

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 – decembrie 2014

Scopul studiilor acestei etape s-a focalizat asupra dezvoltarii unei metode noi de depunere laser pulsata combinatoriala implementata recent in laboratorul nostru pentru crearea unei structuri de tip implant capabila sa „mimeze” caracteristici ale tesutului osos.

Utilizarea fosfatilor de calciu (CaP), in particular hidroxiapatita (HA) sintetica, cu scopul vindecarii tesutului osos, este o consecinta a capacitatii acestora de adsorbție a proteinelor serice adezive sau a secventelor peptidice. Cea mai buna adeziune a unor celule precursora osteoblastelor pe HA/CaP in comparatie cu Ti, este direct corelata cu adsorbția mai mare a acestor proteine, in particular fibronectina (FN), pe aceste bioceramici. Expertiza laboratorului in acoperiri subtiri de HA prin depunere laser pulsata (PLD) pe suporturi de Ti (Ti/HA) este larg recunoscuta pe plan international. Am elaborat deja un protocol pentru cresterea de filme nanostructurate care sa “mimeze” caracteristicile fazei minerale a matricei osoase.

Originalitatea studiilor propuse rezida in acoperirea structurii Ti/HA cu un film subtire hibrid de proteine, medicament si polimer, cu un gradient compozitional si care prezinta un potential superior de adeziune la tesuturile osoase.

Structurile sintetizate au fost supuse testelor de caracterizare morfologica si compozitionala sau imunomarcaj (anticorpi policlonali).

Din aceste caracterizari complexe au iesit in evidenta rezultatele de cuantificare a FN depuse prin MAPLE. In mod concret, s-au efectuat studii de caracterizare a proteinelor pe suporturi de Ti si respectiv pe structuri Ti/HA la partenerii francezi de la Institutul pentru Stiinta Materialelor din Mulhouse. S-a putut astfel corela cantitatea de substanta proteica cu raspunsul celular pe aceste suprafete. Cuantificarea de proteina pe suprafata solida este de regula foarte dificila, pentru cantitati foarte mici, de ordinul μg , deoarece prin metode chimice obisnuite nu se poate desorbi toata cantitatea de pe substrat. Metoda de investigatie consta in degradarea ireversibila si totala a structurilor proteice la temperaturi inalte (pana la $600\text{ }^{\circ}\text{C}$). Unele specii gazoase ce se formeaza in timpul degradarii proteinei (H_2S sau NH_3) sunt adsorbite prin condensare de o capcana cu azot lichid. Prin incalzirea lenta si controlata a capcanei cu azot lichid, aceste specii sunt desorbite pe intervale scurte de temperatura, permitand, dupa calibrare, cuantificarea exacta a gazelor desorbite prin spectrometrie de masa si respectiv a cantitatii de proteina initiala. Se pot astfel evalua corect cantitati foarte reduse de proteina (de ordinul μg).

In Figura 1 sunt prezentate profilele curbelor inregistrate dupa desorbția H_2S si NH_3 adsorbite pe capcana cu azot lichid. Cantitatile de proteina depuse prin MAPLE ($7.4\ \mu\text{g}$ pe un disc de Ti de diametru 12 mm) sunt in marja celor adsorbite pe suprafata si folosite pentru calibrare. Datorita proiectarii originale a „holder”-ilor dezvoltati in laboratorul nostru si a implementarii noii tehnici C-MAPLE, am putut transfera simultan prin vaporizare laser sincronizata doi compusi cu gradient de compozitie perfect controlabil.

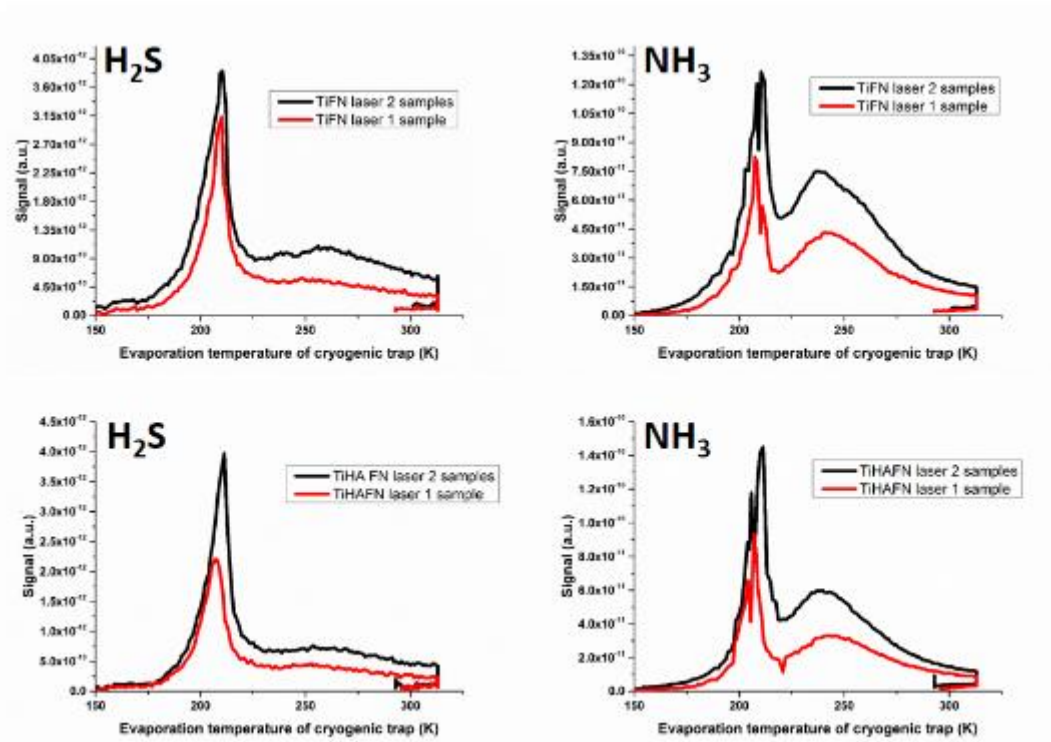


Figura 1: Profilele speciilor gazoase (H_2S - stanga si NH_3 - dreapta) inregistrate prin spectrometrie de masa in cazul FN depusa prin MAPLE: studiu comparativ, depuneri pe substarturi de Ti si respectiv Ti/HA

In Figura 2 sunt prezentate schemele montajului si respectiv a procesului C-MAPLE si se evidentiaza gradientul de compozitie, confirmat ulterior de studiile de micro-spectrofotometrie FTIR si microscopie confocala si de fluorescenta. Mentionam ca partenerii francezi in proiect, ERMECCe, Universitatea Cergy Pontoise, au efectuat experimente diferite (Figura 3): FN-polimer (PDLLA – acid polilactic) si respectiv doua proteine marcate anterior transferului laser cu verde (FN) si respectiv rosu (Human Serum Albumin –HSA).

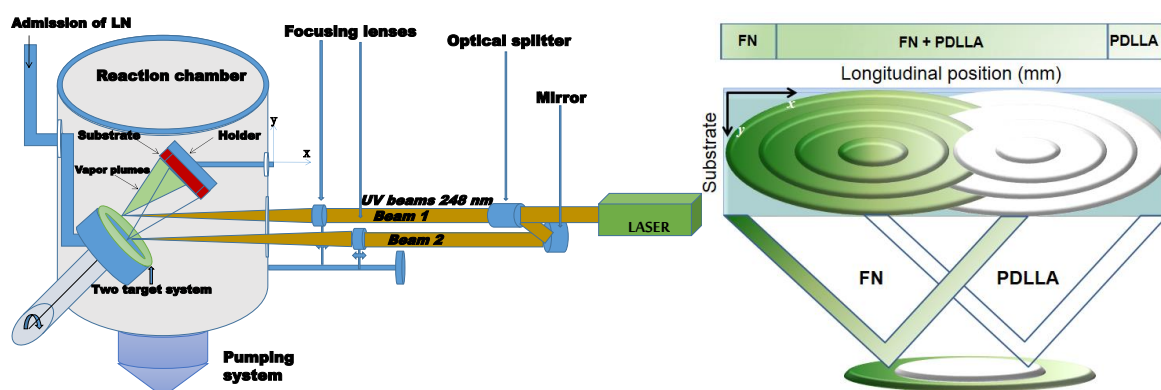


Figura 2: Schemele montajului experimental (stanga) si respectiv a procesului C-MAPLE (dreapta)

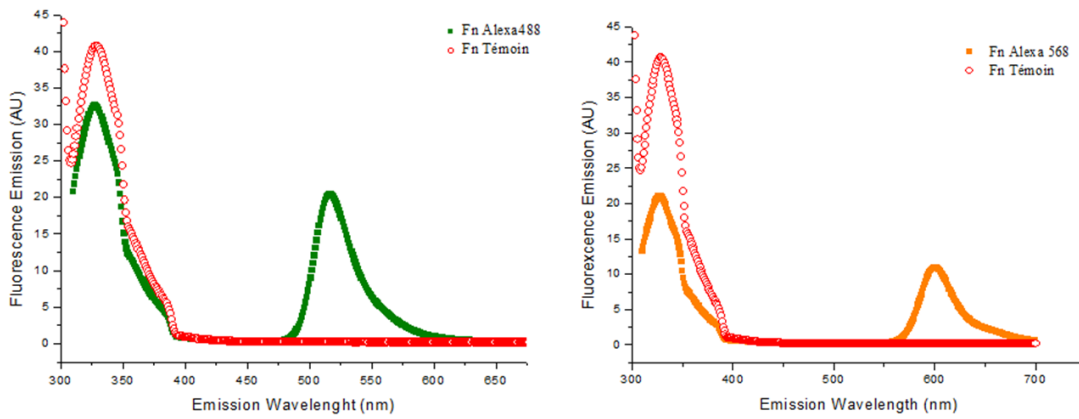


Figura 3 : Spectrele de emisie a FN marcate cu verde sau rosu anterior transferului laser

Analizele unor multi-structuri organice sunt deseori dificile si nu intotdeauna exacte. Am efectuat de aceea studii de microscopie laser confocala pentru caracterizarea complexa a straturilor compozite. Am folosit doua lungimi de unda diferite pentru a evidientia pe de o parte compusul polimeric si, pe de alta parte, proteina (FN) si respectiv, in experimente separate, FN (verde) in raport cu HSA (rosu). In acest scop, proteinele au fost marcate initial pentru a putea fi vizualizate. Imaginile prelucrate din spectrele de emisie sunt prezentate separat in Figura 4 (verde – proteina, gri – polimerul) si respectiv Figura 5 (verde-FN, rosu-HSA). Acestea reprezinta vizualizarea aceleiasi zone in doua campuri diferite de emisie luminoasa.

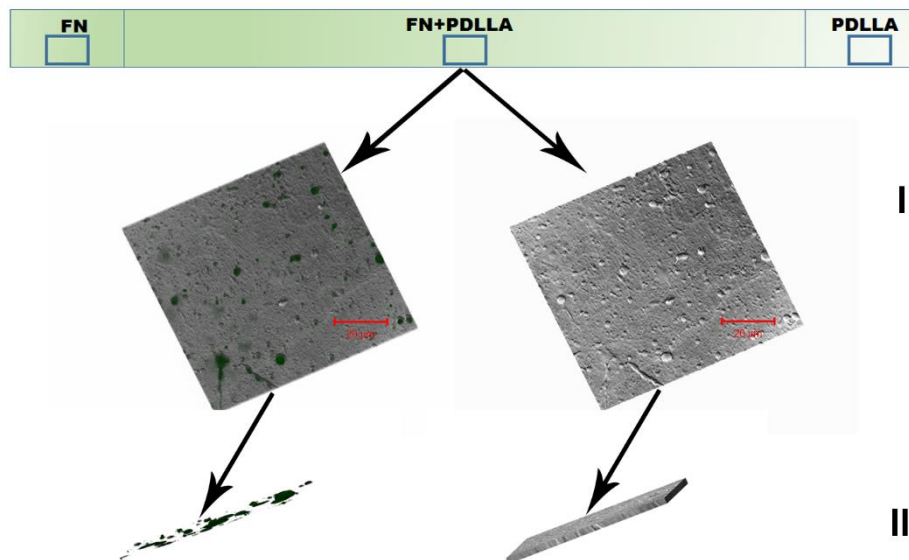


Figura 4: Schema structurilor dezvoltate prin C-MAPLE si respectiv a rezultatelor investigatiilor de microscopie confocala a unei zone centrale pentru evaluarea proteinei in matricea polimerica (FN in PDLLA)

Acoperirile cu gradient compozitional FN-HSA au fost evaluate din punct de vedere al raspunsului celular de catre partenerii francezi. Au fost utilizate celule fibroblaste si a fost testata adeziunea celulara la 5 ore dupa insamantare. Studiile de microscopie de fluorescenta au evidentiat nucleele celulare (marcate

cu DAPI – albastru), colocalizate in imaginile din Figura 6 cu FN (verde) si respectiv HSA (rosu). Nu s-a remarcat pentru acest tip de celule pentru acest interval vreun raspuns indus de gradientul celular.

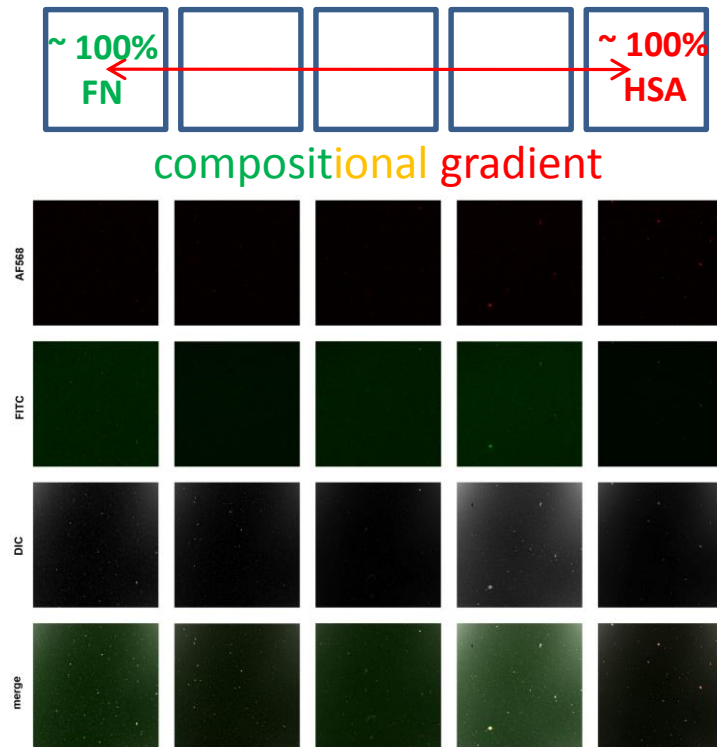


Figura 5: Schema gradientului de compozitie anticipat si respectiv rezultatele investigatiilor de microscopie confocala de fluorescanta a cinci zone pentru confirmarea transferului celor doua proteine

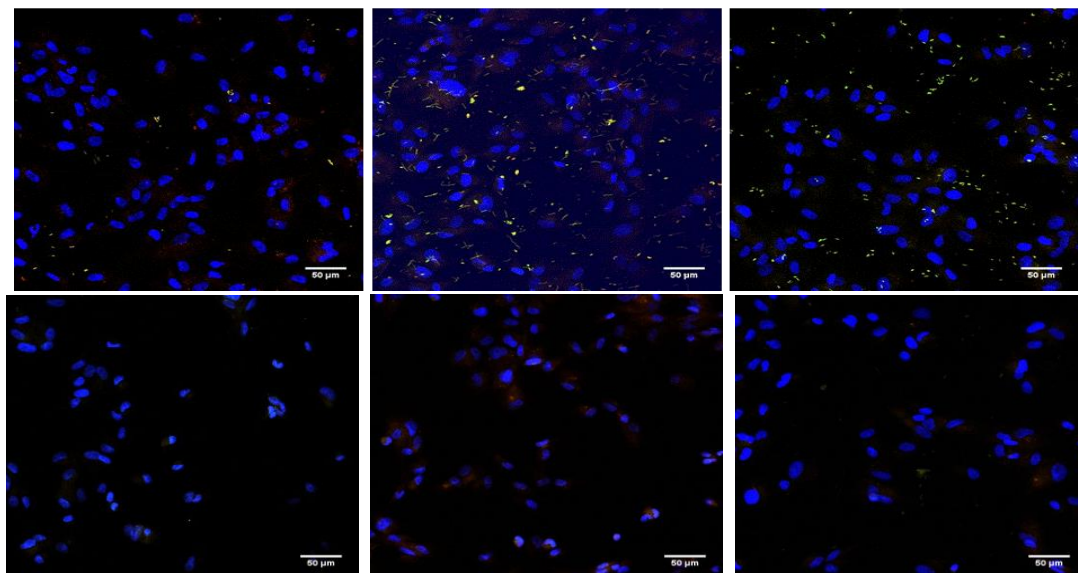


Figura 6: Imagini de microscopie de fluorescanta a nucleelor celulelor fibroblaste dupa 5 ore de crestere pe structurile de gradient compozitional FN-HSA, co-localizati cu structurile proteice (FN-verde si respectiv HSA-rosu). Au fost alese zone specifice pe substraturi de Ti (sus) si respectiv sticla (jos)

Concluzii:

In acest an am realizat dezvoltarea tehnicii de depunere laser combinatoriala (C-MAPLE) pentru fabricarea unor filme subtiri proteice. Am obtinut astfel suprafete cu gradient compozitional prin iradiere laser sincronizata si vaporizare simultana a doua tinte organice inghetate distincte. Pentru a evita degradarea termica sau chimica, am extins tehnica de evaporare laser asistata de o matrice spre obtinerea de filme subtiri polimer-proteina (acid polilactic-fibronectina) si proteina-proteina (fibronectina-albumina serica). Metoda propusa deschide posibilitatea combinarii si imobilizarii mai multor materiale organice pe substraturi solide, intr-o maniera precisa si bine controlata prin evaporare laser sub protectie. Versatilitatea metodei a permis sinteza de produse inovativi organici cu compozitie variabila prin simpla ajustare a parametrilor de depunere in functie de proprietatile termo-fizice ale compusilor utilizati. Aceste filme hibride pot fi folosite in domenii de foarte mare interes biomedical, precum controlarea proliferarii celulare sau modularea unor cai de semnalizare. Datorita posibilitatii de a monitoriza densitatea grupurilor functionale la suprafata (compozitia chimica si proprietatile fizice) si a usurintei de a sintetiza structuri multistrat, aceasta metoda poate sta la baza dezvoltarii rapide a cercetarilor si aplicatiilor din domeniul organic combinatorial.

Valorificare

A. Au fost publicate articolele **„Combinatorial Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation of a biodegradable polymer and fibronectin for protein immobilization and controlled release”** de catre F. Sima, E. Axente, I. Iordache, C. Luculescu, O. Gallet, K. Anselme, I.N. Mihailescu, Applied Surface Science 306, 75–79; 2014;

- **„Surface melting and thermal ablation patterns induced in enamel and cementul by 10.6 μm TEA CO₂ laser radiation II. Theoretical models for radiation-enamel interactions”** de catre E. A. Preoteasa, I. N. Mihailescu E. S. Preoteasa in Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, Vol. 9, No. 3, p. 1021 – 1037; 2014.

B. Au fost transmise spre publicare manuscrisele **„Biomimetic inorganic–organic thin implant coatings deposited by lasers”** de catre Felix Sima, P. Davidson, Joseph Dentzer, Roger Gadiou, Emmanuel Pauthe, Olivier Gallet, Karine Anselme, Ion N. Mihailescu, Applied Materials and Interfaces, Noiembrie 2014;

- si **„Strontium and Zoledronate Hydroxyapatites Graded Composite Coatings for Bone Prostheses”** de catre Elisa Boanini, Paola Torricelli, Felix Sima, Emanuel Axente, Milena Fini, Ion N. Mihailescu, Adriana Bigi, Applied Materials and Interfaces, Octombrie 2014;

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

- **“Organic and/or inorganic nanostructured layers for applications in biocide, drug delivery, biomimetic or biosensing coatings”**, Ion N. Mihailescu, Carmen Ristoscu, Invited lecture at 12th IUVSTA School on Lasers in Materials Science (SLIMS), Laser Engineering of Surfaces and Coatings, Isola di San Servolo, Venice, Italy, 13th-20th July 2014;

- **“Soft laser transfer of organic / inorganic composites for biocide, drug delivery, biomimetic or biosensing applications”**, I. N. Mihailescu, C. Ristoscu, F. Sima, Oral presentation (We-O-12) at ICPEPA 2014, Matsue, Japan, September 30 – October 3, 2014;

- ***“The basics of laser ablation mechanisms: the etching effect and related processes. Applications in biology and medicine”***, Ion N. Mihailescu, Carmen Ristoscu, Invited lecture at “Lasers in Medicine and Life Sciences (LAMELIS) 2014”, Advanced Summer School for Students in Medicine and Physics, Szeged, Hungary, July 14 – 25, 2014;

- ***“Nanostructures by soft pulsed laser techniques for applications in drug delivery, biomimetism or biosensing”***, Ion N. Mihailescu, Carmen Ristoscu, Irina Negut, Invited lecture (I.09) at 5th International Student Conference on Photonics, Orastie, Hunedoara, Romania, September 22-26, 2014

D. S-a participat cu lucrari poster la:

- Conferinta Internationala „International Conference on Photo-Excited Process and Applications – ICPEPA9” in perioada 29.09-3.10.2014, de la Matsue, Japonia, ***„Clean laser transfer of fibronectin: protein quantification and embedding in polymeric matrix”*** de catre *F. Sima, E. Axente, J. Dentzer, R. Gadiou, K. Anselme, O. Gallet, I.N. Mihailescu.*

- E-MRS, Lille, France, 27-29 May 2014, Symposium J, JP33. VIII, ***“Hydroxyapatite thin films obtained by PLD and MAPLE: comparative study of physical, chemical and biological properties”*** de *G. Popescu-Pelin, F. Sima, G. Socol, M. Socol, C. N. Mihailescu, A. Visan, C. Ristoscu, O. Gallet, K. Anselme, I. N. Mihailescu a fost prezentat la conferinta*

E. La experimente si prelucrarea datelor au participat studenti masteranzi si doctoranzi de la Facultatea de Fizica a Universitatii Bucuresti, dar si studenti de la Institutul Universitar Tehnologic din Marsilia si de la Universitatea din Lille, Franta, aflati in stagiu in Laboratorul „Interactiuni Laseri-Suprafta-Plasma” din Departamentul Laseri al INFLPR.

Pe baza acestei expuneri de motive apreciem ca obiectivele propuse in cadrul acestui contract pentru anul 2014 au fost indeplinite.

Director proiect,
Prof. Dr. Ion N. Mihailescu
