



### **Raport științific și tehnic**

privind implementarea proiectului: **IMBUNATĂȚIREA TEHNOLOGIEI DE IMOBILIZARE ENZIMATICĂ A ALCALIN FOSFATAZEI ÎN VEDEREA CREȘTERII PERFORMANTELOR UNOR MATERIALE IMPLANTABILE**

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

Contract: **190PED/2017**

Acronim: **ECHITECH**

Perioada: ianuarie 2018 – decembrie 2018

**Etapa a II-a. Caracterizarea unor formule îmbunătățite de membrane pe baza de chitosan și chitosan/gelatină/ALP prin introducerea de ioni metalici. Realizarea de model experimental în vederea utilizării biopolimerilor studiați pentru aplicații terapeutice, conform standardelor ISO.**

#### **REZUMATUL ETAPEI**

Activitățile de cercetare planificate pentru anul 2018, conform planului de realizare a proiectului, au fost îndeplinite în totalitate de către CO (UPB) și P1 (INCDSB), iar rezultatele obținute sunt în concordanță cu obiectivele propuse de fiecare activitate. A fost utilizată o gamă largă de tehnici de caracterizare, care au demonstrat că soluția propusă de imobilizare a ALP în prezența ionilor metalici de Mg sau Zn conduce la obținerea de membrane polimerice performante. A fost stabilită compoziția optimă a membranelor care prezintă activitate enzimatică, caracter non-hemolitic și care asigură o foarte bună adeziune și proliferare a celulelor fibroblaste și efect antibacterian împotriva a două bacterii. În perioada derulării Etapei a 2-a, membrii echipei de cercetare de la CO (UPB) și P1 (INCDSB) au depus împreună o cerere de brevet de invenție și au diseminat rezultate printr-un articol publicat într-o revistă ISI de prestigiu internațional și prin participarea la conferința internațională “The International Symposium on Inorganic and Environmental Materials 2018”(ISIEM2018), desfășurată în Belgia (Ghent), cu două lucrări prezentate sub formă de poster.

#### **Descrierea activităților:**

**A2.1. Caracterizarea spectroscopică (FTIR) și testarea proprietăților morfologice (AFM), mecanice, gradul de gonflare și unghiul de contact al membranelor pentru a găsi forma adecvată pentru utilizare în terapie**

Pornind de la rezultatele prezentate anterior, în scopul obținerii unor membrane cu proprietăți îmbunătățite s-a procedat pe de o parte la creșterea concentrației de  $MgCl_2$  (membranele M10 și M11) și la înlocuirea  $MgCl_2$  cu  $ZnSO_4$  (membranele M9Zn, M10Zn, M11Zn), iar pe de altă parte s-a înlocuit agentul de reticulare sintetic, GA, cu un agent de reticulare natural, Genipin (GP), fără adaos și cu adaos de glicerina (GLI) (1mL) și s-a înlocuit  $MgCl_2$  cu  $ZnSO_4$  (M5GP, M8GP, M9GPZn, M10GPZn, M11GPZn, M3G, M5GPG, M8GPG, M9GPGZn, M10GPGZn, M11GPGZn).

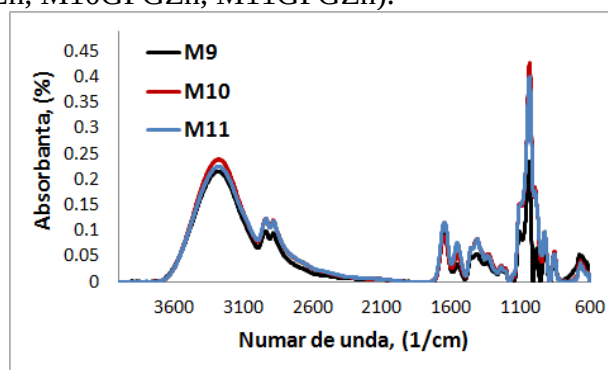


Fig. 1. Spectre IR pentru membrane pe baza de CHI, G, ALP, GA și concentrații diferite de  $MgCl_2$  [1]

Pe baza rezultatelor spectrale inregistrate pentru membranele M9, M10 si M11 s-a observat ca banda amida II se deplaseaza de la  $1584\text{ cm}^{-1}$  (in CHI standard) spre numere de unda mai mici  $1555\text{ cm}^{-1}$  (Fig. 1). Adaosul de  $\text{Mg}^{2+}$  in compozitia membranelor demonstreaza o mai buna interactie intre componente. Mai mult, prezenta  $\text{Mg}^{2+}$  in compozitia membranelor, precum si influenta ionului metalic sunt demonstrate prin metode de analiza prezentate in urmatoarele activitati.

Avand in vedere obtinerea de membrane polimerice care sa prezinte o buna activitate antimicrobiana, dar si o buna biocompatibilitate, agentul de reticulare sintetic (GA) s-a inlocuit cu un agent de reticulare natural (GP) [1-6]. Comparand spectrele IR se observa o buna reticulare atat in cazul utilizarii GA, cat si GP.

### Testarea proprietatilor morfologice ale membranelor prin AFM

Pentru investigarea proprietatilor de suprafata ale membranelor s-a utilizat microscopia de forta atomica (AFM) cu echipamentul AFM A100-SGS de la A.P.E. Research (Italia), cu modul de lucru "in contact". Aceasta analiza s-a efectuat pe membrana M3 si pe membranele reticulate cu GP, fara enzima (M5GP) si cu enzima inglobata (M8GP) si cu adaos de  $\text{Zn}^{2+}$  (M9GPZn), toate aceste membrane fiind mai plane, mai elastice si mai flexibile decat membranele reticulate cu GA.

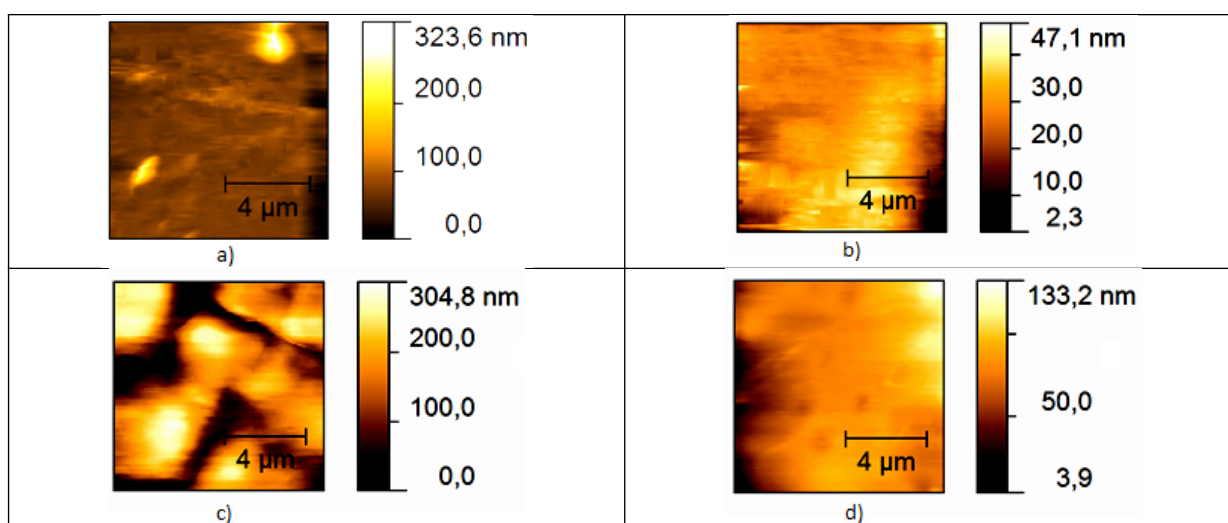


Fig.2. Imagini AFM pentru membrane: a) M3; b) M5GP; c) M8GP; d) M9GPZn

Imaginile AFM (Fig. 2) arata ca membranele M3 si M5GP sunt plane, formate din platouri fara o forma determinata, cu pante line intre unitati. Rugozitatea medie  $R_a$  este  $14,7\text{ nm}$  si, respectiv,  $16,0\text{ nm}$ . Inglobarea enzimei (membrana M8GP) conduce la formarea de zone bombate, bine delimitate de forme neregulate si separate prin santuri cu pante abrupte. Rugozitatea medie  $R_a$  a membranei M8GP este  $57,4\text{ nm}$ . Ingloband  $\text{Zn}^{2+}$  in compozitie, se obtine membrana M9GPZn ce prezinta platouri fara o forma determinata, cu pante line intre unitati si cu rugozitatea medie  $R_a$  de  $12,7\text{ nm}$ . Ca urmare a inglobarii enzimei ALP, rugozitatea membranei creste, dar ulterior, la incorporarea ionilor de Zn, rugozitatea revine la valori asemanatoare celor inregistrate in cazul membranelor M3 si M5GP.

### Testarea proprietatilor mecanice ale membranelor polimerice

Duritatea unui material este definita ca rezistenta la deformarea locala si depinde de morfologia suprafetei. Testarea duritatii membranelor polimerice s-a realizat prin utilizarea aparatului Wilson hardness Tukon 1102-Vickers Hardness Tester, echipat cu softul DiaMet™. Pentru toate membranele analizate, duritatea are valori foarte mici, intre  $0,101\text{ HV}$  si  $0,180\text{ HV}$ . Se inregistreaza o usoara crestere a duritatii in cazul membranelor cu enzima inglobata in prezenta sau in absenta ionilor metalici si o scadere usoara a duritatii la utilizarea glicerinei. Cu toate acestea, toate probele prezinta o duritate foarte mica, diferentele fiind aproape nesemnificative din acest punct de vedere.

### Stabilirea gradului de gonflare a membranelor polimerice

Pentru a stabili capacitatea de absorbtie a apei, membranele au fost pregatite sub forma de esantioane cu diametru de  $5\text{ mm}$ . Acestea au fost cantarite ( $W_d$ ), iar apoi imersate in apa distilata la  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  pentru diferite

intervale de timp ( $W_w$ ). Absorbția de apă WA (%) a membranelor preparate a fost determinată conform ecuației (1). Testul a fost efectuat în triplicat.

$$WA (\%) = [(W_w - W_d)/W_d] \times 100 \quad (1)$$

unde:  $W_d$  - masa de probă uscată;  $W_w$  - masa de probă cu apă.

După 1 h de imersie în apă, membranele polimerice prezintă o capacitate mare de absorbție a apei, dintre acestea M9 și M10 având cea mai mare valoare de WA %, iar M10GPZn, M11GPZn și M10GPGZn, M11GPGZn cea mai mică valoare de WA %. Analizând comportamentul până la 7 zile, se observă că toate membranele continuă să absoarbă apă, dar începând cu 8 h și până la 168 h, membrana M5 prezintă cel mai mare procent de absorbție a apei. Acest lucru indică faptul că prezintă enzime și a ionilor metalici, în special a celor de Zn, determină scăderea capacității de absorbție a apei de către membrane.

Având în vedere aplicarea finală a acestor membrane, gradul de gonflare în prezența apei este foarte important. O valoare mare înregistrată pentru absorbția apei nu este un fenomen dorit, de aceea, prin înglobarea enzimei și adăugarea ionilor metalici se pot obține membrane cu capacitate optimă de absorbție a apei.

### **Determinarea unghiului de contact al membranelor polimerice**

Capacitatea hidrofil/hidrofobă a unui biomaterial are un rol semnificativ în controlul creșterii și proliferării celulare, fiind bine cunoscut faptul că adeziunea celulară este facilitată de suporturi cu caracter hidrofil. Hidrofilicitatea membranelor biopolimerice s-a determinat prin masuratori ale unghiului de contact (UC), prin picurarea unei picături de apă distilată pe suprafața probei, utilizând echipamentul KSV CAM 100. Prin imobilizarea ALP și incorporarea de ion metalic, caracterul hidrofob al membranei se modifică în caracter hidrofil moderat sau pronunțat, care este adecvat pentru utilizarea acestor membrane ca suport pentru creșterea și proliferarea celulară. Totuși, desi valorile UC înregistrate pentru membranele M6 și M7 arată un caracter hidrofil bun, necesar pentru o bună fixare și proliferare a celulelor, acesta nu poate fi suficient dacă suportul nu a fost reticulat, iar acest lucru se va observa în activitatea A.2.10.

În cazul membranei M5GP, în care CHI și G au fost reticulate cu GP, UC are valoarea  $62,27^\circ \pm 0,23$ , indicând caracterul moderat hidrofil al acesteia. Imobilizarea de ALP în membrana pe bază de CHI și G reticulată cu GP (M8GP) determină scăderea UC la  $27,05^\circ \pm 0,32$ . Ulterior, la incorporarea  $Zn^{2+}$ , UC scade foarte puțin, ajungând la  $21,71^\circ \pm 0,48$  (M9GPZn),  $25,16^\circ \pm 0,28$  (M10GPZn) și respectiv  $23,42^\circ \pm 0,17$  (M11GPZn).

Se poate spune astfel, că imobilizarea enzimei în membranele pe bază de CHI și G reticulate fie cu GA fie cu GP și introducerea ionilor metalici determină obținerea de membrane polimerice cu caracter hidrofil, caracter necesar pentru aceste membrane care sunt destinate aplicațiilor biomedicale.

### **A2.2. Evaluarea proprietăților morfologice ale membranelor prin SEM**

Pe lângă structura chimică a suporturilor polimerice, morfologia suprafeței este un alt factor important pentru a obține o bună adeziune și proliferare celulară [7]. Efectul incorporării ionilor metalici asupra morfologiei membranelor pe bază de CHI a fost evaluat prin SEM.

Imaginile SEM evidențiază formarea de microparticule pe suprafețele membranelor analizate. Așa cum reiese din figura 3a, pe suprafața membranei M8 s-au format câteva agregate cu arie cuprinsă între  $4\ \mu m$  și  $56\ \mu m$ . În cazul membranelor M9, M10 și M11 (Fig. 3b-d), în care s-au adăugat diferite concentrații de  $MgCl_2$ , se observă agregate de diferite dimensiuni și cu distribuție diferită. În imaginea SEM a membranei M9 (Fig. 3b), cu 0,01 %  $MgCl_2$ , se observă un agregat cu arie de  $6,6\ mm$ , constând în particule cu arii cuprinse între  $11\ \mu m$  și  $250\ \mu m$ . Figura 3c evidențiază pe suprafața membranei M10, care conține 0,1 %  $MgCl_2$ , distribuția a câteva agregate cu arii cuprinse între  $7\ \mu m$  și  $555\ \mu m$ . La adăugarea soluției  $MgCl_2$  în concentrație de 0,2 % (M11), ca și în cazul membranei M10, se observă pe întreaga suprafață distribuția de agregate cu 2 tipuri de dimensiuni, de aproximativ  $4\ \mu m$  și  $188\ \mu m$  (Fig. 3d).

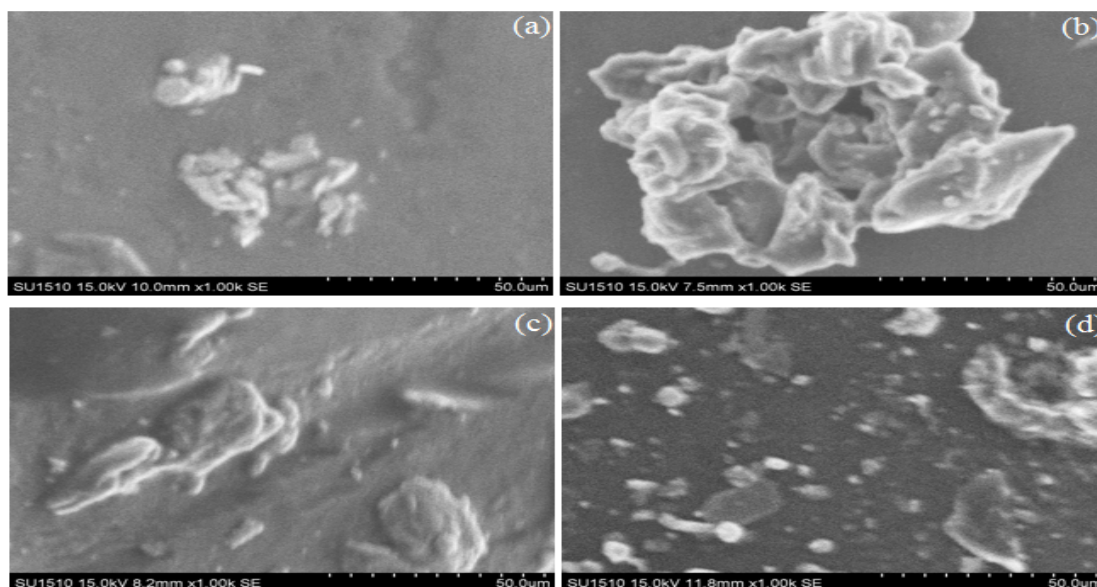


Fig.3. Imagini SEM pentru membrane polimerice: a) membrane M8; b) membrane M9; c) membrane M10; d) membrana M11. Scala: 50  $\mu\text{m}$ .

### A2.3. Determinarea porozitatii si a rugozitatii biomaterialelor obtinute in vederea evaluarii difuziei eficiente a lichidelor biologice

Contributia rugozitatii si a porozitatii suporturilor polimerice in procesul de osteointegrare si absorbtie a biomoleculelor este strans legata de adeziunea, proliferarea si viabilitatea celulara [8, 9].

Valorile rugozitatii membranelor polimerice sunt cuprinse intre 2,193  $\mu\text{m}$  si 7,587  $\mu\text{m}$ , in functie de compozitie. Utilizarea agentului de reticulare natural, GP, in locul utilizarii agentului de reticulare sintetic, GA, determina cresterea rugozitatii membranelor, in timp ce prezenta ionilor metalici de Mg sau Zn determina scaderea rugozitatii acestora. Cu toate acestea, testele de viabilitate MTT de la activitatea A 2.10 demonstreaza ca membranele polimerice obtinute sunt biocompatibile, dar o viabilitate celulara mult mai buna se observa la membranele reticulate cu GP si cu enzima inglobata in prezenta de  $\text{ZnSO}_4$  (M9GPZn, M10GPZn, M11GPZn).

In ceea ce priveste parametrii legati de porozitate, se observa porozitate mai mare in cazul membranelor cu adaos de  $\text{ZnSO}_4$ , iar cresterea concentratiei solutie de  $\text{ZnSO}_4$  determina o usoara crestere a suprafetei specifice si a dimensiunii porilor, acest lucru influentand pozitiv si viabilitatea celulara.

Dintre membranele analizate, cele reticulate cu GP, cu enzima imobilizata in prezenta de Zn, care au demonstrat o capacitate mare de absorbtie de apa (dar mai mica decat in cazul membranelor reticulate cu GA, cu enzima imobilizata in prezenta de Mg) si un caracter hidrofil pronuntat, sunt poroase si rugoase. Toate aceste caracteristici sunt necesare membranelor polimerice ce urmeaza a fi utilizate in domeniul biomedical.

### A2.4. Determinarea activitatii enzimatice a ALP absorbite functie de parametrii de reactie (temperatura si pH). Determinarea concentratiei de activare sau inhibare a activitatii enzimatice de catre ionii metalici inglobati Zn si Mg. Determinarea activitatii statice si operationale. Stabilitatea in timp a enzimei imobilizate.

In ultimele decenii, numeroase studii de cercetare s-au axat atat pe imobilizarea biomoleculelor active pe suporturi polimerice solide, cat si pe identificarea metodelor de activare/inhibare a activitatii enzimatice [10, 11].

In prezentul studiu, activitatea enzimatice atat pentru ALP libera cat si imobilizata pe membranele polimerice studiate s-a determinat prin metoda Ghiaci M. si colab., adaptata [12]. S-a studiat influenta ionilor metalici asupra activitatii enzimatice a ALP din mucoasa intestinala de bovina, la 37  $^{\circ}\text{C}$  si pH 10. Comparand rezultatele inregistrate pe membranele polimerice reticulate cu GA, respectiv membrana M8 (fara adaos de  $\text{Mg}^{2+}$ ) cu cele inregistrate pe membranele M9, M10 si M11 (cu adaos de ion  $\text{Mg}^{2+}$ ), se observa un comportament diferit. Adaugarea in compozitia membranelor a aceluiasi volum de solutie

apoasa de  $\text{MgCl}_2$  de diferite concentratii (0,01 %, 0,1 % si 0,2 %) conduce la cresterea activitatii fosfatazei alcaline. Valoarea cea mai mare este inregistrata in cazul membranei M10 cu adaos de  $\text{MgCl}_2$  in concentratie de 0,1 %. Din analiza rezultatelor obtinute pentru membranele M8, M8GP si M8GPG se observa ca utilizarea agentului de reticulare natural (M8GP) si in plus si adaugarea glicerinei (M8GPG) determina o activitate enzimatica mai buna decat in cazul membranei preparate prin reticulare cu GA (M8). In ceea ce priveste influenta adaosului de ion metalic de Zn asupra activitatii enzimatice a ALP s-au analizat in paralel membranele polimerice reticulate atat cu GA cat si cu GP, fara adaos de  $\text{Zn}^{2+}$  cu cele in care s-a adaugat acelasi volum de solutie apoasa de  $\text{ZnSO}_4$  de diferite concentratii. Cresterea concentratiei solutiei de  $\text{ZnSO}_4$  in compozitia membranelor studiate determina inhibarea activitatii enzimatice indiferent de tipul de agent de reticulare utilizat. In concluzie, utilizarea ionilor metalici de Mg, respectiv de Zn poate determina activarea, respectiv inhibarea activitatii enzimatice. Cu toate acestea, toate membranele polimerice obtinute, fie cu adaos de  $\text{Mg}^{2+}$  fie cu adaos de  $\text{Zn}^{2+}$  prezinta activitate enzimatica. Practic, se urmareste realizarea de membrane care sa prezinte activitate enzimatica, iar utilizarea  $\text{Zn}^{2+}$ , desi a determinat scaderea activitatii, a fost necesara pentru a asigura atat adeziunea si proliferarea celulara, hemocompatibilitatea cat si activitatea antimicrobiana.

### **Variatia activitatii enzimatice functie de temperatura de reactie si pH**

In vederea testarii activitatii enzimatice a membranelor la variatii de temperatura si pH, din membranele obtinute si analizate au fost selectate 2: membrana M8 pe baza de CHI si G reticulata cu GA, in care s-a inglobat ALP si membrana M10 pe baza de CHI si G reticulata cu GA, in care s-a inglobat ALP in prezenta de  $\text{MgCl}_2$ , pentru care s-a inregistrat cea mai mare valoare a activitatii enzimatice la 37 °C si pH 10.

A fost determinata activitatea enzimatica a ALP imobilizata in membranele M8 si M10 la pH constant, pH = 10, variand temperatura intre 37 °C si 40 °C. De asemenea, a fost determinata activitatea enzimatica a ALP imobilizata in aceleasi membrane M8 si M10 pastrand constanta temperatura de 37 °C si variand pH-ul de la 9,5 la 11,5.

Comparand valorile activitatii enzimatice a ALP in membrane cu sau fara adaos de  $\text{Mg}^{2+}$ , se observa ca inglobarea  $\text{Mg}^{2+}$  activeaza enzima, obtinand o valoare de 286 U/mg/min, la 37°C si pH 10. Pastrand pH-ul 10, dar variand temperatura, activitatea enzimatica se modifica astfel: la M8 activitatea enzimatica creste pana la 39 °C, iar apoi scade, in timp ce la M10, activitatea incepe sa scada pe masura ce creste temperatura. Cu toate acestea, valorile activitatii enzimatice sunt mai mari in cazul M10 decat in cazul M8, subliniind impactul pozitiv al  $\text{Mg}^{2+}$  asupra activarii ALP.

Ulterior, mentinand constanta temperatura la 37 °C, dar modificand pH-ul, se constata ca pH-ul optim pentru activarea enzimei este 10 pentru proba M10 si 11 pentru M8.

### **Activitatea operationala si activitatea statica**

Activitatea operationala a membranei M8 este stabila dupa un numar de 10 cicluri de reactie. Activitatea enzimatica a acestei probei scade cu 20,78 %. **Activitatea statica** prezinta un timp de injumatatire dupa 60 de zile de la imobilizare in conditii de pastrare la temperatura camerei in exicator.

Activitatea operationala a membranei M10 este stabila dupa 10 cicluri de reactie. Activitatea enzimatica a probei scade cu 23,70 %. Prin adaugarea ionilor de Mg, **activitatea statica** prezinta un timp de injumatatire dupa 90 de zile de la imobilizare in conditii de pastrare la temperatura camerei in exicator.

### **A2.5. Teste de bioactivare (SEM-EDAX)**

Numeroase studii de literatura au demonstrat imbunatatirea capacitatii de osteoinductie a CHI prin imobilizarea de enzime [13-15]. Pentru a induce biomineralizarea si pentru a promova cresterea si proliferarea celulara, in membranele preparate pe baza de CHI s-a imobilizat ALP. Activitatea ALP depinde atat de tipul de ioni metalici utilizati, cat si de concentratia acestora. Pentru a confirma prezenta ionilor metalici in compozitia membranelor si influenta lor asupra activarii/inhibarii activitatii enzimatice, membranele obtinute s-au analizat prin SEM-EDAX.

Analiza probelor s-a efectuat folosind microscopul electronic cu baleiaj (SEM) Quanta 650 FEG echipat cu o sursa de electroni cu emisie de camp de tip Schottky Field Emission (FEG) cu inalta stabilitate a curentului de emisie, aplicand o tensiune de accelerare a fascicolului de electroni de 10 KeV



in vid inalt. Prealabil, probele au fost taiate si asezate pe o banda conductoare in camera SEM. Microscopul SEM include un spectrometru EDAX de dispersie dupa energie (EDS) pentru cartografierea elementelor atomice si deconvolutia spectrelor conform standardului ISO 15632:2012. Spectrometrul EDAX este complet integrat din punct de vedere hardware si software cu microscopul SEM.

Tab. 1. Concentratia de  $Mg^{2+}$  si  $Zn^{2+}$  conform EDAX

Membrana	Concentratie Mg (%)	Concentratie Zn (%)
M1 – CHI	0,32	1,02
M2 – G	0,28	0,35
M8 - CHI:G (1:1), ALP, GA	0,48	4,23
M9Zn - CHI:G (1:1), ALP, GA, Zn 0,01%	0,39	4,51
M10Zn- CHI:G (1:1), ALP, GA, Zn 0,1%	0,57	5,60
M11Zn- CHI:G (1:1), ALP, GA, Zn 0,2%	0,38	7,68

Analiza SEM-EDAX confirma prezenta ionilor metalici in compozitia membranelor (Tab.1). Se observa cresterea concentratiei ionilor de Zn, pe masura ce in membrane se utilizeaza o concentratie mai mare de  $ZnSO_4$ , crestere ce a condus la inhibarea activitatii enzimatice, asa cum s-a notat la activitatea A 2.4.

#### A2.6. Testarea *in vitro* a biodegradabilitatii membranelor folosind colagenaza bacteriana (*Clostridium histolyticum*)

Masuratorile efectuate pentru degradarea enzimatica utilizand colagenza *Clostridium histolyticum* (Sigma Aldrich) si solutie tampon fosfat (PBS) cu pH = 7,4 [16] demonstreaza ca in absenta unui agent de reticulare, membranele se degradeaza rapid, pana la 100 %. Comparand membranele reticulate cu GA cu cele reticulate cu GP se inregistreaza rezistenta mai buna la degradare in cazul reticularii cu GA. Procentul de degradare este de maxim 10 % la 168 h pentru membranele reticulate cu GA, cu adaos de ALP si ion metalic, in timp ce pentru membranele reticulate cu GP, cu adaos de ALP si ion metalic degradarea ajunge la ~ 50 % la 48 h si ~ 73 % la 168 h. Pentru membranele reticulate tot cu GP, cu adaos de ALP si ion metalic, dar in prezenta de glicerina, degradarea enzimatica ajunge la 100 % la 168 h.

Cu toate acestea, toate membranele polimerice preparate in prezenta de agent de reticulare necesita un timp indelungat pentru a se degrada.

#### A2.7. Determinarea efectului antibacterian al membranelor in conditiile mentinerii unei biocompatibilitati ridicate la introducerea unui ion metalic selectat

Studiile au aratat ca activitatea de chelare a CHI a fost implicata ca un posibil mod de actiune sau ca CHI ar putea avea tinte intracelulare, cum ar fi ADN [17]. In acelasi timp, CHI poate actiona si ca o membrana perturbatoare [18].

Activitatea antibacteriana a membranelor polimerice preparate a fost determinata pentru urmatoarele bacterii: *Escherichia coli* ATCC 25922 (American Type Culture Collection) si *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, utilizand metoda turbidimetrica.

Evaluand membranele nereticulate si cele reticulate cu GA, cea mai eficienta activitate antibacteriana pentru ambele tipuri de bacterii se obtine in cazul membranei M1 pe baza de CHI. In ceea ce priveste membranele polimerice reticulate cu GA si cu adaos de ioni metalici de Mg, care au demonstrat si o buna reticulare intre componente, cea mai eficienta activitate antibacteriana a fost obtinuta in cazul membranelor M10 si M11. In cazul membranelor polimerice reticulate tot cu GA, dar cu adaos de ion metalic de Zn, activitatea antibacteriana a crescut, evidentinand astfel efectul pozitiv al Zn. Comparand insa toate cele 3 probe cu continut de  $Zn^{2+}$ , in care s-au folosit concentratii diferite de  $ZnSO_4$ , cel mai bun efect antibacterian s-a inregistrat la membrana M9Zn cu  $ZnSO_4$  in concentratie de 0,01 %. Aceste rezultate sunt in acord cu datele de literatura care demonstreaza ca prezenta  $Zn^{2+}$  determina imbunatatirea efectului antibacterian.

Schimband agentul de reticulare GA din membranele M9Zn, M10Zn si M11Zn, cu agentul de reticulare natural, GP, dar pastrand toate celelalte componente in aceleasi concentratii si acelasi raport gravimetric in membranele M9GPZn, M10GPZn si M11GPZn, se inregistreaza cresterea efectului antibacterian. Aceste rezultate demonstreaza atat importanta introducerii ionului de Zn cat si a reticularii cu un compus natural, precum GP. In continuare, pentru a obtine membrane polimerice mai netede si mai elastice, in compozitia membranelor reticulate cu GP, cu enzima imobilizata si cu adaos de ioni de Zn, s-a adaugat glicerina

(M9GPGZn, M10GPGZn, M11GPGZn). Se obtine in aceste cazuri o crestere semnificativa a efectului antibacterian impotriva ambelor tipuri de bacterii.

Studiul experimental demonstreaza astfel ca utilizarea agentului de reticulare natural (GP) si incorporarea ionilor metalici de Zn determina cresterea efectului antibacterian pentru ambele tipuri de bacterii *Escherichia coli* si *Staphylococcus aureus* in conditiile mentinerii biocompatibilitatii ridicate, conform activitatii A 2.10.

#### A2.8. Identificarea ionilor metalici detasati din membrane prin ICP-MS

Concentrația ionilor metalici prezenti in enzima libera, dar si in membranele cu continut de enzima si adaos de ioni metalici a fost evidentiata prin spectrometria de masa plasma cuplata (ICP-MS). Probele au fost mineralizate in 1 mL HNO<sub>3</sub> concentrat, timp de o ora, apoi diluate pana la 10 mL cu apa distilata. Au fost analizate cu ajutorul curbelor de calibrare efectuate cu ajutorul unui standard multielement care contine Mg si Zn in concentratie de 10 µg/mL (ppm) [1]. Solutia ALP a fost considerata proba de referinta (control, blank). Rezultatele obtinute sunt prezentate in Tab. 2:

Tab. 2. Concentratiile ionilor metalici din ALP si din membrane polimerice

Proba	Concentratia Mg (µg/mL)	Concentratia Zn (µg/mL)
ALP-proba control	0,151	0,107
M8 - CHI:G (1:1), ALP, GA	0,068	0,038
M9 - CHI:G (1:1), ALP, GA, Mg 0,01%	0,091	0,049
M10 - CHI:G (1:1), ALP, GA, Mg 0,1%	3,750	0,057
M11 - CHI:G (1:1), ALP, GA, Mg 0,2%	5,812	0,081

Ca urmare a imobilizarii ALP, se constata prezenta ionilor metalici de Mg si Zn in membranele preparate si analizate, cu precizarea ca Zn se regaseste in cantitate foarte mica, in domeniul ppb. De asemenea, la introducerea unui volum egal de solutie apoasa de MgCl<sub>2</sub>, dar de concentratii diferite, se inregistreaza cresterea importanta a concentratiei ionului de Mg, care a determinat si activarea enzimei ALP, conform activitatii A 2.4.

#### A2.9. Teste de hemocompatibilitate pe membranele obtinute

In studiul de fata, pentru a evalua interactiunea dintre celulele sanguine umane si diferite forme de materiale [19] pe baza de CHI, au fost efectuate teste de hemocompatibilitate in conformitate cu indicatiile ISO 10993-4 [20], utilizand metoda de contact direct asa cum este descrisa in ASTM F 756-00 [21]. Indicele hemolitic (IH%) a fost calculat folosind ecuatia 2.

$$IH (\%) = [(OD_{proba} - OD_{control negativ}) / (OD_{control pozitiv} - OD_{control negativ})] \times 100 \quad (2)$$

unde: OD reprezinta densitatea optica la 545 nm.

Conform ASTM F 756-00 (2000), materialele pot fi clasificate in 3 categorii: materialele cu un procent de hemoliza mai mare de 5 % sunt hemolitice, intre 2 % si 5 % sunt slab hemolitice, sub 2 % sunt non-hemolitice.

Testele de hemoliza s-au efectuat in triplicat, iar valorile medii ale indicelui hemolitic ± Deviatia Standard sunt urmatoarele: 2,9 % ± 0,31 pentru membrana M1, care se incadreaza in categoria usor hemolitic si 0,22 % ± 0,12 pentru membrana M2, care intra in categoria de non-hemolitic. La omogenizarea CHI si G (M3) si apoi CHI si G cu GA (M5) sau cu ALP (M6), indicele hemolitic creste semnificativ la 5,4 % ± 0,17 (M3), 5,1 % ± 0,21 (M5) si la 8,0 % ± 0,52 (M6), indicand caracterul hemolitic al acestora. Indicele hemolitic scade la 1,97 % ± 0,08 pentru membrana M7 in care s-a utilizat mai mult G si la 2,19 % ± 0,21 pentru membrana M8 in care CHI, G si ALP au fost reticulate cu GA. Mai mult, adaugarea de Mg<sup>2+</sup> la membranele M9, M10 si M11 a condus la obtinerea de suporturi non-hemolitice, indicele hemolitic fiind 1,6 % ± 0,09 (M9), 1,5 % ± 0,1 (M10) si respectiv 0,5 % ± 0,17 (M11).

Chiar daca s-au inregistrat indici hemolitici scazuti si in cazul membranelor M2, M7 si M8, membranele de interes, care au demonstrat o buna reticulare si mai ales o buna activitate enzimatica raman M9, M10 si M11, acestea prezentand si caracter non-hemolitic.

Inlocuind ionii metalici de Mg cu Zn atat in membranele reticulate cu GA, cat si in cele reticulate cu GP se obtin valori care demonstreaza caracterul non-hemolitic al membranelor.

Valorile inregistrate in urma testului de hemocompatibilitate evidentiaza caracterul non-hemolitic al membranelor polimerice reticulate atat cu GA cat si cu GP, prin imobilizarea fosfatazei alcaline si inglobarea ionilor metalici.

#### **A2.10. Testarea in vitro a biocompatibilitatii membranelor obtinute**

Testul de viabilitate MTT ((bromura 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu) s-a utilizat pentru a evidentia viabilitatea culturilor celulare tratate cu membranele testate. Analiza MTT a constatat in reducerea dehidrogenazei mitocondriale in celule metabolice active. In reactie s-au obtinut cristale de formazan albastru-inchis si s-au solubilizat in izopropanol pentru masurarea absorbantei [22, 23]. Pentru analiza viabilitatii si examinarea morfologiei celulare s-a utilizat o linie stabilizata de celule fibroblaste de soarece NCTC (L 929).

Pentru a induce adeziunea celulara, acestea s-au insamantat in placi cu 24 godeuri si s-au incubat in conditii de atmosfera umeda, 5 % CO<sub>2</sub> si 37 °C, 24 h. Dupa 24 h, s-a inlocuit mediul de cultura cu un mediu proaspat, iar membranele au fost asezate in godeuri. Toate probele s-au testat in triplicat. S-au utilizat trei godeuri cu celule netratate in rol de control negativ. Testul de viabilitate celulara prin MTT si morfologia celulara a celulelor tratate s-au efectuat la 24 h si 48 h de la incubare. Pentru testul de viabilitate, mediul de cultura din fiecare godeu a fost inlocuit cu solutie MTT, iar placile au fost incubate 3 h, la 37 °C. Solutia MTT din godeuri a fost inlocuita cu izopropanol si a urmato o agitare usoara pentru a dizolva cristalele de formazan. Absorbanta solutiei colorate a fost citita la 570 nm utilizand un cititor de microplaci Berthold Mithras LB 940 (Germania). Densitatea optica masurata este direct proportionala cu numarul de celule viabile prezente in cultura celulara testata, iar rezultatele au fost calculate cu ecuatia 3:

$$\text{Viabilitate celulara (\%)} = (\text{Absorbanta proba} / \text{Absorbanta control}) \times 100 \quad (3)$$

Celulele netratate cu membrane polimerice au fost utilizate ca proba control, cu celule viabile 100 %.

Examinarea morfologiei celulare a culturii tratate a fost efectuata prin inlocuirea mediului si a probelor din godeuri cu solutie Bouin (7,5 ml acid picric umectat cu apa,  $\geq 98$  % si 2,5 mL formaldehida 40 %) pentru fixarea celulelor, urmata de colorarea cu hematoxilina-eozina. Morfologia celulara a fost vizualizata cu microscop optic Carl Zeiss Axio Observer D1 (Germania), iar imaginile au fost realizate cu camera digitala Axio Cam MRc (Germania).

Dupa **24 h**, toate probele testate au avut valori ale viabilitatii celulare peste 75 %, ceea ce indica biocompatibilitatea buna a membranelor, exceptie facand proba M7, care s-a dovedit a fi usor citotoxica (74,06 %) si care a demonstrat rezistenta mica la degradarea cu collagenaza.

La **48 h**, membranele M6 si M7 au prezentat rezultate ale viabilitatii celulare sub 75 %, ceea ce indica efect usor citotoxic, toate celelalte membrane prezentand efect necitotoxic.

Aspectul morfologic al celulelor tratate cu membrane reticulate cu GA, cu enzima imobilizata si cu Mg<sup>2+</sup> inglobat este similar cu cel al celulelor NCTC netratate (Control). Densitatea celulara pentru cultura tratata cu membrana M8 a avut un nivel comparabil cu cea de la celulele netratate, in timp ce nivelul proliferarii celulare pentru cultura tratata cu membranele M9, M10 si M11 a fost usor mai scazut, dar fara modificari ale morfologiei celulelor, indicand faptul ca aceste membrane sunt biocompatibile cu celulele NCTC.

Inlocuind Mg<sup>2+</sup> cu Zn<sup>2+</sup> se obtin membranele M9Zn, M10Zn si M11Zn cu viabilitate celulara asemanatoare cu cele obtinute la utilizarea Mg<sup>2+</sup> sau foarte putin scazute.

Si in cazul celulelor tratate cu membrane reticulate cu GP, in absenta sau in prezenta de glicerina, cu enzima imobilizata si cu Zn<sup>2+</sup> inglobat, aspectul morfologic este similar cu cel al celulelor NCTC netratate (Control). Din punctul de vedere al viabilitatii celulelor pentru culturile tratate cu membranele M9GPZn, M10GPZn si M11GPZn s-au obtinut procente de 100 % la 24 h si peste 92 % la 48 h. Utilizarea glicerinei (M9GPGZn, M10GPGZn si M11GPGZn) a determinat scaderea viabilitatii celulelor.

#### **A2.11. Stabilirea compozitiei optime a membranelor**

In scopul obtinerii de materiale polimerice cu aplicatii biomedicale, initial, s-au selectat materiile prime cele mai avantajoase din punct de vedere tehnic si economic, s-au preparat materiale polimerice sub forma de



membrane, cu rapoarte diferite între componentele individuale, chitosan și gelatina, utilizând ca agent de reticulare glutaraldehida, pentru a asigura stabilitatea chimică și mecanică a suporturilor polimerice și s-au selectat parametri optimi de lucru. Ca noutate, gelul de CHI este trecut printr-un proces de dializă, timp de 24 h, în scopul îmbunătățirii biocompatibilității membranelor. Pentru a stabili potențialul aplicativ al membranelor polimerice s-au selectat metode de caracterizare specifice formulărilor materialelor implantabile. Ulterior, în compoziția membranelor s-a imobilizat fosfataza alcalină pentru a induce osteointegrarea și a îmbunătăți creșterea și proliferarea celulară. Pentru îmbunătățirea activității enzimatice, dar și pentru a obține un efect antibacterian al suporturilor polimerice, biotehnologia de imobilizare a enzimei a inclus etapa de adaugare a ionilor metalici de Mg și Zn.

Deși testele de determinare a activității enzimatice au arătat că prezenta ionilor metalici de Mg îmbunătățește activitatea enzimatică, în timp ce prezenta ionilor de Zn o inhibă, totuși la concentrațiile de  $\text{ZnSO}_4$  utilizate se înregistrează activitate enzimatică și, în plus, crește activitatea antibacteriană.

În scopul îmbunătățirii efectului antibacterian, în condițiile menținerii biocompatibilității membranelor polimerice, agentul de reticulare sintetic, GA, s-a înlocuit cu agentul de reticulare natural, GP.

Analizând rezultatele de viabilitate celulară și morfologia celulelor și pe cele care ilustrează activitatea enzimatică a fosfatazei alcaline imobilizate în membranele polimerice cu adaos de ion metalic, se observă că membranele M10 și M11, reticulate cu GA, cu enzima imobilizată și cu adaos de  $\text{Mg}^{2+}$  prezintă cea mai bună activitate enzimatică și viabilitate celulară foarte bună (100 % la 24 h și peste 80 % la 48 h). Aceste 2 membrane prezintă și un ușor efect antibacterian (între 12 % și 14 %), rezistentă bună la degradarea enzimatică și, de asemenea, caracter non-hemolitic.

Urmărind obținerea de membrane polimerice pe baza de componente naturale, sunt foarte importante rezultatele obținute în cazul membranelor reticulate cu agent de reticulare natural, GP, cu adaos de  $\text{Zn}^{2+}$ . Deși introducerea  $\text{Zn}^{2+}$  a determinat scăderea activității enzimatice, totuși, prezenta acestui ion metalic în membrane, a condus la îmbunătățirea efectului antibacterian, menținând și viabilitatea celulară. Dintre acestea, membranele M9GPZn, M10GPZn și M11GPZn au un efect antibacterian cuprins între 31 % și 53 %, activitate enzimatică, rezistentă bună la degradarea enzimatică și, în același timp, viabilitate celulară foarte bună (100 % la 24 h și peste 92 % la 48 h) și caracter non-hemolitic.

Se poate concluziona că noile membrane biopolimerice M9GPZn, M10GPZn și M11GPZn, cu enzima ALP imobilizată și cu adaos de ioni metalici de Zn, obținute prin reticularea la temperatura camerei în prezenta unui agent natural, precum GP, pot fi utilizate cu succes în domeniul biomedical. Aceste membrane poroase și cu o rugozitate cuprinsă între  $3,944 \div 7,587 \mu\text{m}$  au demonstrat capacitatea foarte bună de a susține și promova proliferarea celulară, acționând în același timp și ca suport cu efect antibacterian împotriva a două bacterii, precum *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Caracteristicile prezentate, precum și hemocompatibilitatea, hidrofilicitatea și, nu în ultimul rând, costul redus al materiei prime, fac ca această metodă de imobilizare a enzimei să fie utilizată ușor în obținerea de suporturi polimerice destinate aplicațiilor biomedicale.

#### **A2.12. Identificarea soluțiilor originale în vederea întocmirii cererii de brevet de invenție**

Dezvoltarea de noi materiale polimerice pe baza de CHI pentru a fi utilizate în aplicații biomedicale prezintă ca noutate, în proiectul de față, atât compoziția cât și procedeul de obținere a acestora. S-au obținut membrane polimerice performante prin cuplarea dispersiilor coloidale de chitosan (CHI) și gelatina (G), urmată de reticularea cu agentul natural, genipin (GP) cu fosfataza alcalină imobilizată în prezenta de  $\text{ZnSO}_4$  de diferite concentrații.

Ca urmare a rezultatelor obținute, coordonatorul (CO), Universitatea Politehnică din București, și partenerul INCDSB (P1) au stabilit că membranele polimerice care să constituie subiectul unei cereri de brevet de invenție să fie membranele pe baza de CHI, G, ALP, GP și diferite concentrații de  $\text{ZnSO}_4$ :

Membranele polimerice obținute, de culoare albastră (datorită prezentei genipinului) sunt uniforme, lucioase și elastice. Testele de biocompatibilitate și de determinare a activității antibacteriene au demonstrat că prezenta enzimei ALP și a ionilor de Zn asigură efectul antibacterian împotriva a două bacterii *Escherichia coli* ATCC 25922 și *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 și o bună adeziune și proliferare a celulelor fibroblaste de soarece NCTC (L 929) cu aspect morfologic normal.

### A2.13. Diseminare: Participarea la manifestari stiintifice, Raport stiintific, Elaborare de lucrare stiintifica in revista ISI

Participare la **conferinta internationala** “The International Symposium on Inorganic and Environmental Materials 2018”(ISIEM2018) ([http://isiem2018.org/sites/default/files/POSTER\\_PRESENTATIONS.pdf](http://isiem2018.org/sites/default/files/POSTER_PRESENTATIONS.pdf)), desfasurata in Belgia (Ghent), iunie 2018 cu doua lucrari prezentate sub forma de poster:

- P1-BIO-8: “Immobilization of the Alkaline Phosphatase on Genipin-cross-linked chitosan-gelatine membranes for biomedical applications”. Autori: Gratiela T. Tihan, Roxana G. Zgarian, Elena Berteanu, Daniela Ionita, Ioana Demetrescu, Georgeta Totea, Catalin Iordachel, Mihaela Ionica Enache, Adina L. Zuav, Luminita Tcacenco.
- P1-BIO-10: “The influence of magnesium ion on the antibacterial activity of the polymeric membranes”. Autori: Roxana G. Zgarian, Gratiela T. Tihan, Elena Berteanu, Daniela Ionita, Luminita Tcacenco, Mihaela-Ionica Enache, Adina L. Zuav, Maria Paraschiv, Georgeta Totea and Ioana Demetrescu.

A fost publicat 1 **articol intr-o revista ISI** de prestigiu international: [Tihan G.T.](#), [Zgarian R.G.\\*](#), [Berteanu E.](#), [Ionita D.](#), [Totea G.](#), [Iordachel C.](#), [Tatia R.](#), [Prodana M.](#), [Demetrescu I.](#), *Alkaline Phosphatase Immobilization on New Chitosan Membranes with  $Mg^{2+}$  for Biomedical Applications*, Marine Drugs 16 (8), article number 287, ISSN: 1660-3397 2017, (FI=4.379) (WOS: 000442868200014), revista situata in Q1 Clarivate.

**Cerere brevet de inventie:** Berteanu E., Tihan G.T., Zgarian R.G., Tatia R., Totea G., Ionita D., Tcacenco L., Iordachel C., Demetrescu I., *Membrane biopolimerice cu fosfataza alcalina imobilizata si ion metalic de Zn pentru aplicatii biomedicale*, Nr. A 00925/21.11.2018.

A fost intocmit raportul stiintific si tehnic pentru Etapa a 2-a si Raportul final.

### A2.14. Intocmirea raportului final de activitate tehnico-stiintifica

Directorul de proiect (CO - UPB), precum si responsabilul din partea INCDSB (P1) au intocmit raportul final de activitate tehnico-stiintifica in care sunt descrise toate activitatile prevazute si realizate in totalitate.

### A2.15. Finalizarea site – ului conducatorului de proiect

Activitatea de finalizare a paginii web destinata acestui proiect a fost indeplinita de catre CO (UPB). Aceasta pagina de web a fost 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.

Proiectul si-a propus si realizat obiectivele privind imbunatatirea tehnologiei de imobilizare a ALP pe noile membrane polimerice, prin introducerea de ioni metalici care sa asigure activitatea enzimatica, biocompatibilitatea, caracterul non-hemolitic si efectul antibacterian al acestora.

#### Indicatori propusi si realizati:

- Demonstrator experimental – membrane pe baza de chitosan cu ALP imobilizata si ion metalic;
- Raportul stiintific si tehnic pentru etapa 1, pentru etapa a 2 - a si raportul final de activitate tehnico-stiintifica;
- 1 articol in jurnal ISI;
- Participarea cu 2 lucrari sub forma de poster la conferinta internationala;
- Cerere brevet;
- Up-gradare finala a web site-ului.

### Bibliografie

1. [G.T. Tihan](#), [R. G. Zgarian](#), [E. Berteau](#), [D. Ionita](#), [G. Totea](#), [C. Iordachel](#), [R. Tatia](#), [M. Prodana](#), [I. Demetrescu](#), *Alkaline Phosphatase Immobilization on New Chitosan Membranes with  $Mg^{2+}$  for Biomedical Applications*, Marine Drugs 16, 8, article number 287, ISSN: 1660-3397, **2018**, (FI=4.379) (WOS: 000442868200014).
2. 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 Volume **2014**, Article ID 702821, 7 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2014/702821>.
3. H. W. Sung, I. L. Liang, C. N. Chen, R. N. Huang, and H. F. Liang, *Stability of a biological tissue fixed with a naturally occurring crosslinking agent (genipin)*, Journal of Biomedical Materials Research, 55, **2001**, pp. 538–546.
4. R. Muzzarelli, M. Mehtedi, C. Bottegoni, A. Aquili, A. Gigante, *Genipin-Crosslinked Chitosan Gels and Scaffolds for Tissue Engineering and Regeneration of Cartilage and Bone*, Mar. Drugs, 13, **2015**, pp. 7314–7338.
5. G. T. Tihan, R. G. Zgarian, E. Berteau, D. Ionita, I. Demetrescu, G. Totea, C. Iordachel, M. I. Enache, A. L. Zuav, L. Tcacenco, *Immobilization of the Alkaline Phosphatase on Genipin-cross-linked chitosan-gelatin membranes for biomedical applications*, P1-BIO-8, [http://isiem2018.org/sites/default/files/POSTER\\_PRESENTATIONS.pdf](http://isiem2018.org/sites/default/files/POSTER_PRESENTATIONS.pdf)
6. R. G. Zgarian, G. T. Tihan, E. Berteau, D. Ionita, L. Tcacenco, M. I. Enache, A. L. Zuav, M. Paraschiv, G. Totea and I. Demetrescu, *The influence of magnesium ion on the antibacterial activity of the polymeric membranes*, P1-BIO-10, [http://isiem2018.org/sites/default/files/POSTER\\_PRESENTATIONS.pdf](http://isiem2018.org/sites/default/files/POSTER_PRESENTATIONS.pdf).
7. C. T. Liao; M. H. Ho, *The fabrication of biomimetic chitosan scaffolds by using SBF treatment with different crosslinking agents*, Membranes, 1, **2011**, pp. 3-12, <https://doi.org/10.3390/membranes1010003>].
8. A. S. G. Curtis, P. Clark, *The effects of topographic and mechanical properties of materials on cell behavior*, Critical Review in Biocompatibility, 5, **1990**, pp. 343-362.
9. C. Vianna-Soares, C. Kim, K. Ciftci, M. Borenstein, *HPMA and HEMA copolymer bead interactions with eukaryotic cells*, Materials Research (7), nr.3, São Carlos, **2004**, <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-14392004000300016>.
10. R. O. Arise, F. F. Bolaji, O. A. Jimoh, J. O. Adebayo, F. J. Olorunniji and S. O. Malomo, *Regulatory effect of divalent cations on rat liver alkaline phosphatase activity: How  $Mg^{2+}$  activates (and inhibits) the hydrolysis of p-nitrophenylphosphate*, Biokemistri 17, 2, **2005**, pp.129-136.
11. [H. C. Hung](#) and [G. G. Chang](#), *Differentiation of the slow-binding mechanism for magnesium ion activation and zinc ion inhibition of human placental alkaline phosphatase*, *Protein Sci.* 10, 1, **2001**, pp. 34–45. doi: [[10.1110/ps.35201](https://doi.org/10.1110/ps.35201)], PMID: [11266592](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11266592/).
12. M. Ghiaci, H. Aghaei, S. Soleimanian, M. E. Sedagat, *Enzyme immobilization: Part 2: Immobilization of alkaline phosphatase on Na-bentonite and modified bentonite*, Appl. Clay Sci. 43, **2009**, pp. 308-316. <https://doi.org/10.1016/j.clay.2008.09.011>, ART1
13. M. H. Ho, D. M. Wang, H. J. Hsieh, H. C. Liu, T. Y. Hsien, J. Y. Lai, L. T. Hou, *Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds*, Biomaterials. 26, 16, **2005**, pp. 3197-3206.
14. 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*, Journal Dental School 30, 4, **2013**, pp. 203-209.
15. [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*, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 29, 2, **2015**, pp. 205–220.
16. ART IB 2016.
17. E. I. Rabea, M. E. T. Badawy, C. V. Stevens, G. Smagghe, W. Steurbaut, *Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action*. Biomacromolecules, 4, **2003**, pp.1457-1465 <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bm034130m>.

18. I. M. Helander, , E. L. Nurmiaho-Lassila, R. Ahvenainen, J. Rhoades, S. Roller, *Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria*, Int. J. Food Microbiol. 71, **2001**, pp. 235-244. [http://biotech.niu.edu.tw/files/news/150\\_ecb5b752.pdf](http://biotech.niu.edu.tw/files/news/150_ecb5b752.pdf).
19. P. Harrison, *Progress in the assessment of platelet function*. Br. J. Hematol. 111, **2000**, pp. 733–744; DOI: [10.1016/j.blre.2004.05.002](https://doi.org/10.1016/j.blre.2004.05.002)
20. International Organization for Standardization: ISO 10993-4:2017: Biological evaluation of medical devices-Part 4: Selection of tests for interaction with blood, **2017**, <https://www.iso.org/standard/63448.html>
21. American Society for Testing of Materials: ASTM F 756-00: Standard practice for assessment of hemolytic properties of materials, **2000**, <https://www.astm.org/DATABASE.CART/HISTORICAL/F756-00.html>.
22. D. A. Scudiero, R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks. S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J Currens, D. Seniff, M. R. Boyd, *Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines*. Cancer Res. 48, **1988**, pp. 4827-4833. <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/48/17/4827.full.pdf>
23. J. Quetin-Leclercq, R. Elias, G. Balansard, *Cytotoxic activity of some triterpenoid saponins*. Planta Med. 58, **1992**, pp. 279-281; DOI: 10.1055/s-2006-961456.