

---

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

# **Evaluarea potențialului de stimulare a vindecării a unor biomateriale de tip compozit**

---

Doctorand Alina Ioana ARDELEAN (GHIȚĂ)

---

Conducător de doctorat Prof. Dr. Liviu Ioan OANA

---



# INTRODUCERE

Terapia defectelor osoase și cutanate la animalele de companie reprezintă o reală provocare în activitatea uzuală a medicilor veterinari. La ora actuală există o varietate de biomateriale cu diverse calități, dar care încă nu întrunesc toate cerințele unui produs plenipotențiar. Descoperirea unui biomaterial multipotent care să ajute vindecarea și să încurajeze regenerarea mai multor tipuri de țesuturilor reprezintă un subiect de mare interes. Chiar dacă medicina umană beneficiază de mai multe cercetări în domeniu, este important să implementăm aceste practice și în medicina veterinară.

Scopul acestei lucrări este acela de a evalua eficacitatea unor biomateriale pe mai multe tipuri de țesuturi, având în vedere că studiile de acest fel sunt relativ limitate. Biomaterialele de tip compozit sunt adesea folosite în practica dentară, dar nu și în vindecarea osoasă sau mai ales cutanată. Prezența biocompatibilității și absența citotoxicității sunt elemente de valoare care oferă calitate unui biomaterial.

Așadar, cercetarea și integrarea acestor bioprodese în strategiile de vindecare ar putea duce la îmbunătățiri considerabile ale medicinei regenerative și ar putea încuraja dezvoltarea de biomateriale fezabile pentru mai multe tipuri de țesuturi.

## STRUCTURA TEZEI DE DOCTORAT

Teza de doctorat intitulată "*Evaluarea potențialului de stimulare a vindecării a unor biomateriale de tip compozit*" este structurată în două părți principale, și anume: **Partea I – Stadiul actual al cunoașterii**, respectiv **Partea a II-a – Contribuția personală**.

## STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

Partea I este formată din 3 capitole și redă o sinteză a informațiilor generale cu privire la biomateriale, țesutul cutanat și țesutul osos. În capitolul 1 sunt prezentate biomaterialele și sunt furnizate noțiuni legate de tipurile biomaterialelor, biocompatibilitatea acestora, clasificarea lor, aplicațiile medicale în care sunt utilizate și proprietățile acestora. În capitolul 2 și 3 sunt descrise noțiuni generale de anatomie ale pielii și ale osului, funcțiile acestora și tipurile de defecte care pot să apară la nivelul lor.

## CONTRIBUȚIA PERSONALĂ

Partea a II-a conține 6 capitole. Aici sunt descrise obiectivele urmărite, materialele și metodele folosite, rezultatele obținute, discuțiile, concluziile și recomandările, precum și elementele de originalitate ale tezei.

# STUDII DE CERCETARE

## 1. Obținerea și caracterizarea prin metode microscopice a biomaterialelor de tip compozit

Crearea unor bioproduse prin eliberarea controlată a umpluturii minerale în matricea polimerică este atât o provocare, cât și o cerință semnificativă. Astfel, în acest studiu au fost create două compozite pe baza unei matrici complexe care conține Bisfenol A-glicidil Metacrilat, Dimetacrilat de Uretan, Metacrilat de hidroxietil și Trietilen Glicol-Dimetacrilat (BisGMA, UDMA, HEMA și TEGDMA) și un material de umplere mineral format din sticlă de Oxid de Bariu (BaO), Florură de Bariu (BaF<sub>2</sub>), Nanohidroxiapatită (nHA) și Cuarț, Silică și Flouoroaluminosilicat.

Aceste biomateriale au fost înglobate în microcapsule de policaprolactonă (PCL) pentru a distribui umplutura minerală. PCL conține particule de umplutură asistate de zer de bivoliță ca agent antiaglomerat și promotor bioactiv, care eliberează filler-ul treptat în timpul polimerizării matricii. În timpul polimerizării C1, microcapsulele au fost complet distruse. În schimb, biomaterialul C2 a păstrat câteva părți de microcapsule bine încorporate în matrice lângă particulele de umplutură de BaO. Acest lucru a fost confirmat prin Spectroscopia cu Dispersie Energetică (EDS).

Reducerea conținutului mineral din proba C2 împiedică descompunerea totală a policaprolactonei în timpul polimerizării compozitelor. Acest lucru permite particulelor minerale să se încorporeze într-o structură foarte bine amestecată, fără segregări locale sau fisuri superficiale.

Potrivit microscopiei SEM, microstructura compozitului este influențată semnificativ de cantitatea și tipul de umplutură. Învelișul miezului de policaprolactonă se descompune relativ ușor, iar particulele sunt distribuite mai bine în matricea polimerică datorită cantităților și compoziției diferite de conținut mineral din proba C1.

Încorporarea eficientă a umpluturii minerale în ambele probe C1 și C2 a fost evidențiată de spectrele FTIR, care au arătat stabilizarea Bis-GMA ca urmare a prezenței monomerilor UDMA. Acest lucru stabilizează legăturile carboxilice din matricea polimerică, controlând vâscozitatea în timpul polimerizării pentru a asigura o distribuție uniformă și optimă a particulelor de umplutură în compozit. Aspectul uniform al detaliilor microstructurale susține acest fapt.

## 2. Evaluarea “in vitro” a compozitelor C1 și C2 de tip ciment pe celule stem mesenchimale de origine palatinală

Un mediu ideal pentru testarea biocompatibilității biomaterialelor este celula stem mezenchimală (MSC) de origine palatinală (HAN și colab., 2014; KAWAI și colab., 2022; XU și colab., 2019). Astfel, pentru a evalua biocompatibilitatea și prezența

efectelor citotoxice, compozitele care au fost create anterior au fost cultivate. În conformitate cu literatura de specialitate, se amintește despre comportamentul biologic diferit al compozitelor care ar putea fi influențat semnificativ de diferențele minore în raportul și tipul de agent de umplere mineral (LAWRENCE și colab., 2023; ZHAO și colab., 2023).

Cultivarea celulelor stem mezenchimale de origine palatinală (MSC) s-a realizat la 1, 3, 5 și 7 zile. După 3, 5 și 7 zile de cocultură, nivelurile de fosfatază alcalină (ALP) au fost măsurate la fiecare interval de timp, iar citotoxicitatea a fost evaluată pe probele compozite. Ambele compozite au permis o proliferare puternică a celulelor, conform studiului SEM. În 1 și 3, s-a observat un stadiu de pluripotență a celulei stem mezenchimale, cu niveluri medii de ALP de 209,2 u/L pentru C1 și 193,0 u/L pentru C2, precum și o morfologie a celulei fusiforme.

După 7 zile de cultură, s-a observat diferențierea celulară, care a fost demonstrată prin SEM. Modificările morfologice, cum ar fi forme aplatizate, stelate și rotunjite, au fost asociate cu un nivel crescut de ALP (279,4 u/L pentru C1 și 284,3 u/L pentru C2). După șapte zile de co-cultură, spectroscopia de raze X cu dispersie de energie (EDX) a arătat niveluri crescute de fosfor (P) și calciu (Ca) aproape de stoichiometria hidroxiapatitei. Acest lucru sugerează că MSC-urile C1 și C2 încep să aibă un comportament osteoinductiv.

După trei zile, testul colorimetric bazat pe scindarea sării galbene de tetrazolium ca indicator al viabilității celulare (MTT) a arătat o viabilitate celulară de 98,08% pentru C1 și de 97,33% pentru C2, ceea ce sugerează că probele compozite sunt biocompatibile. Deși viabilitatea celulară a scăzut ușor la 5 și 7 zile, rezultatele au fost remarcabile: C1 a avut 89,5% și C2 a avut 87,3%. Prin urmare, atât C1, cât și C2 sunt adecvate pentru testarea „in vivo” ulterioară.

Cantitatea și tipul de material de umplere bioactiv este foarte importantă pentru viabilitatea celulară. Rezultatele mai bune ale testului MTT indică faptul că C1 are o valoare mai mare a viabilității MSC. Dar atât C1, cât și C2 sunt candidați viabili pentru teste in vivo ulterioare.

În plus, a existat o corelație între cantitatea și tipul de material de umplere bioactiv și nivelul de fosfatază alcalină (ALP).

### **3. Evaluarea biocompatibilitatii a două tipuri de compozit prin implantarea subcutanată și intramusculară la șobolan**

Evaluarea biocompatibilității produselor care vin direct în contact cu țesuturile normale este esențială pentru determinarea gradului de toleranță gazdă-grefă. Testele de toxicitate sunt esențiale pentru evaluarea produselor care urmează să fie utilizate pe animale sau pe oameni. Pentru a înțelege fenomenul, sunt necesare atât experimente in vitro, cât și in vivo (PATROI, 2013, EMOKE PALL, 2015). Există posibilitatea ca anumite materiale să provoace toxicitate acută prin acumularea în celulele renale sau hepatice.

Deși cimenturile pot prezenta o toxicitate relativ mică, aceasta scade considerabil pe măsură ce trece timpul (SCHMID-SCHWAP, 2009). Această reducere a toxicității este atribuită părților nepolimerizate din stratul inhibat de aer (DARMANI, 2007). Interacțiunile complexe care au loc între material și sistemul biologic sunt posibile prin utilizarea unui organism viu, deoarece studiile „in vitro” nu pot replica aceste interacțiuni (GOCIU, 2013).

Acest studiu a urmărit să evalueze biocompatibilitatea a două cimenturi compozite pe o perioadă de nouăzeci de zile, examinând comportamentul șobolanilor și efectuând examinări clinice, histologice și scanări CT.

Materialele au fost implantate subcutanat și peri/intramuscular pentru a fi testate pentru toxicitate și biocompatibilitate. Zilele treizeci și nouăzeci au fost esențiale pentru studiu, deoarece au fost recoltate implanturile împreună cu țesutul adiacent, rinichii și ficatul pentru a identifica orice depuneri toxice potențiale. În ciuda faptului că biomaterialul a fost în contact intim cu țesutul, forma, culoarea sau textura acestuia au rămas neschimbate.

A existat o relație pozitivă între material și zona de inserție, în ciuda unui ușor răspuns inflamator la nivelul locației de implantare. Ficatul și rinichii nu au prezentat modificări de formă sau funcție. Rezultatele au demonstrat că biomaterialele sunt compatibile cu țesuturile biologice, deoarece nu au provocat modificări clinice sau iritații specifice.

Nu au fost observate modificări în dimensiune ale ambelor cimenturi, conform scanărilor computerizate de tomografie.

Fără consecințe negative, citotoxicitate sau de respingere, observațiile histopatologice confirmă biocompatibilitate biomaterialelor.

În studiile noastre, modelul de implantare in vivo folosit a confirmat rezultatele in vitro, și anume o biocompatibilitate fezabilă.

#### **4. Evaluarea comparativă a compozitelor C1 și C2 în stimularea vindecării plăgilor cutanate la șobolan**

Compozitele de tip ciment din acest studiu au fost dezvoltate ca urmare a cercetărilor actuale în medicina regenerativă. Într-un model experimental folosit la șobolani, scopul principal al acestei cercetări a fost de a evalua capacitatea cimenturilor compozite C1 și C2 de a stimula vindecarea rănilor. Biomaterialele nepolimerizate au fost folosite pentru a acoperi rănilor după ce au fost create defecte de piele cu o grosime de cinci milimetri.

O serie de protocoale microscopice și macroscopice au fost utilizate pentru a evalua evoluția defectului. Aceste protocoale au inclus analiza histopatologică, rata de închidere a plăgii și fotografierea rănilor.

Toți indivizii luați în studiu au fost sănătoși și nu a fost afectată capacitatea pielii de a se vindeca, conform analizelor paraclinice.

Evaluările macroscopice au arătat că biomaterialul C1 a facilitat vindecarea începând cu a treia zi și a avut calități superioare în comparație cu biomaterialul C2, care a determinat micșorarea plăgii începând cu ziua a șasea.

Analiza histologică a evaluat că bioprodusul C1 a avut calități superioare: biomaterialul nu a determinat reacții de respingere, necroză sau apoptoză, a fost observată neoangiogeneza iar cimentul compozit C1 a fost absorbit în întregime.

După aplicarea topică a biomaterialelor, investigațiile histologice ale organelor au demonstrat că nu există hepatotoxicitate sau nefrotoxicitate. Acest lucru confirmă din nou biocompatibilitatea și fiabilitatea ambelor cimenturi compozite.

## **5. Evaluarea comparativă a compozitelor C1 și C2 în stimularea vindecării defectelor osoase induse la șobolan**

Repararea sau reconstruirea defectele osoase reprezintă o provocare în domeniul ortopedic. În acest studiu, au fost implantate două cimenturi compozite într-un defect femural subcritic la șobolani. Pentru a compara rezultatele, au fost utilizate trei grupuri, un grup de control, și două grupuri experimentale.

Cercetarea a vizat posibilă capacitate osteogenă și toleranța toxicologică a bioproduselor prin histopatologie și analize imagistice computerizate efectuate la 14, 28, 56 și 90 de zile. Descoperirile inițiale ale acestei cercetări sunt pozitive, deoarece arată o mică diferență între grupurile tratate cu biomateriale. Utilizarea acestor bioproduse poate fi un mijloc eficient în tratarea anomaliilor osoase.

În comparație cu materialul C2, biomaterialul C1 a permis vindecarea zonelor de defect osos într-un termen mai scurt, în jurul implantului. La unii șobolani au fost observate aparițiile unor zone de fractură osoasă. Nu este clar dacă fracturile au fost cauzate de prezența sau compoziția biomaterialul C2 sau au existat alți factori.

Până la sfârșitul celor nouăzeci de zile de studiu, biomaterialele au rămas neschimbate la nivelul țesutului osos, fără a crea consecințe negative, fenomene de respingere, apoptoză sau necroză celulară.

Ambele biomateriale au demonstrat o ușoară activitatea osteoinductivă, dar biomaterialul C1 a fost mai eficient decât bioprodusul C2.

Proprietățile fizico-chimice ale bioproduselor se potrivesc cu cerințele țesutului osos, iar durabilitatea și rezistența mecanică sunt confirmate de scanările CT. Acesta ar putea servi drept bază pentru un proiect de cercetare care examinează utilizarea biomaterialelor dentare în fabricarea de implanturi pentru defecte osoase.

## CONCLUZII FINALE ȘI RECOMANDĂRI

În urma cercetărilor efectuate, rezultatele stau la baza formulării unor concluzii precum urmează:

- Biomaterialelor de tip compozit sintetizate au dovedit o bună toleranță in vitro cu o biocompatibilitate crescută și absența citotoxicității;
- Cercetările efectuate au validat că utilizarea biomaterialelor nu a modificat valorile analizele de sânge iar funcționarea rinichilor și ficatului nu a fost afectată;
- Biomaterialele nepolimerizate au ajutat la vindecarea cutanată și au crescut biodegradabilitatea produselor fără a produce consecințe negative la nivelul altor țesuturi sau organe;
- Implantarea biomaterialelor la nivel subcutanat și peri/intramuscular nu a indus un răspuns inflamator local sau sistemic;
- Utilizarea bioprodusele în defectele osoase nu a interferat negativ cu procesul de vindecare osoasă;
- Adiția compozitelor cu diverse tipuri de nanoparticule induc o eficiență terapeutică crescută;
- Cercetarea bioproduselor în defectele osoase a validat faptul că acestea sunt adecvate pentru fabricarea diverselor tipuri de proteze, datorită biocompatibilității ridicate și toxicității scăzute, precum și proprietăților mecanice excelente, având o rezistență mecanică mare.

Având în vedere cele de mai sus, recomandările pot fi formulate astfel: ca biomaterialele să fie utilizate în ingineria tisulară și medicina regenerativă. Datorită biocompatibilității crescute, se deschid posibilități pentru dezvoltarea și integrarea ulterioară a unor produse specifice în aceste cimenturi (spre exemplu: microcipuri). Cu toate acestea, aprofundarea materialelor este necesară pentru aplicații în fabricarea protezelor de diverse tipuri.

## **ELEMENTELE DE ORIGINALITATE ALE TEZEI**

Cercetarea de față aduce câteva elemente inovative în studiul biomaterialelor:

1. Sinteza unor biomateriale de tip compozit ciment noi care nu au mai fost produse până în prezent;
2. Obținerea unor materiale cu biocompatibilitate crescută și toxicitate scăzută;
3. Eliberarea controlată a umpluturii minerale în matricea polimerică în timpul procesului de polimerizare care determină creșterea uniformității bioprodusului;
4. Utilizarea biomaterialelor nepolimerizate de tip ciment în procesul de vindecare a pielii;
5. Utilizarea unei seringi de microcipare ca modalitate de implantare a bioproduselor la nivel subcutanat și peri/intramuscular.



