



Raport stiintific si tehnic

privind implementarea proiectului: IMBUNATATIREA TEHNOLOGIEI DE IMOBILIZARE ENZIMATICA A ALCALIN FOSFATAZEI IN VEDEREA CRESTERII PERFORMANTELOR UNOR MATERIALE IMPLANTABILE

Cod: PN-III-P2-2.1-PED-2016-1337

Contract: **190PED/2017**

Acronim: **ECHITECH**

Perioada: august 2017 – decembrie 2017

Etapă I. Identificarea conceptului de imobilizare a proteinelor în vederea asigurării osteointegrării implantului. Elaborarea și caracterizarea unor formule îmbunătățite de membrane pe baza de chitosan și chitosan/gelatina/ALP prin introducerea de ioni metalici

REZUMATUL ETAPEI

În cadrul etapei I a proiectului s-au îndeplinit în totalitate obiectivele propuse de fiecare activitate în parte, prin găsirea de soluții științifice și de execuție tehnică, care să asigure creșterea performanțelor materialelor implantabile. În această etapă s-a identificat conceptul de imobilizare a proteinei ALP care să asigure osteointegrarea implantului. S-au selectat materiile prime cele mai avantajoase atât din punct de vedere tehnic, cât și economic și s-au selectat parametri optimi de lucru în scopul obținerii și dezvoltării unor noi materiale performante cu aplicații biomedicale. S-au realizat și testat materiale polimerice sub formă de membrane, prin utilizarea unor rapoarte diferite între componentele individuale, chitosan și gelatina, utilizând ca agent de reticulare glutaraldehida, care să asigure stabilitatea chimică și mecanică a suporturilor polimerice. Ca noutate în obținerea acestor membrane, metoda de preparare a gelului de chitosan folosit în elaborarea noilor suporturi include un proces de

dializa, urmarind astfel imbunatatirea biocompatibilitatii. De asemenea, proiectul si-a propus si realizat obiectivul privind imobilizarea ALP pe noile membrane si introducerea de ioni metalici care sa determine imbunatatirea activitatii enzimatice, a biocompatibilitatii si a efectului antibacterian.

Activitati:

A1.1. Stabilirea procesului de pre-dezvoltare a conceptului de imobilizare a proteinelor

In aceasta etapa, studiile noastre s-au concentrat asupra identificarii conceptului de imobilizare a proteinei ALP in vederea asigurarii osteointegrarii implantului, activitate la care au participat coordonatorul (CO), Universitatea Politehnica din Bucuresti, si partenerul INCDSB (P1).

A1.2. Optimizarea raportului componentelor din biogel prin variatia concentratiei acestora in vederea imbunatatirii proprietatilor fizico-chimice si biologice ale materialelor implantabile

In scopul imbunatatirii biotehnologiei pentru dezvoltarea de noi materiale cu aplicatii biomedicale, punctul de plecare l-au reprezentat atat rezultatele experimentale anterioare ale echipei de cercetatori din acest proiect, publicate in reviste de prestigiu [19, 32, 40], cat si ultimele rezultate in domeniu [2,5-7, 22, 27,31].

In aceasta etapa, s-au elaborat materiale implantabile folosind diferite rapoarte intre componentele individuale din biogel. In acest sens, s-au preparat membrane pe baza de CHI si CHI:G, reticulate sau nereticulate cu GA. Pentru realizarea unor formule imbunatate de membrane s-a efectuat imobilizarea ALP pe aceste membrane destinate ingineriei tisulare si s-au introdus ioni metalici care sa determine imbunatatirea activitatii enzimatice.

In vederea obtinerii membranelor biopolimerice s-au utilizat urmatoarele substante de calitate analitica:

- pulbere de CHI extrasa din cochilii de crab, cu vascositate > 400 mPa.s, (SIGMA);
- gelatina porcina (G) (Fluka);
- agent de reticulare – glutaraldehida (GA) solutie 25 % (Merck);

- fosfataza alcalina din intestin bovin (ALP) (SIGMA);

A1.3. Selectarea parametrilor optimi de lucru in vederea imbunatatirii proprietatilor fizico-chimice si biologice ale materialelor implantabile

Intr-o prima etapa de elaborare si testare a membranelor, proiectul este directionat spre stabilirea parametrilor optimi de lucru in vederea imbunatatirii proprietatilor materialelor implantabile prin imobilizare de ALP si in prezenta de ioni de Mg.

In acest sens s-au elaborat membrane biopolimerice prin cuplarea dispersiilor coloidale de CHI si GEL, reticulate sau nereticulate cu GA.

Pentru imbunatatirea proprietatilor fizico-chimice si biologice ale materialelor implantabile obtinute anterior s-a avut in vedere influenta urmatorilor parametri:

- pH-ul gelului obtinut
- Gradul de reticulare cu agent bifunctional GA
- Grosimea membranelor obtinute
- *Inglobarea ionilor metalici*

1.4. Studiul privind evaluarea metodelor de caracterizare fizico-chimica si biochimica a materialelor implantabile pe baza de chitosan/gelatina/ALP si ionilor metalici inglobati. Selectarea metodelor de caracterizare propice formularilor materialelor implantabile selectate.

Pornind de la o serie de studii privind metodele de caracterizare fizico-chimica si biochimica a materialelor implantabile s-au selectat metode de caracterizare specifice formularilor materialelor implantabile. Astfel, selectia biomaterialelor elaborate, precum si potentialul aplicativ deosebit al acestora pot fi stabilite dupa evaluarea relatiilor care exista intre structura, proprietati si efectele biologice.

Proprietatile biomaterialelor depind atat de caracteristicile materiilor prime, cat si de cele ale biomaterialelor obtinute prin combinarea componentelor individuale. Evaluarea proprietatilor se poate realiza prin corelarea mai multor metode de analiza, care sa permita obtinerea de cat mai multe informatii cu privire la caracteristicile materialelor si a posibilelor aplicatii ale acestora.

Aspecte structurale privind atat materia prima utilizata, cat si membranele obtinute au fost studiate prin inregistrarea spectrelor de absorbtie in IR, cu scopul de a identifica prezenta gruparilor functionale specifice fiecarui tip de material, dar si interactiile dintre molecule.

In urma analizei spectrale in IR s-au stabilit caracteristicile structurale atat pentru componentele individuale, cat si pentru membranele obtinute prin combinarea acestora. S-a observat ca reticularea cu GA conduce la formarea de legaturi chimice intre molecule, iar acest lucru poate asigura o mai buna stabilitate mecanica si chimica si poate conduce la reducerea biodegradabilitatii.

Ca urmare a acestei activati, CO (UPB) si P1 (INCDSB) propun urmatoarele metodelor de caracterizare propice noilor membrane biopolimerice: testarea proprietatilor mecanice si morfologice (AFM, SEM), determinarea porozitatii si a rugozitatii, capacitatea de absorbtie a apei, determinarea unghiului de contact, determinarea activitatii enzimaticice a ALP, teste de bioactivare (SEM-EDAX), testarea *in vitro* a biodegradabilitatii, determinarea efectului antibacterian, identificarea ionilor metalici detasati din membrane prin ICP-MS, teste de hemocompatibilitate si de biocompatibilitate.

A1.5. Publicarea pe site – ul conducatorului de proiect a unei pagini web special destinate acestui proiect

Activitatea de realizare a paginii web destinata acestui proiect a fost indeplinita de catre CO (UPB). Aceasta pagina de web va fi actualizata pe toata perioada de desfasurare a proiectului pentru a asigura diseminarea rezultatelor pe scara larga.

Pagina de web: <http://tihangratiela.github.io>

CONCLUZII

Directorul de proiect (CO - UPB), precum si responsabilul din partea INCDSB (P1) au indeplinit in totalitate obiectivele si indicatorii, monitorizand rezultatele specifice pentru fiecare activitate propusa.

Indicatori propusi si realizati:

- Raport stiintific si financiar;
- Construirea unei pagini web.

Bibliografie selectiva

1. M. Rinaudo, *Chitin and chitosan: Properties and applications*, Prog. Polym. Sci., **2006**, 31, pp. 603-632
5. N. R. Mohamad, N. H. Che Marzuki, N. A. Buang, F. Huyop, R. Abdul Wahab, "An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes", Biotechnol. Biotechnol. Equip., **2015**, 29, 2, pp. 205–220
5. A. J. Sanjari, M. Asghari. *A Review on chitosan utilization in membrane synthesis*. Chem. Bio. Eng. Review, **2016**, 3, 3, pp. 134–158
6. A. Skwarczyńska, D. Biniaś, Z. Modrzejewska, *Structural research of thermosensitive chitosan-collagen gels containing ALP*, Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives, **2016**, XXI, pp. 176-186
7. F. Jafary, M. Panjehpour, J. Varshosaz and P. Yaghmaei, *Stability improvement of immobilized alkaline phosphatase using chitosan nanoparticles*, Braz. J. Chem. Eng., **2016**, 33, 02, pp. 243 – 250
10. P. Hanachi, F. Jafary, F. Jafary, S. Motamedi, *Immobilization of the Alkaline Phosphatase on Collagen Surface via Cross-Linking Method*, Iran J. Biotech., **2015**, 13, 3, pp. 32-38
18. M.M. Beppu, R.S. Vieira, C.G. Aimoli, C.C. Santana, *Crosslinking of chitosan membranes using glutaraldehyde: Effect on ion permeability and water absorption*, J. Membr. Sci., **2007**, 301, pp. 126-130
19. E. Berteanu, D. Ionita, M. Simoiu, M. Paraschiv, R. Tatia, A. Apatean, M. Sidoroff and L. Tcacenco, *Evaluation of biodegradation and biocompatibility of collagen/chitosan/alkaline phosphatase biopolymeric membranes*, Bull. Mater. Sci., **2016**, 39, 2, pp. 377–383
20. H. Nagaoka, H. Nagaoka, R. Walter, L. W. Boushell, P. A. Miguez, A. Burton, A. V. Ritter, and M. Yamauchi, *Characterization of Genipin-Modified Dentin Collagen*, BioMed Research International, **2014**, Article ID 702821, 7 pages
22. R. A. A. Muzzarelli, M. E. Mehtedi, C. Bottegoni, A. Aquili and A. Gigante, *Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone*, Mar. Drugs, **2015**, 13, pp. 7314–7338
24. M. Sarem, F. Moztaezadeh, M. Mozafari, *How can genipin assist gelatin/carbohydrate chitosan scaffolds to act as replacements of load-bearing soft tissues?*, Carbohydr. Polym., **2013**, 93, pp. 635– 643
27. G. Bayramoglu, M. Y. Arica, *Reversible immobilization of catalase on fibrous polymer grafted and metal chelated chitosan membrane*, J. Mol. Catal. B: Enzymatic, **2010**, 62, pp. 297-304
28. L. C. Dong, G. Wang, Y. Xiao, Y. Xu, X. Zhou, H. Jiang, Q. Luo, *Immobilization of glucose oxidase on a novel crosslinked chitosan support grafted with L-lysine spacers*. Chem. Biochem. Eng. Q, **2011**, 25, 3, pp. 395-402

29. R. Lieder, M. Darai, G. Orlygsson, O. E. Sigurjonsson, *Solution casting of chitosan membranes for in vitro evaluation of bioactivity*. Biol. Proced. Online, **2013**, 15, pp. 11
30. W. Y. Yang, M. Thirumavalavan, J. F. Lee, *Effects of porogen and cross-linking agents on improved properties of silica-supported macroporous chitosan membranes for enzyme immobilization*. J. Membr. Biol. **2015**, 248, pp. 231-240
31. M. Malini, M. Thirumavalavan, W.Y. Yang, J. F. Lee, G. Annadurai, *A versatile chitosan/ZnO nanocomposite with enhanced antimicrobial properties*, Int. J. Biol. Macromol., **2015**, 80, pp. 121-129
33. C. Iordachel, L. Tcacenco, M. E. Sidoroff, A. M. Gheorghe, E. Berteau, M. I. Enache, *Composite biomaterial with anti-inflammatory action*, RO 129428 (A2) – **2014** - 05-30
35. B. Li, C. L. Shan, Q. Zhou, Y. Fang, Y. L. Wang, F. Xu, L. R. Han, M. Ibrahim, L. B. Guo, G. L. Xie and G.C. Sun, *Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Cross-Linked Chitosan-Glutaraldehyde*, Mar. Drugs, **2013**, 11, pp. 1534-1552
36. P. Dubruel, R. Unger, S. Van Vlierberghe, V. Cnudde, P. J. S. Jacobs, E. Schacht, & C. J. Kirkpatrick, *Porous Gelatin Hydrogels: 2. In Vitro Cell Interaction Study*, Biomacromolecules, **2007**, 8, pp. 338-344
37. N. N. B. M. D Aini, *Biodegradable biocomposite starch based films blended with chitosan and gelatin*, A thesis submitted in fulfillment of the requirements for the award of the Degree of Bachelor of Chemical Engineering, Biotechnology, **2010**
39. G. S. Al-Saidi, A. Al-Alawi, M. S. Rahman, and N. Guizani, *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopic study of extracted gelatin from shaari (Lithrinus microdon) skin: effects of extraction conditions*, I. F. R. J., **2012**, 19, 3, pp. 1167-1173
40. E. Berteau, D. Ionita, M. Paraschiv, A. Apatean (Toma), M. Sidoroff, C. Iordachel, L. Tcacenco, *Elaboration and physical, chemical and biological characterization of new chitosan and gelatin membranes*, U.P.B. Sci. Bull., Series B, **2015**, 77, 4, pp. 255-264
42. D. Sadeghi, H. Nazarian, N. Marouf, F. Aghalu, H. Nojehdehyan, E. V. Dastjerdi, *Alkaline Phosphatase Activity of Osteoblast Cells on Three-Dimensional Chitosan-Gelatin/Hydroxyapatite Composite Scaffolds*, J. Dent. Sch., **2013**, 30, 4, pp. 203-209
44. S. Hermanto, La Ode Sumarlin, W. Fatimah, *Differentiation of Bovine and Porcine Gelatin Based on Spectroscopic and Electrophoretic Analysis*, Journal of Food and Pharmaceutical Sciences, **2013**, 1, pp.68-73