TiHA). Ne-am concentrat astfel studiile pe eficienta osteogenica in vitro a unor celule mezenchimale pluripotente (C2C12, osteoprogenitoare umane), sensibile la doze mici de BMP, si care au capacitatea de a se diferentia in celule osoase. Am testat trei membri ai familiei factorilor de crestere BMP: BMP-2, BMP-6 si BMP-7. Am evaluat in paralel capacitatea de legatura moleculara intre fiecare BMP cu FN prin Rezonanta Plasmonica de Suprafata (SPR). In final, am analizat activitatea osteogenica intr-un mediu peri-implant al solutiilor mixte.

Au fost continuate teste biologice *in vitro* pe structuri de TiHA si respectiv pe combinatiile de FN cu factori de crestere din familia BMP (BMP-2, BMP-6 si BMP-7). In aceste studii s-au folosit doua linii celulare mezenchimale pluripotente (C2C12, osteoprogenitoare umane). Diferentierea in osteoblaste se produce prin activarea mai multor gene dintre care amintim *osteonectina* (ON), cu proprietati de legare a colagenului la matricea osoasa, *osteocalcina*, responsabila de mineralizarea osoasa, *fosfataza alcalina* (ALP), o enzima implicata in formarea osoasa, *Runx2*, pentru evidentierea diferentierii in osteoblaste, *Sox9*, cu specificitate in

diferentierea in condrocite si respectiv factorii de crestere *BMP* (2, 3, 4, 6, 7, 9, 13) cu implicare in formarea testutului osos si cartilagos (Figura 1).

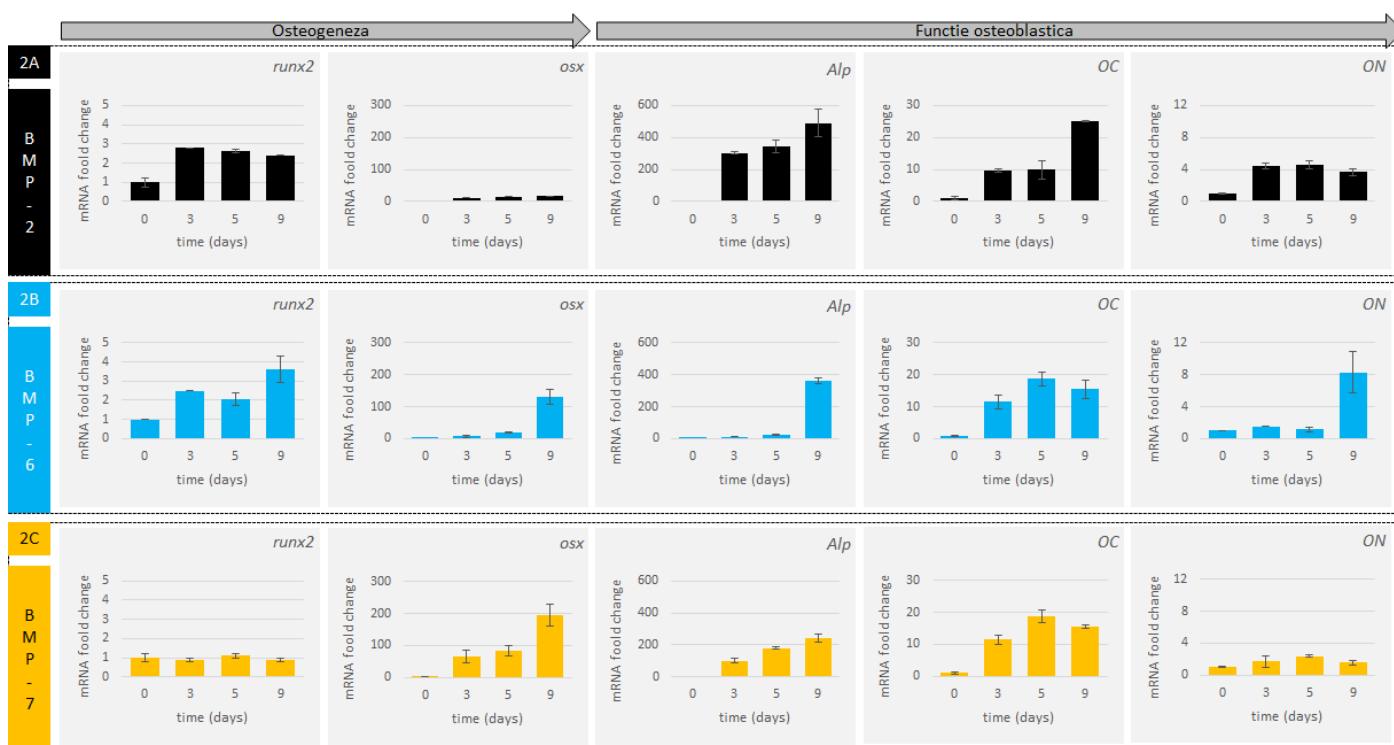


Figura 1 : Teste de bioactivitate si expresie genetica celulara (C2C12) a solutiilor de BMP dupa 3,5 si 9 zile in conditii fiziologice: (2A) BMP-2: 300ng/mL, (2B) BMP-6: 100ng/mL and (2C) BMP-7: 500ng/mL. *Runx2* si *Osx* sunt studiatii ca marker de osteogeneza a C2C12 in osteoblaste iar *Alp*, *ON* si *OC* ca gene functionale osteoblastice.

Aceste teste de evaluare a bioactivitatii au permis evidentiarea urmatoarelor aspecte: (1) celulele C2C12 raspund la stimuli indusi de cei trei factori de crestere, BMP-2, BMP-6 si BMP-7, (2) BMP-6 este cel mai activ factor de crestere ce induce potential osteoblastic in aceasta linie celulara si (3) BMP prezinta o cinetica transcriptionala foarte specifica.

Studiile au continuat cu evaluarea concentratiei minime de factori de crestere, BMP-2, BMP-6 si BMP-7, adsorbita pe substraturile de tip implant functionalizate cu laserul, TiHA, si necesara sa stimuleze initiere si diferentiere celulara a C2C12 (Figura 2). Concentratia de BMP adsorbit pe suprafata a fost evaluata printr-o tehnica colorimetrica Micro-BCA. Pentru toate cele 3 concentratii initiale utilizate, retentia BMP-2 a fost gasita mai mare decat in cazul BMP-6 sau BMP-7 (Fig. 2A). Pentru a analiza mai departe bioactivitatea osteogenica a suprafetelor TiHA functionalizate cu BMP, am evaluat prin qPCR nivelurile celulare *Osx* si *Alp* dupa 3 si 5 zile de incubare. In cazurile BMP-2 si BMP-7, osteoinductia a devenit semnificativ mai eficienta la o concentratie adsorbita de 20µg/mL, corespunzatoare unei concentratii pe suprafata de 2,03µg/cm² pentru BMP-2 si 1,06µg/cm² for BMP-7 (Fig. 2A). Pe de alta parte, suprafetele functionalizate cu numai 5µg/mL de BMP-6 corespunzatoare unei concentratii adsorbite de 0,56µg/cm² (Fig. 2A) au fost capabile sa induca un efect osteoinductiv dupa 3 zile de incubare (Fig. 2B). In mod remarcabil, in timp ce efectul osteoinductiv a fost dramatic redus in cazul BMP-2 sau BMP-7 dupa 5 zile de incubare (si complet anihilat dupa 9 zile), efectul BMP-6 este inca prezent (*Osx* ~200 dupa 5 zile, Fig. 2B). Impreuna, aceste rezultate indica ca

suprafetele TiHA sunt bioactive cand sunt functionalizate cu cel putin $2,03 \pm 0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ BMP-2, $1,06 \pm 0,24 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ BMP-7 si respectiv $0,56 \pm 0,04 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ of BMP-6. In completare, suprafetele functionalizate cu BMP-6 sunt mult mai active cu un efect osteogenic sustinut chiar si in cazul unor doze mici.

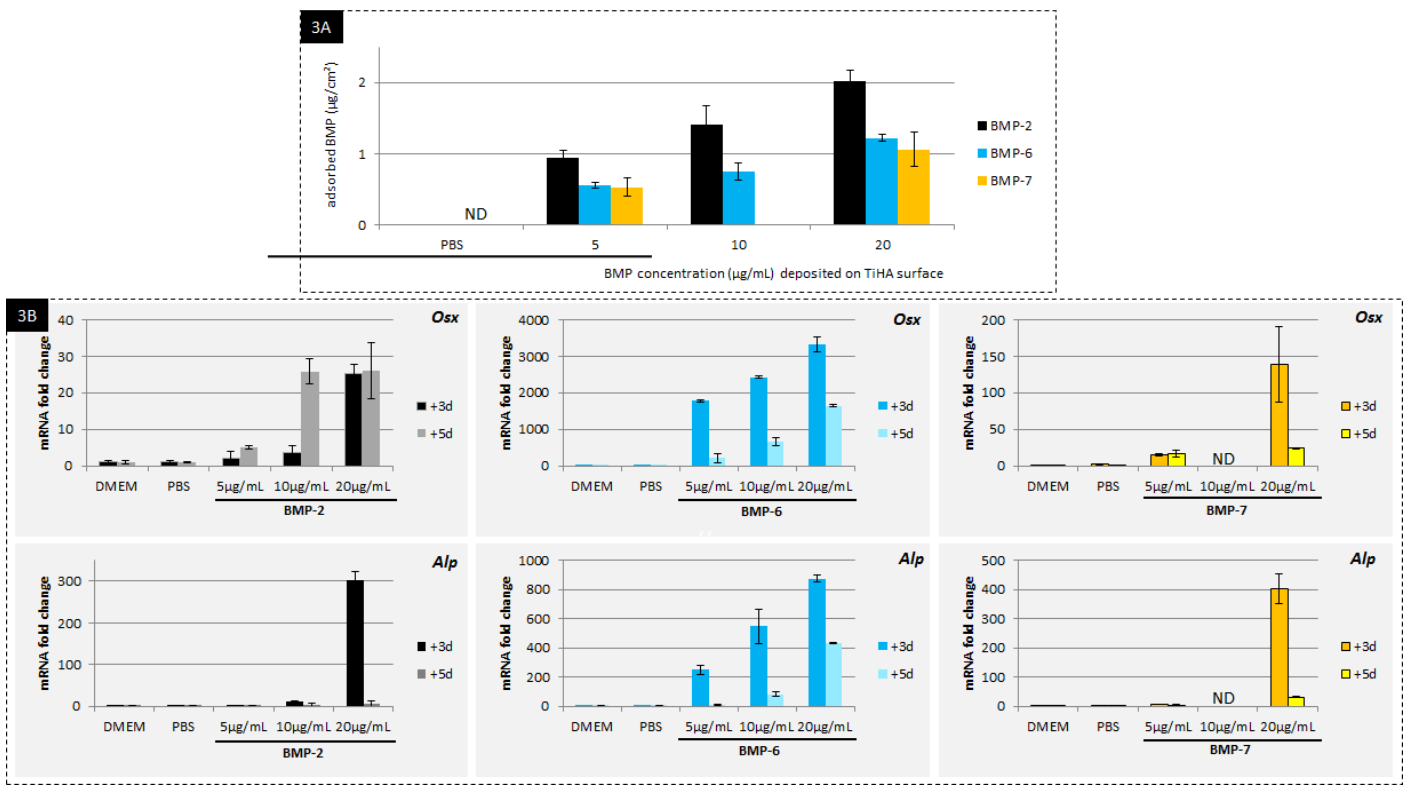


Figura 2 : Evaluarea concentratiei de BMP adsorbit pe suprafetele TiHA necesara sa stimuleze initiere si diferentiere celulara a C2C12 (3A) Comparatie a BMP-2, BMP-6 si BMP-7 dupa adsorbție pe suprafete TiHA. (3B) Expresia genetica in mediu celular DMEM (control negativ), sau pe suprafete TiHA functionalizate (PBS, control negativ), 5, 10 sau 20μg/mL de BMP-2, BMP-6 sau BMP-7.

In studiile anterioare am aratat ca activitatea osteogenica poate fi varia semnificativ in functie de asocierea unor factori de crestere precum BMP in interactie cu FN. Am presupus ca aceste variatii pot fi dependente de afinitatea proteica intre FN si BMP. Pentru a analiza in detaliu acest lucru, am evaluat proprietatile de interactie BMP/FN. Am estimat astfel forta de legatura intr-un ansamblu proteic BMP/FN prin SPR. Pentru a confirma specificitatea legaturii intre BMP si FN, au fost efectuate mai intai experimente control. Un control pozitiv al analizei a fost reprezentat de lectina ConA bine cunoscuta pentru afinitatea mare pentru FN. Prin comparatie, niciun semnal specific nu se observa cand folosim BSA, o proteina cunoscuta ce nu prezinta afinitate pentru FN. Astfel, au fost masurate fortele de interactie dintre FN immobilizata pe un chip-senzor CM5 si BMP-2, BMP-6 si BMP-7. Am incercat diferite concentratii de BMP pentru a minimiza artefactele precum transportul de masa. Senzogramele rezultate au evidentiat variatia drastica a concentratiei de factori de crestere legati de FN (Fig 3). Dupa optimizari, am reusit cuantificarea fortei de legatura, in particular am demonstrat ca BMP-2, BMP-6 si BMP-7 se leaga la FN printr-o asociere rapida de 3.7×10^5 , 1.98×10^4 si respectiv $2.51 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. In timp ce BMP-2 si BMP-7 se disociaza de FN intr-un ritm

asemanator de 1.88 si respectiv $3.35 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, interactia BMP-6/FN a fost gasita foarte puternica cu o disociere lenta de $2.68 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$.

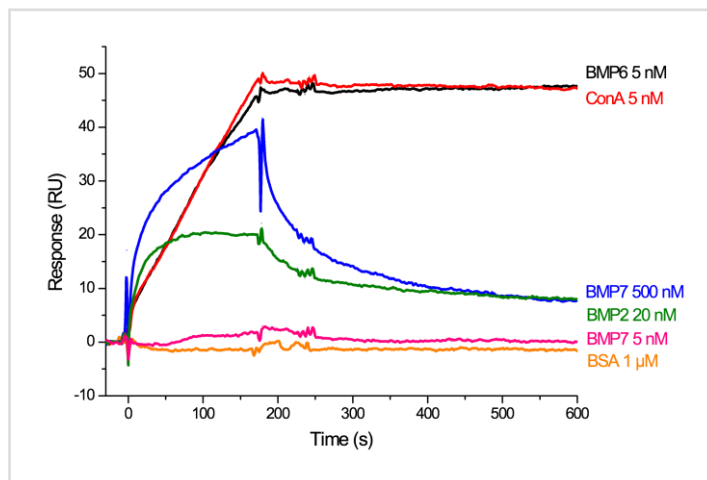


Figura 3 : Analiza SPR a interactiei dintre BMP-2, BMP-6 si BMP-7 cu FN immobilizata pe un chip-senzor CM5. Senzogramul unor injectii de 20 nM BMP-2 (verde), 5 nM BMP-6 (negru), 5 nM BMP-7 (roz) si 500 nM BMP-7 (albastru). Control pozitiv, 5 nM ConA (rosu) si negativ 1 μM BSA (portocaliu).

Efectul paracrin al factorilor de crestere BMP-2, BMP-6 si BMP-7 in jurul suprafetelor implant functionalizate TiHA(FN/BMPs)

Semnalarile paracrine sunt o forma de comunicare intre celule prin care o celula care emite un semnal induce modificari in raspunsurile celulelor vecine, alterand astfel comportamentul de diferentiere al acestora. Moleculele de semnalizare cunoscute sub denumirea de factori paracrin difuzeaza pe distante relativ scurte (actiune locala). Efectul paracrin poate fi legat de efectele adverse evidentiate clinic si induse de BMP-2 sau BMP-7. De aceea, am incercat sa investigam activitatea paracrina a implanturilor functionalizate TiHA(FN/BMPs) prin cuantificarea osteogenicitatii celulare in jurul suprafetelor TiHA(FN/BMPs) si nu direct in contact cu substante osteogenice (Fig 4A). Celulele localizate in jurul spatiului TiHA(FN/BMP-2) incep sa produca *Osx* si *Alp* din ziua 3 si prezinta un pic al unei activitati osteogenice substantiale la ziua 5 (Fig 4B). Chiar daca acest efect este semnificativ mai mare in comparatie cu celulele netratate, el se reduce de 20 ori pentru *Osx* si respectiv 13 ori pentru *Alp* in ziua 9. Pe de alta parte, celulele localizate in jurul suprafetelor implant TiHA(FN/BMP-6) prezinta numai un pic redus al *Alp* la ziua 3 si este nesemnificativ la ziua 5 (Fig 4C). Celulele localizate in jurul suprafetelor implant TiHA(FN/BMP-7) prezinta variatii foarte mici, nesemnificative, ale *Osx* si *Alp* (Fig 4D). Putem astfel concluziona ca efectul paracrin este evident numai in cazul utilizarii BMP-2.

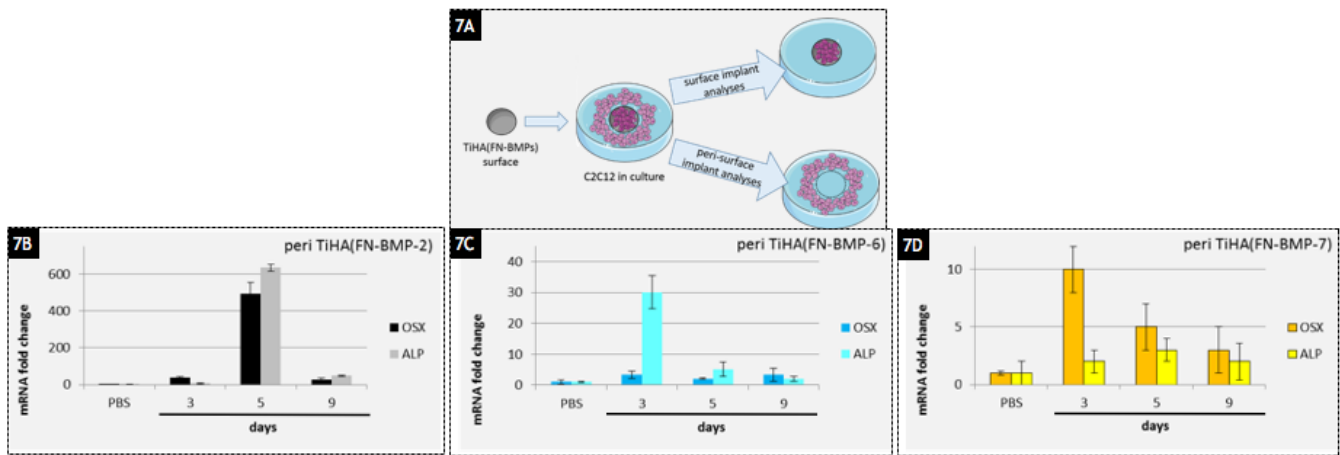


Figura 4: Analiza efectului paracrin pe structuri TiHA(FN-BMP)(7A) reprezentare schematica a procedurii. Analize qPCR ale expresiilor *Osx* si *Alp* in cazul celulelor C2C12 localizate in jurul suprafetelor implant functionalizate cu laserul, TiHA, si tratate cu BMP-2 (7B), BMP-6 (7C) si BMP-7 (7D).

Alte structuri obtinute cu laserul au fost transferate partenerilor francezi pentru evaluare biochimica si biologica *in vitro* si de sterilitate similare celor efectuate pentru a afla dozele optime de plecare pentru noi experimente. Aceste studii vor fi efectuate la sfarsitul acestui an si respectiv inceputul anului viitor si ne vor permite sa alegem cele mai bune structuri pentru a fi utilizate pe substraturi de tip prototip-implant si teste *in vivo* in cele 6 luni de prelungire a contractului 2016.

Concluzii:

In aceasta etapa s-a reusit evaluarea potentialului osteogenic al amestecurilor BMP-FN. Am evidentiat ca afinitatea BMP-urilor pentru FN difera fundamental in functie de tipul de BMP. Astfel, prin combinarea FN cu BMP-2 pe suprafete de TiHA se poate potenta un raspuns rapid osteogenic in timp ce FN poate prelungi timpul de raspuns osteogenic al BMP-6 iar, in mod surprinzator, poate anihila activitatea BMP-7. Aceste rezultate sunt strans corelate cu activitatea FN/BMP deoarece aceasta creste dupa seria BMP-6 > BMP-2 > BMP-7. Prin analiza activitatii osteogenice intr-un mediu peri-implant am aratat ca efectele osteoinductive au fost semnificativ reduse in combinatia FN/BMP-6 spre deosebire de FN/BMP-2. Impreuna, aceste rezultate sustin utilizarea combinatia FN/BMP-6 pentru dezvoltarea mediului biomimetic capabil sa induca activitate osteogenica in conditii fiziologice cu efecte adverse minime.

Aceste combinatii vor fi ulterior investigate *in vivo* pe durata celor 6 luni de prelungire a proiectului.

Valorificare

A. S-au publicat capitolele de carte si articolele:

1. Emanuel AXENTE, Felix SIMA, Carmen RISTOSCU, Natalia MIHAILESCU, Ion N. MIHAILESCU, "Biopolymer thin films synthesized by advanced pulsed laser techniques", Chapter 4 in "Recent Advances in Biopolymers", INTECH (2016), Ed. Farzana Parveen, ISBN 978-953-51-4613-1, pp. 73 - 104

2. F. Sima, E. Axente, C. Ristoscu, O. Gallet, K. Anselme, I.N. Mihailescu, “Bioresponsive surfaces and interfaces fabricated by innovative laser approaches”, Chapter 12 in *Advanced Materials Interfaces (Advanced Materials Book Series)*, Editor: Ashutosh Tiwari, Hiram K. Patra and Xuemei Wang, Scrivener Publishing LLC 2016, ISBN: 978-1-119-24275-8, pp.427 - 462
3. A. Visan, C. Ristoscu, I. N. Mihailescu, “Composite coatings based on renewable resources synthesized by advanced laser techniques”, Chapter 6 in “Composites from Renewable and Sustainable Materials”, InTech, ISBN 978-953-51-4956-9, Edited by: Matheus Poletto, pp. 107 – 132 (2016)
4. G. Popescu-Pelin, C. Ristoscu, I. N. Mihailescu, “Laser ablation of biomaterials” Chapter in “Laser Ablation”, InTech ISBN 978-953-51-4892-0, Edited by: Dongfang Yang, to be published
5. Ion N. Mihailescu, Eugen A. Preoteasa, Elena S. Preoteasa, “Periodic surface structures induced on dental enamel by CO₂ laser 10.6 mm radiation: A novel effect with potential applications in dentistry”, Chapter 6 in A. Reimer (Ed.), *Carbon Dioxide Lasers: Research, Applications and Outcomes (Horizons in World Physics. Volume 289)*, ISBN 978-1-53610-183-6, Nova Science Publishers (2016)
6. N. Mihailescu, G.E. Stan, L. Duta, M. C. Chifiriuc, C. Bleotu, M. Sopronyi, C. Luculescu, F.N. Oktar, I.N. Mihailescu, ‘Structural, compositional, mechanical characterization and biological assessment of bovine-derived hydroxyapatite coatings reinforced with MgF₂ or MgO for implants functionalization’, *Materials Science and Engineering: C*, 59, 2016, 863–874

B. Au fost transmise spre publicare articolele:

1. Isabelle Brigaud, Rémy Agniel, Tahar Bouceba, Johanne Leroy Dudal, Sabrina Kellouche, Arnaud Ponche, N. Mihailescu, M. Sopronyi, F. Sima, Ion Mihailescu, Ana Claudia Carreira, Mari Cleide Sogayar, Olivier Gallet, Karine Anselme „Osteogenic potentialization of BMP-2, BMP-6 or BMP-7 by human plasma fibronectin to functionalize titanium-hydroxyapatite surfaces”, in *evaluare la Biomaterials*
2. Claudiu Hapenciuc, Theodorian Borca-Tasciuc, Ion Mihailescu, *The relationship between the thermoelectric generator efficiency and the device engineering figure of merit Z_d,eng. The maximum efficiency η_{max} , in evaluare la AIP Advances*

C. S-au prezentat lectii orale si invitate la Conferinte de specialitate nationale si internationale din domeniu:

- Ion N. Mihailescu, Carmen Ristoscu, “Pulsed laser synthesis of biomaterial thin films by for biomedical applications”, *Invited Lecture (16) at SLIMS 2016, International School on Lasers in Materials Science Lasers for the Nano-Engineering of Surfaces, Venice, San Servolo, Italy, July 10-17, 2016*
- C. Ristoscu, F. Sima, E. Axente, L. E. Sima, N. Mihailescu, E. Toksoy Oner, A. Bigi, I. N. Mihailescu, “Combinatorial pulsed laser evaporation technique for drug delivery and biomimetic implants applications”, *Oral presentation (LMI-22) at INTERNATIONAL SYMPOSIUM “Fundamentals of Laser Assisted Micro- & Nanotechnologies (FLAMN-16)” June 27 – July 1, 2016, St. Petersburg - Russia*

I. N. Mihailescu, C. Ristoscu, “Soft laser methods for biofabrication: 2D and 3D structures of nanomaterials for new top technologies”, Invited presentation (LT-6) at INTERNATIONAL SYMPOSIUM “Fundamentals of Laser Assisted Micro- & Nanotechnologies (FLAMN-16)” June 27 – July 1, 2016, St. Petersburg - Russia

Pe baza acestei expuneri de motive apreciem ca obiectivele propuse in cadrul acestui contract pentru anul 2016 au fost indeplinite.

Director proiect,

Prof. Dr. Ion N. Mihailescu
