

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 2015

Studiile noastre s-au concentrat in aceasta etapa asupra consolidarii aranjamentului experimental al noii tehnologii laser de depunere combinatoriala ce a fost recent implementata in laboratorul nostru 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 matriceala (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 precursora 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.

Au fost efectuate teste biologice *in vitro* pe structuri de Ti/HA si respectiv Ti/HA/FN obtinute prin tehnologiile laser descrise mai sus si functionalizate cu diferite cantitati de BMP7 (Bone morphogenic factor) pentru a afla concentratia (doza) optima a unui amestec FN-BMP capabila sa induca un raspuns osteogenic. In aceste studii s-au folosit doua linii celulare de celule mezenchimale pluripotente (C2C12, osteoprogenitoare umane), sensibile la doze mici de BMP, si care au capacitatea de a se diferentia in celule osoase. Aceasta diferentiere 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, **fosfatasa 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 tesutului osos si cartilajinos. Primele teste s-au concentrat pe identificarea cantitatii de BMP in solutie necesare inducerii unor expresii ale genelor pe termen lung. S-a demonstrat ca BMP7 este bioactiv, iar 500 ng este o cantitate suficienta pentru activarea genelor mentionate (Figura 1).

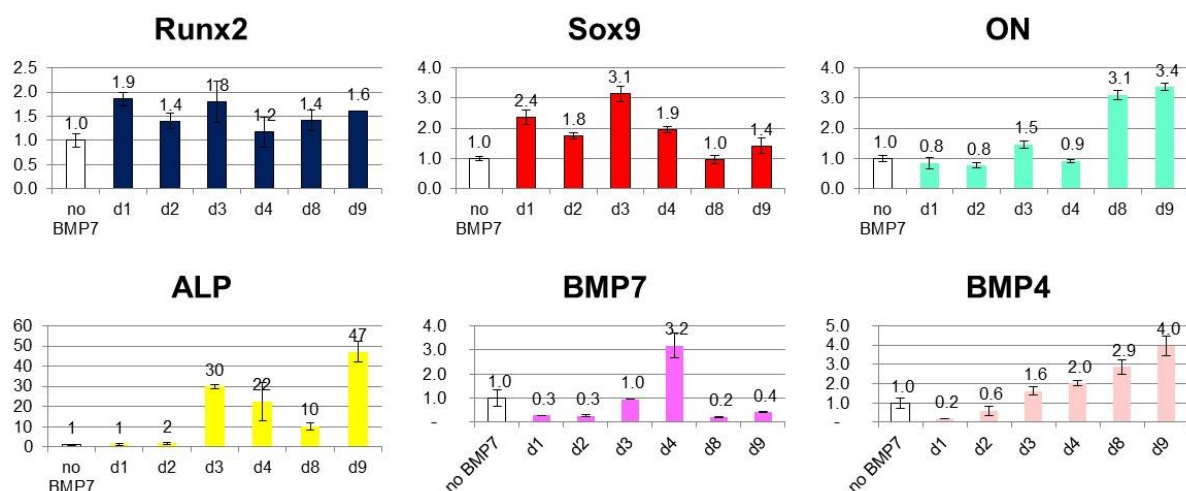


Figura 1 : Teste de bioactivitate si expresie genetica celulara (C2C12) a solutiilor de BMP7

Studiile *in vitro* au continuat cu adsorbția unor cantități de BMP7 pe probe fabricate cu laser. S-au identificat cantități optime de adsorbție pe suporturi de Ti/HA și respectiv Ti/HA/FN. 20 μg/ml BMP7 au indus un răspuns osteogenic crescut (Figura 2). Această cantitate a fost corelată cu cea de FN de la care s-a plecat în transferul laser, și anume 0.3 mg/ml. Astfel, un amestec FN-BMP, în raport de 0.3 mg/ml / 20 μg/ml a fost propus ca soluție de plecare pentru experimentele de transfer laser combinatorial în gradient.

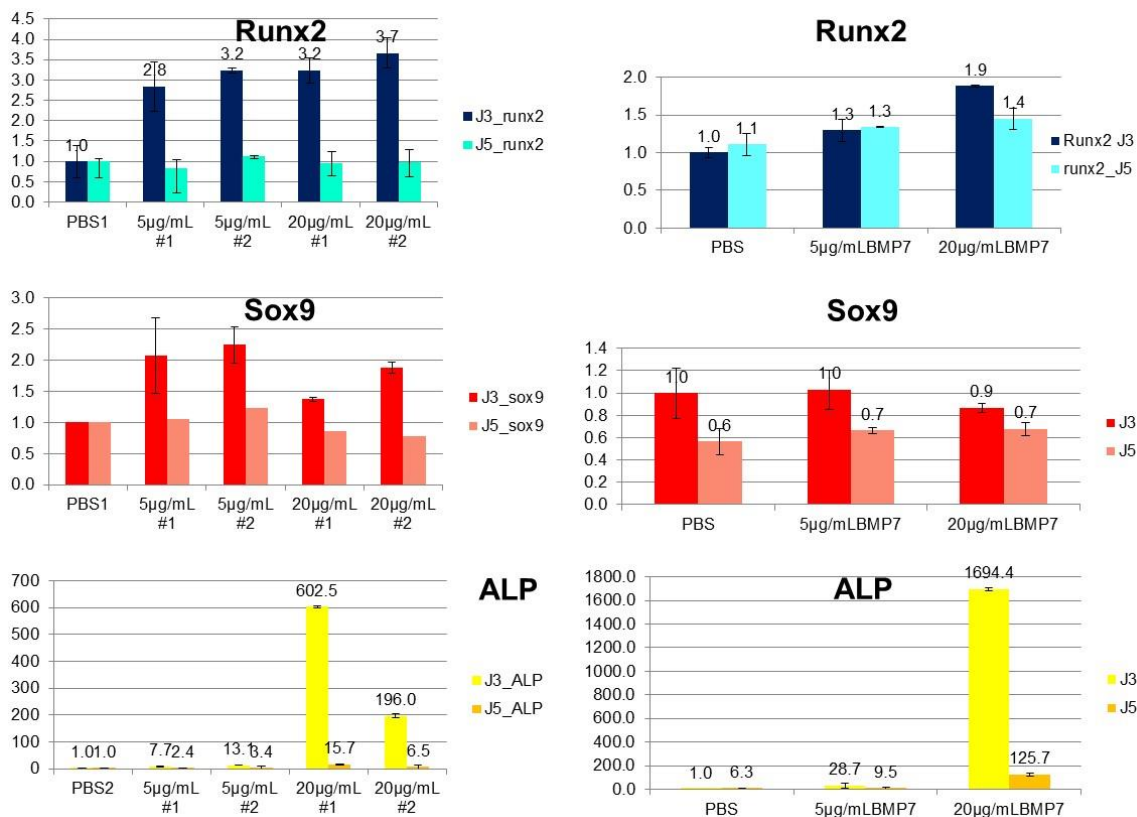


Figura 2 : Teste de bioactivitate și expresie genetică celulară pe structuri Ti/HA și respectiv Ti/HA/FN după adsorbție de BMP7

Am reușit apoi, în această etapă, acoperirea unei structuri Ti/HA cu un film subțire hibrid de proteine, FN și un factor de creștere (BMP 2 și respectiv BMP 7) având un gradient compozițional cu un potențial superior de adeziune la tesuturile osoase și respectiv osteogeneza.

Transferul și acoperirea suporturilor prin structuri FN/BMP sintetizate în gradient au fost optimizate prin teste de distribuție de transfer laser și apoi unor caracterizări morfologice și de compoziționale și respectiv imunomarcaj cu anticorpi policlonali.

În Figura 3 prezentăm schematic montajul experimental de distribuție laser unghiulară, o fotografie din timpul experimentului și respectiv imobilizarea amestecului proteic FN-BMP pe un suport de nitroceluloză.

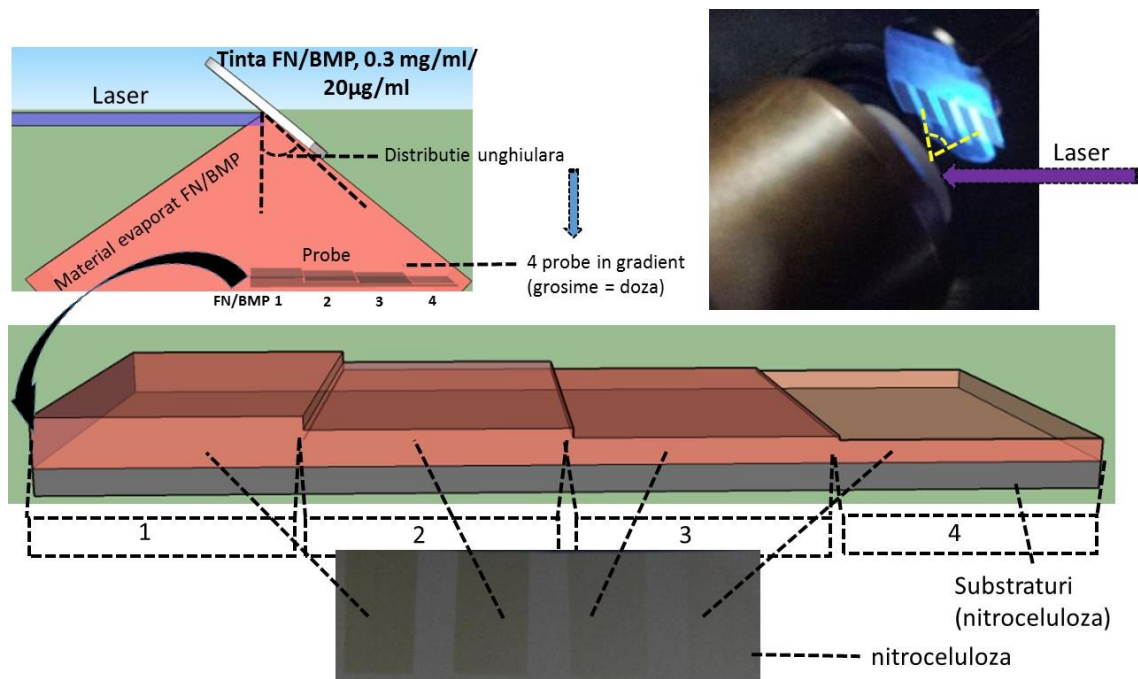


Figura 3 : Montaj experimental de distributie laser unghiulara (sus-stanga) ; fotografie in camera de reactie a transferului laser de amestec protein FN/BMP pe support de nitroceluloza (sus-dreapta) si respectiv fotografie a acoperirii proteice in gradient pe nitroceluloza (jos)

In mod concret, am plecat de la un amestec de FN si BMP in cantitatile (doze) optimizate de parteneri francezi de la IS2M, Mulhouse si respectiv ERMECCE, Cergy. Acest amestec constand din 0.3 mg/ml FN si 20 µg/ml BMP (2 sau 7) a fost inghetat in azot lichid iar tinta criogenica formata a fost iradiata cu un laser pulsant cu excimer. S-au folosit ca si colectori 4 substraturi de Ti acoperiti cu HA sau hartie de nitroceluloza impartita in 4 arii pentru identificarea zonelor de interes. Suportii au fost positionati astfel incat primul (FN-BMP 1) sa se afle in zona de depunere cea mai abundenta (centrat pe material evaporat) iar ceilalti (FN-BMP 2, 3, 4) sa colecteze material in gradient de grosime, precum in fotografia din Figura 3. Astfel, se pot crea intr-un singur experiment diferite doze de material FN-BMP care vor fi testate din punct de vedere biologic.

Pentru identificarea dupa depunere a proteinei mai abundente in amestec (in cazul nostru FN), hartia de nitroceluloza a fost dezvoltata cu solutie Ponceau Rosu printr-o metoda simpla de coloratie. Substraturile de Ti/HA au fost supuse testelor de imunomarcaj cu anticorpi policlonali iar solutiile lichide recuperate din tintele supuse iradierilor laser au fost analizate prin spectroscopie in infrarosu cu transformata Fourier (FTIR). Prezentam in Figura 4 stanga, o fotografie a nitrocelulozei colectoare de proteina dupa transferul laser si dezvoltata cu Ponceau Rosu. In Figura 4 dreapta prezentam imagini de microscopie de fluorescenta ale suportilor de Ti/HA acoperiti cu amestec proteic cu ajutorul laserului. Aceste imagini sunt realizate dupa procedura de imunomarcaj cu anticorpi polilonali pentru evidentierea conformatiei biologice a proteinelor transferate cu laserul. Mentionam ca pentru gasirea parametrilor optimi de marcaj a cantitatilor foarte reduse de proteina au fost necesare multe studii de optimizare. Un avantaj incontestabil a fost reprezentat de faptul ca am putut face aceste analize in laboratorul nostru, fara o potentiala alterare cauzata de transport, cu microscopul de fluorescenta achizitionat in cadrul acestui contract.

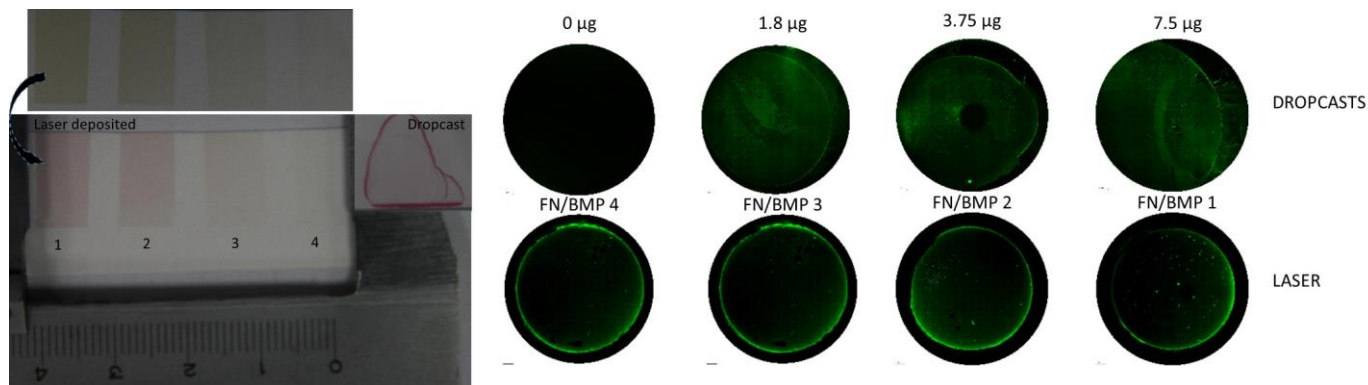


Figura 4 : Fotografii ale acoperirilor proteice in gradient pe nitroceluloza inainte si dupa dezvoltare cu Ponceau Rosu (stanga) ; Imagini de microscopie de fluorescanta ale proteinelor transferate in gradient pe suportii de Ti/HA dupa imunomarcaj

Pragul minim de sensibilitate a hartiei de nitroceluloza este de 250 ng proteina. Putem astfel evalua grosier cantitatile transferate pe nitroceluloza ca fiind superioare acestei limite chiar si pentru proba 4 (Figura 4 - stanga) pozitionata la extremitate fata de centrul depunerii. In ceea ce priveste cantitatile depuse pe Ti/HA, presupunem ca acestea sunt similare celor transferate pe nitroceluloza. Mentionam ca protocolul de imunomarcaj implica spalari si manipulari in mediu lichid iar rezultatul analizei finale prin vizualizare in fluorescanta este afectat prin desprinderea unor cantitati proteice din straturile superficiale. Notam ca dupa aceasta procedura inca se mai pot observa cantitati insemnate de proteina transferata cu laserul (randul de jos in Figura 4 – dreapta). Cantitatile ramase imobilizate pe suportii sunt semnificative dar sub nivelul de 1.8 µg detectate in cazul solutiilor dropcast (randul de sus in Figura 4 – dreapta).

O cuantificare exacta a proteinelor transferate se va face la IS2M in lunile urmatoare prin tehnica dezvoltata in acest proiect si descrisa in etapa 1. Metoda consta in degradarea ireversibila si totala a structurilor proteice la temperaturi inalte (pana la 600 °C). Specii gazoase formate precum H₂S sau NH₃ vor fi adsorbite pe o capcana de azot lichid prin condensare. Incalzirea lenta si controlata a acestora va permite desorbitia pe intervale scurte de temperatura a speciilor gazoase si apoi cuantificarea exacta a prin spectrometrie de masa. Acest lucru va permite evaluarea corecta a unor cantitati foarte reduse de proteina de ordinul µg si ng.

In continuare au fost analizate solutiile lichide provenite din tintele inghetate supuse iradierii. Motivul a fost evaluarea unei potentiale degradari a proteinelor in timpul iradierii laser. In acest scop, au fost efectuate mai multe experimente de transfer laser pentru a verifica reproductibilitate in cazul amestecurilor FN-BMP2 si respectiv FN-BMP7. Spectrele FTIR ale acestor solutii au fost comparate cu spectrele unor solutii neiradiate pentru a observa eventuale modificari compositionale (Figura 5).

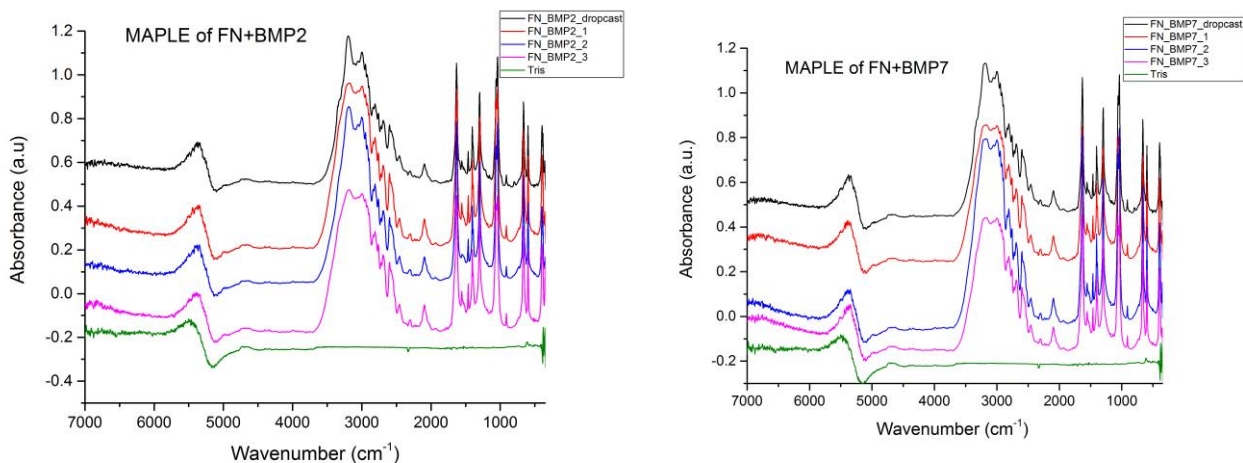


Figura 5 : Spectrele FTIR ale solutiilor FN/BMP2 (stanga) si respectiv FN/BMP7 (dreapta) iradiate cu laserul (1, 2, 3) si respectiv ale solutiilor neiradiate (dropcast)

Toate benzile de absorbtie atribuite structurilor proteice au fost regasite in spectrele amestecurilor FN-BMP2 si respectiv FN-BMP7. Nu a fost observata nicio modificare a spectrului obtinut in cazul solutiilor iradiate fata de solutii neiradiate, confirmand ca iradierea unor solutii inghetate ce contin structuri proteice nu afecteaza structura acestora.

Structurile obtinute in gradient au fost transferate partenerilor francezi pentru evaluare biochimica si biologica *in vitro*, 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 ultimul an de contract 2016.

Concluzii:

In aceasta etapa s-a reusit optimizarea din punct de vedere biologic a dozelor amestecurilor proteice folosite in solutiile de plecare pentru transferul laser. Am reusit acoperirea prin tehnicile laser propuse a structurilor Ti/HA cu un acoperiri hibride de proteine, FN/BMP, cu gradient compozitional. Hartia de nitroceluloza ne-a permis o evaluare calitativa si grosier cantitativa a materialului transferat. Studii de imunomarcaj cu anticorpi policlonali au demonstrat conservarea conformatiei biologice a proteinelor dupa transfer. Nu a fost gasita nicio modificare a spectrelor de absorbtie FTIR in cazul solutiilor iradiate fata de cele neiradiate, confirmand ca transferul laser nu afecteaza structura proteinelor. Aceste studii ne vor permite sa alegem cele mai bune structuri pentru testele *in vivo* in ultimul an de contract 2016.

Valorificare

A. S-au publicat articolele:

1. F. Sima, P. Davidson, J. Dentzer, R. Gadiou, E. Pauthe, O. Gallet, I.N. Mihailescu, K. Anselme, *Inorganic-organic thin implant coating deposited by lasers*, ACS Appl. Mater. Interfaces, 7, 911–920, (2015)

2. E. Boanini, P. Torricelli, F. Sima, E. Axente, M. Fini, I. N. Mihailescu, A. Bigi, *Strontium and Zoledronate Hydroxyapatites Graded Composite Coatings for Bone Prostheses*, *Journal of Colloid and Interface Science* 448 (2015) p. 1-7

3. E. Boanini, P. Torricelli, L. Forte, S. Pagani, N. Mihailescu, C. Ristoscu, I. N. Mihailescu, A. Bigi, *Antiresorption implant coatings based on calcium alendronate and octacalcium phosphate deposited by matrix assisted pulsed laser evaporation*, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 136 (2015), 449-456

4. Natalia Mihailescu, G.E. Stan, L. Duta, Mariana Carmen Chifiriuc, Coralia 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

5. E. A. PREOTEASA, I. N. MIHAILESCU, E. S. PREOTEASA, *SURFACE MELTING AND THERMAL ABLATION PATTERNS INDUCED IN ENAMEL AND CEMENTUM BY 10.6- μ m TEA-CO₂ LASER RADIATION. III. THEORETICAL MODELS FOR PLASMA AND SURFACE WAVES EFFECTS*, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, 10(4) (2015) 1161 - 1180

B. Au fost transmise spre publicare:

1. Emanuel AXENTE, Felix SIMA, Carmen RISTOSCU, Natalia MIHAILESCU, Ion N. MIHAILESCU, *“Biopolymer thin films synthesized by advanced pulsed laser techniques”*, Chapter in *“Recent Advances in Biopolymers”*, INTECH, Ed. Farzana Parveen, ISBN 978-953-51-4613-1

2. I. N. Mihailescu, C. Ristoscu, S. Grigorescu, E. Axente, G. Socol, *“Soft laser light as tweezers for protected transfer of organic/biological objects”*, *Proceedings of FIAT Lux Conference, Rome June 3-5, 2015*, Nova Science Publishers, Inc.

3. F. Sima, E. Axente, C. Ristoscu, O. Gallet, K. Anselme, I.N. Mihailescu, *“Bioresponsive surfaces and interfaces fabricated by innovative laser approaches”*, *Advanced Materials Series published by WILEY-Scrivener, USA, Series Editor Professor Ashutosh Tiwari*

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

- Ion N. Mihailescu and Carmen Ristoscu, *“New results with pulsed laser technologies for transfer of organic and biological substances: applications in biomedicine”*, *Invited lecture (LM-I-20) at Conference on Advanced Laser Technologies ALT 2015, September 7 – 11, 2015, Faro, Portugal*

- I. N. Mihailescu, C. Ristoscu, *“Soft laser light as tweezers for protected transfer of organic/biological objects”*, *Invited lecture at FIAT LUX Conference, Rome 3-5 June 2015*

- Ion N. Mihailescu, Carmen Ristoscu, Gabriela Dorcioman, *“Soft laser transfer of organic and inorganic materials for biomedical applications”*, *Invited lecture at PROGRESSIVE BIOMEDICAL MATERIALS AND TECHNOLOGIES 2015, October 9th-10th, 2015, CTU Faculty of Biomedical Engineering, Klado, Czech Republic*

- Ion N. Mihailescu and Carmen Ristoscu, *“Soft nano-pulsed laser methods for protected transfer of delicate biomaterials to substrates of interest for biomedical applications”*, *Invited Lecture at “Light in Nanoscience and Nanotechnology” Conference, October 19 – 22, 2015, Hissar, Bulgaria*

- I. N. Mihailescu, C. Ristoscu, G. Socol, G.E. Stan, L. Duta, I. Negut, A. Visan, "Smart technology for soft pulsed laser transfer of organic and biological compound", Invited lecture at "Smart Engineering of New Materials" SENM 2015, June 22-25, 2015, Lodz, Poland

- I. N. Mihailescu, C. Ristoscu, F. Sima, "Soft pulsed laser technologies for transfer of organic materials", Invited lecture (I-08) at 13th International Conference on Laser Ablation (COLA 2015), August 31 – September 4, 2015, Cairns, Australia

Pe baza acestei expuneri de motive apreciem ca obiectivele propuse in cadrul acestui contract pentru anul 2015 au fost indeplinite.

Director proiect,
Prof. Dr. Ion N. Mihailescu
