

**UNIVERSITATEA DE STIINTE AGRICOLE SI
MEDICINA VETERINARA
CLUJ-NAPOCA**

Sinteza lucrarii

**CARACTERUL
ANTIBACTERIAN SI STIMULATOR
AL REGENERARII TESTURILOR
AL BIOMATERIALELOR FOSFATICE**

Proiect ID 2528

Anul de raportare 2009

Conf. Dr. Razvan Stefan

Introducere

Biomaterialele sunt impartite dupa compozitie si clasa chimica in trei grupe principale si una derivata care se obtine prin combinatia primelor trei si anume: metale si aliaje (ex. titan si aliaje din titan, otel, aliaje cobalt crom), sticle, vitroceramici si ceramici si respectiv polimeri (ex. silicon, poliuretan) si materiale compozite (ex. polimeri care contin ceramici).

Structurile vitroase pe baza de argint au fost studiate in ultimii ani datorita proprietatilor antibacteriene [1, 2] pe care le manifesta in medii lichide si solide. Acest tip de materiale oxidice este necesar la contactul dintre materialul anorganic si tesutul viu si previne sau combate infectiile. Necesitate combaterii imfectiilor a aparut odata cu primele implanturi alaturi de primele metode de [3] sterilizare. Caracterul bactericid si bacteriostatic a fost demonstrat [4] pentru sisteme care contini principalul formator de retea vitroas (B_2O_3) dopate cu pana la 4 % mol Ag_2O , dar si pentru sticle care se bazeaza pe oxidul de fosfor [5].

Sticlele fosfatice dopate cu oxid de cupru au fost investigate in culturi de bacterii, masurandu-se cantitatea de ioni de cupru eliberata din fibrele de sticla, folosind ion cromatografia si s-a demonstrat ca exista o descrestere in numarul stafilococilor viabili in mediul in care a fost imersata sticla fosfatica cuprica, iar sticlele pe baza de fosfor dopate cu zinc si fier au un potential modulator al reactiei tesutului gazda.

Sticle care contin P_2O_5 sau B_2O_3 dopate sau fara argint in structura sunt utilizat pentru regenerarea tesuturilor osoase [6] prin doua metode:

1. Cresterea celulara pe suporti vitrosi

Metoda constructiei tesuturilor in vivo [7], care presupune cresterea celulelor in afara corpului, uman sau animal in matrici bioresorbabile. Tesuturile obtinute sunt implantate apoi in corp avand aplicatii clinice directe (reparatia cartilajelor, pieii, sistemului vascular). Schelaria pe care se construiesc tesutul trebuie sa fie macroporoasa pentru a permite circulatia sangelui si a principiilor alimentari si sa fie un ghid de crestere si sa fie bioactiva si multi suportii sunt realizati din sturcturi vitroase [7, 8] si vitroceramice alaturi de ceramicile macroporoase, polimeri, spumele sau sticla, in diverse combinatii compozitionale.

Un aspect care a condus la ideea diferentierii modurilor de regenerare a fost dezvoltarea materialelor resorbabile, fire pentru sutura, unde locul materialului sintetic este luat de tesutul nou. Initial problema utilizarii era restransa de imposibilitate sincronizarii vitezei de resorbabilitate si vitezei de crestere si inlocuire a suturii cu tesut organic. In cazul implanturilor temporae acest lucru poate fi exploatat prin degradarea acestuia in timp si evitarea interventiei chirurgicale.

2. Cresterea celulara in situ

Apoi a fost introdusa ideea stimulării simultane, adica biomaterialul elimina ioni prin solutie, care stimuleaza celulele se prolifereze [7] concomitent cu disparitia acestuia din organism. Este util deasemena ca ionii eliberati sa aiba si un efect antibacterian [8] Regenerarea tesuturilor se realizeaza practic prin stimularea cresterii celulare pe o matrice si apoi implantul celulelor respective in tesutul distrus.

Totodata s-a demonstrat ca stimularea osteogenezei este realizate de compusii eliberati in lichidele interstitiale prin control genetic.[9]

In lucrarea de fata au fost preparate compusi oxidici din sitemul $k Ag_2O (10-k) \% [x B_2O_3 yCaO z P_2O_5]$ pentru $0.1 \leq k \leq 5$ mol %. S-au format sticle omogene pana la 2 mol% Ag_2O in matrie borofosfatica cu efect bactericid si bacteriosttic.

Rezultate si discutii

1. Sintetizarea compusilor $1.5\text{Ag}_2\text{O} \cdot 98.5\% [0.47 \text{B}_2\text{O}_3 \cdot x \text{CaO} \cdot (0.57-x) \text{P}_2\text{O}_5]$

1.1. Prepararea si topirea probelor

Compusii care contin argint se obtin foarte greu datorita faptului ca argintul "fuge" prin topitura si in timp s-au incercat diferite metode de obtinere de la metoda schimbului ionic pana la metoda subracirii.

Probele au fost preparate folosind copusi puri pentru analiza H_3BO_3 , Ag_2O , P_2O_5 , CaCO_3 , in rapoarte potrivite. Mixturile au fost topite in aer la temperatura potrivita pentru compozitiile date la $1500\text{ }^\circ\text{C}$ in creuzete de alumina timpuri diferite intre 5 si 15 minute intr-un cuptor electric. Topiturile au fost subracite la temperatura camerei prin presare intre placute de inox. Au fost preparate seturi de probe incepand de la la

Probele au fost subracite de la temperatura de topire (aprox $1200\text{-}1350$) in functie de copozitia preparata prin turnare in forme de inox aflate la temperatura camerei si presare prelungita cu placute de inox pentru a le aduce cat mai repede la temperatura dorita .

Sistemele cantarite, omogenizate si topite au fost:

- $5\% \text{Ag}_2\text{O} \cdot 95\% [x\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 0.3\text{CaO} \cdot (0.7-x)\text{P}_2\text{O}_5]$ cu $x=0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.7$ topita la temperaturi de $1200\text{ }^\circ\text{C}$
- $2\% \text{Ag}_2\text{O} \cdot 98\% [x\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 0.3\text{CaO} \cdot (0.7-x)\text{P}_2\text{O}_5]$ cu $x=0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.7$ topite la temperaturi de 1200 ° si $1300\text{ }^\circ\text{C}$.
- $1\% \text{Ag}_2\text{O} \cdot 99\% [x\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 0.3\text{CaO} \cdot (0.7-x)\text{P}_2\text{O}_5]$ cu $x=0; 0.1; 0.2; 0.3; 0.4; 0.5; 0.6; 0.7$ topite la temperaturi de $1200\text{ }^\circ\text{C}$, $1250\text{ }^\circ\text{C}$ si $1300\text{ }^\circ\text{C}$.
- $2\% \text{Ag}_2\text{O} \cdot 98\% [x\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 0.3\text{CaO} \cdot (0.8-x)\text{P}_2\text{O}_5]$ cu $x=0; 0.1; 0.6; 0.7; 0.8$ topite la temperaturi de $1200\text{ }^\circ\text{C}$, $1250\text{ }^\circ\text{C}$ si $1300\text{ }^\circ\text{C}$.
- $2\% \text{Ag}_2\text{O} \cdot 98\% [x\text{B}_2\text{O}_3 \cdot 0.3\text{CaO} \cdot (0.95-x)\text{P}_2\text{O}_5]$ cu $x=0; 0.1; 0.2; 0.6; 0.7$ topite la temperaturi de $1200\text{ }^\circ\text{C}$, $1250\text{ }^\circ\text{C}$ si $1300\text{ }^\circ\text{C}$.

Pentru niciunul din sistemele de mai sus nu s-au obtinut structuri vitroase, omogene care sa poata utilizate ulterior ca pudre si analizate structural in consecinta.

1.2. Testarea prin XRD a caracterului vitros

Testarea caracterului vitros a fost facuta prin difractie de raze X. Pentru realizarea difratogramelor a fost utilizat un difractometru XRD 6000 Shimadzu cu radiatie $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda=1.54\text{ \AA}$) la temperatura camerei. Difratogramele obtinute pentru sistemul $1.5\text{Ag}_2\text{O} \cdot 98.5\% [0.47 \text{B}_2\text{O}_3 \cdot (57-x)\text{CaO} \cdot x\text{P}_2\text{O}_5]$ pentru cinci concentratii ale lui x nu releva aparitia vreunei faze cristaline. Semnalul este larg ceea ce denota faza existenta fazei amorfe in tot domeniul de compozitii investigat. Probele obtinute au fost notate cu cifre de la 1 la 5 dupa cresterea continutului molar de P_2O_5 .

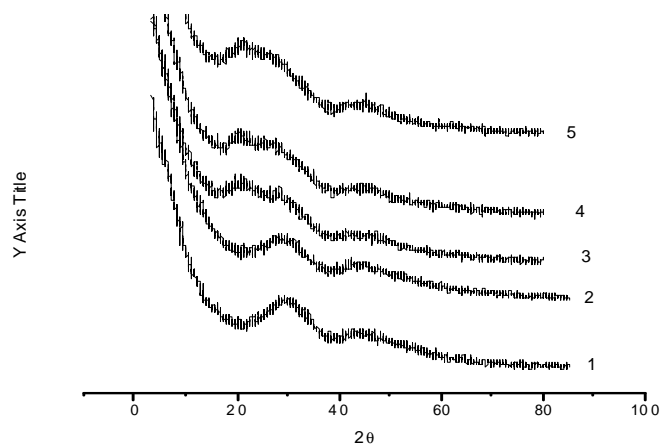


Fig 1 Difractogramele sistemului vitros $1.5Ag_2O\ 98.5\ \%[0.47\ B_2O_3\ (57-x)CaO\ xP_2O_5]$

1.3 Obținerea corelației atomice

Prin analiza difractogramelor obținute se observa ca pentru probele 1 și 2 care nu conțin fosfor în prima sferă de coordonare se găsesc aceiași atomi. Odată cu creșterea conținutului de P_2O_5 în matricea oxidică pe lângă peakul de la $2\theta = 30^\circ$ și cel de la 47° apare un peak nou la $2\theta = 20^\circ$ ceea ce indică modificări de configurație în apropierea atomului investigat și din punct de vedere al analizei structurale ne așteptăm la posibile schimbări la interacțiunea cu lihidele biologice, cu țesuturile regenerabile și cu populațiile de bacterii.

2.2 Obținerea vitroceramicilor

Vitroceramica este un solid policristalin care se prepară din structura vitroasă obținută în prealabil prin subracirea unei topituri, numită și fază parentală. Convertirea sticlei oxidice în vitroceramica se realizează deoarece se obține un compus cu aceeași compoziție chimică, dar cu proprietăți chimice total diferite (durabilitate chimică, porozitate, rezistență la tensiune) care pot fi utile în aplicații medical-veterinare. Pentru aflarea temperaturii termice de tratament se utilizează analiza termică diferențială (DTA) sau difracția de raze X (XRD) sau microscopia electronică (SEM) pentru a vizualiza la ce temperatură s-au format microcristalitele

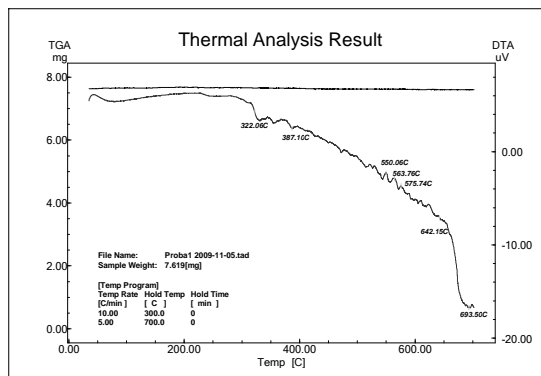


Fig . 2 DTA al probei 3 din sistemul investigat

Comportamentul termic al sistemelor preparate a fost investigat utilizand un analizor termic TG/DTA (Fig. 2). Pudrele vitroase (10 mg) au fost introduse in creuzete de alumina si incalzite cu o rata de 10 °C/min. Curbele obtinute au folosite pentru determinarea temperaturii de tratament necesara inducerii cristalizarii in sticla oxidica pe baza de bor continand ioni de argint. Totodata au fost inregistrati si principiile parametrilor termici vitrosi, temperatura de tranzitie vitroasa (Tg), temperatura de cristalizare si respectiv temperatura de topire (Tm).

A 2.1. Tratarea termica intr-un singur pas -timpuri diferite

S-a realizat tratamentul termic intr-un singur pas al unui pudrelor si plachete vitroase, adica prin aducerea sistemului direct la temperatura dorita de tratament termic si in doi pasi acesta din urma presupunand o faza intermediara in care in sistem se realizeaza o relaxare structurala prealabila. Dupa primul pas de tratament in sistem nu apar insule cristaline, ci doar dispar tensiunile din structura aparute ca urmare a unei rate foarte ridicate de racire.

A 2.2. Obtinerea fazelor cristaline care apar la tratament

S-a obtinut prin metoda difractiei de raze X faza cristalina majoritara $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}]$ care apare in urma tratamentului termic intr-un singur pas asa cum se poate observa (Fig. 3). Incepand cu proba 3 (aproximativ 5 mol % P_2O_5) se poate vedea ca difractogramele se modifica fundamental, la anumite unghiuri aparand peakuri foarte ascutite. Numarul acestora creste cu cresterea continutului molar de P_2O_5 in probe si aceasta e

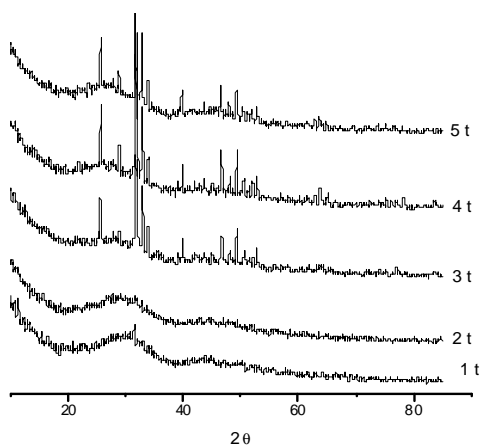


Fig 3 Difractogramele sistemului $1.5\text{Ag}_2\text{O} 98.5\% [0.47 \text{B}_2\text{O}_3 (57-x)\text{CaOxP}_2\text{O}_5]$ trata termic

In urma tratamentului termic la 650 °C primele isi pastreaza caracterul vitros iar ultimele trei au fost convertite la vitroceramici.

2.3. Prelucrarea sub forma de microsferice a materialelor

Utilizarea biomaterialelor este legata de modul in care aceste sunt obtinute. Pudrele pot fi utilizate ca depozite pentru substante active. Structurile poroase sunt utilizate ca schelet pentru cresterea celulara in

reconstituirea tesuturilor. Bucata turnata poate fi utilizata oentru inlocuirea structurilor de rezistenta ale organismului.

Am preparat sub forma de microsferice sticlelor obtinute in sistemul $1.5\text{Ag}_2\text{O} 98.5\% [0.47 \text{B}_2\text{O}_3 (57-x)\text{CaO} x\text{P}_2\text{O}_5]$ pentru ca acesata forma sa se poate folosi pentru introducerea in articulatii pentru stimularea regenerarii directe a tesutului osos.

Totodata microsfericele vitrose sunt folosite pe larg in tratarea cancerului hepatic, adica acolo unde nu se pot face interventii chirurgicale majore.

Microsfericele obtinute au caracteristicile uzuale (dimensiuni, forma) microsfericelor folosite in medicina si au fost obtinute prin metoda caderii libere intr-un camp termic si remodelarea termica a acestora.

3 Efectul antibacterian al sistemului $1.5\text{Ag}_2\text{O} 98.5\% [0.47 \text{B}_2\text{O}_3 (57-x)\text{CaO} x\text{P}_2\text{O}_5]$

Am testat actiunea compusilor vitroceramic asupra catorva populatii de bacterii printre care si *Staphylococcus aureus*. Asa cum se poate observa (Fig. 4) s-a folosit metoda insamantarii in agar.



Zona de inhibitie este relativ mare in jurul fiecarei concentratii, ceea ce demonstreaza caracterul sau antibacterian.

Concluzii

1. Au fost preparate mixturi omogene cu formula .generală $1.5\text{Ag}_2\text{O} 98.5\% [0.47 \text{B}_2\text{O}_3 (57-x)\text{CaO}x\text{P}_2\text{O}_5]$ utilizand reactivi de inalta puritate.
2. Sistemele calculate pentru concentratii molare peste 2 mol % Ag_2O nu formeaza structuri vitroase prin metoda subracirii topiturilor, chiar la utlizare temperaturilor inalte
3. S-au obtinut probe vitroase din sistemul asa cum a fost evidentiat prin raze X
4. S-au obtinut vitroceramici prin tratament termic intr-un singur pas la $650\text{ }^\circ\text{C}$, faza cristalina este evidenta pe difractograme si poate fi identificata exact
5. Sticlele oxidice obtinute au efect antibacterian asa cum a fost evidentiat in experimentele specifice.

Lucrari de diploma care utilizeaza date obtinute.

Evaluarea eficienței antibacteriene a unor sisteme nanonstructurate prin spectroscopie. RAMAN și RES –
Frum Tereza indrumator Maria Spanu si Razvan Stefan
Impactul terapeutic al unor sisteme nanostructurate în dermatitele stafilococice la câine.
Nagy Alex Mircea indrumator Maria Spanu si Razvan Stefan

Teza de doctorat care utilizează date legate de sistemele vitroase investigate.

Studiul biodisponibilitatii si al impactului unor sisteme nanostructurate in terapia dermatitelor la caine.
Doctorand: Tautan Mircea conducator doctorat Prof. Dr. Marina Spanu
Statusul imun ca indicator al bunastarii animalelor in diferite sisteme de crestere si pe parcursul transportului.
Doctorand: Duca Ghiorghita Marius Prof. Dr. Marina Spanu
Evaluarea potentialului de restructurare imunologica si a impactului modulator al unor factori extrinseci la pasari.
Doctorand: Bianu Gherghie Prof. Dr. Marina Spanu

Bibliografie

1. M. Bellatone, N.J.C., L. L. Hench, *Bacteriostatic action of a novel four-component bioactive glass*. Journal of Biomedical Materials Research, (2000). **51**: p. 484-490.
2. I. Ahmed, D.R., M. Wilson, J.C. Knowles, *Antimicrobial effect of silver-doped phosphate-based glasses*. Journal of Biomedical Materials Research - Part A, (2006). **79**: p. 618-626.
3. Hench, L.L., *The story of Bioglass*. J Mater Sci: Mater Med (2006). **17**: p. 967-978.
4. V. Simion, M.S., R. Stefan *Structure and dissolution investigation of calcium-bismuth-borate glasses and vitroceramics containing silver*. J. Mater Sci: Mater Med, (2007). **18**: p. 507-512.
5. E. A. Abou Neel, I.A., J. Pratten, S. N. Nazhat, J. C. Knowles *Characterisation of antibacterial copper releasing degradable phosphate glass fibres* Biomaterials, (2005). **26**: p. 2247-2254.
6. L. L. Hench, J.M.P., *Third-Generation Biomedical Materials Science* (2002). **295**.
7. R. Langer, J.P.V., *Tissue Engineering*. Science, (1993). **260**: p. 920-926.
8. J. R. Jones, L.M.E., P. Saravanapavan, L. L. Hench, *Controlling ion release from bioactive glass foam scaffolds with antibacterial properties*. Journal of Materials Science: Materials in Medicine, (2006). **17**: p. 989-996.
9. Hench, L.L., *Genetic design of bioactive glass*. Journal of the European Ceramic Society, (2009). **29**: p. 1257-1265.