

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ
FACULTATEA DE FARMACIE**

TEZĂ DE DOCTORAT

**FORMULAREA ȘI CARACTERIZAREA
FIZICO-CHIMICĂ A UNOR NANOPARTICULE
POLIMERICE PENTRU CEDAREA LOCALĂ
ÎN AFECȚIUNILE ORTOPEDICE**

REZUMAT

Conducător de doctorat:

Prof. univ. dr. Johnny Neamțu

Student-Doctorand:

Andreea Gabriela Deca

CRAIOVA

2017

Cuprins

Introducere	3
Stadiul actual al cunoașterii	4
1. Managementul infecțiilor ortopedice	4
2. Ingineria tisulară. Direcții pentru utilizarea nanoparticulelor în ingineria tisulară	5
3. Nanoparticule. Caracteristici și metode de obținere	6
4. Tehnici de depunere laser	7
Contribuții originale	8
5. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor de PLGA cu alendronat	8
6. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor de PLGA cu ciprofloxacina	9
7. Optimizarea formulării prin studiu de design experimental	10
8. Cedarea ciprofloxacinei din sisteme de cedare	11
9. Determinarea activității antimicrobiene	13
Concluzii	14

Cuvinte cheie: infecții ortopedice, nanoparticule de PLGA, ciprofloxacina, sisteme de cedare, design experimental

Introducere

În prezent există un interes crescut pentru ingineria tisulară și terapiile regenerative, având în vedere numărul crescut de pacienți cu diferite traumatisme sau afecțiuni musculoscheletale, corelat cu creșterea speranței de viață. Mai mult, nevoia de a accelera procesul de vindecarea a fracturilor osoase și de a trata diferitele fracturi a dus la considerarea unui număr variat de medicamente care să determine regenerarea țesutului osos, în combinație cu ingineria tisulară; printre acestea se numără și bifosfonații.

Chirurgia ortopedică și traumatismele pot determina apariția infecțiilor. Aceste complicații apar numai în 5% din cazuri, dar tratamentul este complicat din cauza formării biofilmului bacterian și a accesului limitat al medicamentului la nivelul zonei infectate în cazul unei administrări sistemice a acestuia.

Osteomielite cronică este o afecțiune inflamatorie cronică, indusă de o infecție osoasă. Aceasta poate afecta o singură porțiune a osului sau zone multiple ca măduva osoasă, țesutul osos compact, periost sau alte țesuturi adiacente. În ciuda noilor descoperiri medicale sau chirurgicale, aceasta a rămas o provocare întrucât poate persista timp de săptămâni, luni sau chiar ani, fiind necesar un management prelungit și complex din punct de vedere al naturii intervențiilor chirurgicale și al tratamentului cu antibiotice necesar.

Procedura chirurgicală standard presupune înlăturarea țesutului osos și țesutului moale infectat, o procedură descrisă în literatură ca "debridare", urmată de terapie bazată pe antibiotice administrată sistemic, oral sau intravenos pe o durată extinsă de timp (cel puțin 4 sau 6 săptămâni) cu posibilitatea unor efecte adverse și de asemenea cu nevoia de a extinde durata de spitalizare. Astfel, tratamentul local al infecțiilor osoase a devenit intens studiat.

Ținând cont de progresele realizate în biotehnologie, s-a încercat cedarea țintită a agenților antimicrobieni la nivelul biofilmului. De aceea sistemele de cedare a medicamentelor (DDS) au atras atenția întrucât obținerea unor alogrefe cu ajutorul nanoparticulelor polimerice asigură o cedare controlată a medicamentelor. Avantajul

acestora constă în faptul că medicamentul este cedat la nivelul țesutului de interes, respectiv țesutul osos, într-o concentrație optimă, evitându-se astfel efectele adverse.

Micro/nanoparticulele sunt formate din biomateriale și o substanță activă. Întrucât substanțele active pot avea un timp de înjumătățire redus, pot fi rapid hidrolizate sau degradate in vivo, microîncapsularea se poate utiliza pentru a proteja substanța activă de degradare și pentru a asigura cedarea acesteia la concentrația necesară. În funcție de natura polimerului folosit (biodegradabil sau nebiodegradabil), aceștia pot dispărea în timp din locul unde au fost administrați sau se pot menține acolo pe toată durata vieții pacientului.

Stadiul actual al cunoașterii

1. Managementul infecțiilor ortopedice

Osul este unul dintre materialele cele mai atractive create de către natură. Este ușor dar extrem de dur, adaptabil și regenerabil.

În ciuda progreselor recente în tehnicile chirurgicale și terapiile bazate pe antibiotice, management-ul osteomielitei cronice rămâne o provocare în chirurgia ortopedică, costul acestor tratamente rămânând ridicat din cauza necesității terapiei prelungite

Osteomielita este o infecție a oaselor cauzată în special de *Staphylococcus aureus*, care aderă pe suprafața acestora, dezvoltând un biofilm ce îi asigură protecția împotriva tratamentului bazat pe antibiotice. Astfel, *Staphylococcus aureus* este responsabil pentru 20%-30% dintre infecțiile ortopedice, iar *Stafilococul coagulazo-negativ* pentru 20-40% de cazuri.

Biofilmul este format dintr-o comunitate de microorganisme încorporate într-o matrice extracelulară ce se formează pe anumite suprafețe. Bacteriile din biofilm sunt protejate de agenții antimicrobieni și de sistemul imun al gazdei. Sensibilitatea redusă a bacteriilor din biofilm față de antibiotice se datorează dezvoltării lente a acestora, a prezenței subpopulațiilor bacteriene rezistente și prezenței unui micromediu în interiorului biofilmului ce împiedică activitatea antibacteriană.

Până în prezent tratamentul implică de fiecare dată tratamentul chirurgical, întrucât antibioticele ca monoterapie nu pot eradica biofilmul. Tratamentul chirurgical presupune îndepărtarea zonei infectate, procedeu ce poartă denumirea de debridare. Aceasta este urmată de administrarea unui tratament cu antibiotic pe cale sistemică pe o perioadă ce poate varia de la câteva săptămâni la luni. Antibioticele administrate pe cale sistemică sunt asociate cu o serie de efecte adverse, incluzând nefrotoxicitate și ototoxicitate, ce poate reprezenta o problemă atunci când se încearcă obținerea unei concentrații suficiente a antibioticului la nivelul zonei infectate sau la nivelul biofilmului.

Față de tratamentul sistemic, tratamentul local prezintă numeroase avantaje. Întrucât antibioticul este plasat direct în zona adiacentă infecției de interes și de asemenea nu este necesară existența unui sistem vascular intact pentru cedarea antibioticului. Acest lucru este benefic în special în cazul pacenților ce au suferit traumatisme.

Considerând rezultatele bacteriologice obținute în osteomielite cronică, cele mai folosite antibiotice în sistemele cu cedare locală sunt aminoglicozidele, beta-lactamicele și fluorochinolonele.

Ciprofloxacina (CIP) este un antibiotic cu spectru larg fiind o quinolonă de a doua generație. Este folosită în mod curent în infecțiile osoase deoarece prezintă o concentrație minimă inhibitorie joasă (0.25-2 $\mu\text{g/ml}$) pentru majoritatea patogenilor printre care și *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* și *Pseudomonas aeruginosa*.

2. Ingineria tisulară. Direcții pentru utilizarea nanoparticulelor în ingineria tisulară

Ingineria țesutului osos urmărește reconstrucția țesutului prin combinarea materialelor biodegradabile, celulelor izolate din țesutul țintă sau a celulelor stem pluripotente.

Artroplastia totală de șold sau de genunchi este o procedură chirurgicală standardizată în chirurgia ortopedică. Aceasta este utilizată pentru a reduce durerea și

pentru a îmbunătăți calitatea vieții în cazul acestor intervenții. Succesul acesteia depinde de fixarea rapidă a componentelor protetice în osul format la suprafață.

Osteoliza reprezintă cauza principală în cazul deteriorării unor componente ale protezelor ortopedice. Schemele terapeutice ce folosesc medicamente antiresorbtive sau compuși nou descoperiți pentru sănătatea oaselor pot evita pierderile osoase. În acest sens bifosfonații (BP) sunt o clasa de medicamente antiresorbtive ce inhibă activitatea osteoclastelor.

În ultima decadă atenția a fost îndreptată spre utilizarea micro și nanoparticulelor drept componente funcționale pentru regenerarea țesutului osos. Implanturile formate din micro și nanoparticule prezintă o serie de avantaje comparativ cu cele clasice precum un control îmbunătățit asupra cedării prelungite a agenților terapeutici sau utilizarea micro/nanoparticulelor pentru a îmbunătăți proprietățile mecanice ale implanturilor.

3. Nanoparticule. Caracteristici și metode de obținere

Un sistem de cedare controlată bine formulat poate îmbunătăți problemele terapiei convenționale și poate crește eficacitatea terapeutică a unui anumit medicament.

Pentru a obține o eficacitate maximă este necesară cedarea medicamentului la nivelul țesutului de interes într-o cantitate optimă și în intervalul de timp potrivit astfel încât toxicitatea și efectele adverse să fie minime.

Există mai multe abordări pentru cedarea controlată a medicamentului la nivelul țesutului țintă. O astfel de abordare este utilizarea microparticulelor/ nanoparticulelor ca sisteme de cedare controlată.

Obținerea micro/nanoparticulelor se poate realiza prin metode variate:

- coacervare
- reacții de policondensare interfacială
- metoda de evaporare a solventului
- metoda spray drying
- metoda de extragere a solventului

Prepararea nanoparticulelor trebuie realizată astfel încât să se îndeplinească criteriile precum includerea unei concentrații cât mai ridicate de medicament, stabilitatea produsului obținut, cedarea controlată a medicamentului pe un interval de timp cât mai îndelungat sau biocompatibilitate și biodegradare controlabilă.

Polimerii folosiți în preparatele farmaceutice trebuie să fie biocompatibili și biodegradabili. Biodegradabil se referă la calitatea de a fi descompus în componente netoxice care pot fi metabolizate sau excretate. Biocompatibil se referă la compușii care sunt bine tolerați și nu produc efecte adverse locale sau sistemice după administrare.

Pentru dezvoltarea sistemelor cu cedare controlată, cei mai folosiți sunt polimerii și copolimerii acidului lactic întrucât aceștia sunt siguri și au fost aprobați de FDA (Food and Drug Administration) pentru a fi utilizați pe oameni. Aceștia se pot descompune prin hidroliză în componentele lor care sunt produși metabolici uzuali.

4. Tehnici de depunere laser

Depunerea laser pulsată (PLD) este o metodă eficientă și foarte flexibilă ce poate fi folosită pentru obținerea unor filme subțiri ale compușilor de interes. Tehnica PLD folosește un fascicul laser pulsant pentru depunerea unui film subțire a unui compus anorganic solid pe un substrat.

Întrucât PLD nu este o metodă întotdeauna adecvată pentru depunerea unor materiale delicate ca polimeri sau materiale organice, s-au considerat alte metode de depunere bazate pe laser. Tehnica Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation (Evaporarea laser pulsată asistată de matrice) (MAPLE) reușit depunerea cu succes a unor filme subțiri și uniforme de compuși organici de tipul carbohidraților și a polimerilor acestora. Față de metoda PLD, tehnica MAPLE este o variantă mai puțin agresivă.

Atât prin metoda MAPLE cât și PLD se poate controla ușor grosimea filmului depus comparativ cu metode mai puțin costisitoare ca drop casting. Spre deosebire de PLD, tehnica MAPLE protejează mai bine structura materialului țintă, întrucât majoritatea nanoparticulelor/microsferelor sunt delicate și fragile.

Contribuții originale

5. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor de PLGA cu alendronat

Metoda aleasă în acest studiu pentru prepararea nanoparticulelor de PLGA cu alendronat este microîncapsularea prin evaporarea solventului. În urma degradării nanoparticulele obținute astfel eliberează lent cu o anumită viteză alendronatul inclus.

Nanoparticulele de alendronat cu PLGA au fost investigate prin spectrometrie în IR cu transformată Fourier. Astfel atât în spectrul PLGA cât și în spectrul nanoparticulelor pot fi observate picurile caracteristice vibrației de întindere a grupărilor C-OH și (CO)-OC, în intervalul 1300-1000 cm^{-1} .

Prezența picurilor caracteristice grupărilor esterice sugerează că structura polimerului nu a fost afectată în timpul procesului de obținere a nanoparticulelor. De asemenea întrucât nu există o deplasare a benzilor caracteristice celor doi compuși în spectrul nanoparticulelor sugerează că nu există o interacțiune între PLGA și alendronat în nanoparticulele sintetizate.

Gradul de includere sau eficiența încapsulării a fost determinat după extragerea alendronatului din nanoparticule. În urma analizei HPLC am determinat eficiența încapsulării alendronatului ca fiind de 13.24%.

Pentru a studia profilul de cedare al alendronatului s-au obținut sisteme de cedare de tip grefă osoasă prin comprimarea a 100 mg de nanoparticule uscate.

Profilul de cedare al alendronatului din nanoparticulele de PLGA se caracterizează printr-o cedare de tip burst în primele 2 zile urmând ca apoi cedarea alendronatului să se realizeze cu o viteză constantă și lentă până la 20 de zile, ceea ce permite un contact prelungit în imediata apropiere a implantului. Acest profil de cedare este caracteristic sistemelor cu cedare prelungită, unde cedarea se realizează prin mecanisme de difuzie și eroziune a matricei polimerice.

6. Sinteza și caracterizarea fizico-chimică a nanoparticulelor de PLGA cu ciprofloxacina

Există mai multe metode ce pot fi folosite la încapsularea medicamentelor prin tehnica evaporării solventului. Natura hidrofilă sau hidrofobă a medicamentului este un factor decisiv în stabilirea metodei de încapsulare a acestuia.

În acest studiu au fost alese două metode pentru obținerea nanoparticulelor cu ciprofloxacina:

- Metoda emulsiei duble A/U/A
- metoda dispersiei U/A (S/U/A).

În urma caracterizării prin FTIR a nanoparticulelor de PLGA cu ciprofloxacina au putut fi observate atât în spectrul PLGA cât și în spectrul nanoparticulelor picul intens de la 1750 cm^{-1} ce se datorează absorbției grupării carbonil și picurile caracteristice vibrației de întindere a grupărilor C-OH și (CO)-OC în intervalul $1300\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$. Aceste picuri sunt caracteristice grupărilor esterice ceea ce sugerează că structura polimerului nu a fost afectată în timpul procesului de obținere a nanoparticulelor.

Eficiența încapsulării a fost determinată după extragerea ciprofloxacinei din nanoparticule prin metoda HPLC. Astfel s-a determinat gradul de includere ca fiind 9.32% pentru nanoparticulele obținute prin metoda A/U/A în timp ce pentru nanoparticulele obținute prin metoda S/U/A eficiența încapsulării a fost de 27.78%.

Pentru determinarea dimensiunii nanoparticulelor, s-au folosit măsurătorile de difuzie dinamică a luminii (DLS) cu un instrument BROOKHAVEN 90 PLUS. DLS este folosit pentru determinarea dimensiunii nanoparticulelor Browniene în suspensii coloidale în intervalul nano și submicronic. Lumina monocromatică (laser) este trimisă într-o soluție cu particule sferice în mișcare Browniană, cauzând un efect Doppler atunci când lumina întâlnește particulele în mișcare. Astfel se modifică lungimea de undă a sursei luminoase. Această modificare este direct proporțională cu dimensiunea particulelor.

Am determinat dimensiunea nanoparticulelor din PLGA cu ciprofloxacina cu o concentrație a PLGA de 1%, 5% și respectiv 10% obținute la 500 rpm, 1000 rpm și respectiv 1500 rpm. Astfel probele prezintă o distribuție (pe volum) bimodală fiind

prezente două intervale granulometrice de ordin nanometric și micrometric, iar în ceea ce privește distribuția pe număr predomină în general un singur interval cu dimensiuni de ordin nanometric .

Conform Mobarak et al dimensiunea nanoparticulelor joacă un rol esențial în difuzia acestora în celule. Se consideră că difuzia microparticulelor în celule crește pe măsură ce dimensiunea particulelor scade. Acest fenomen are loc până la o dimensiune a nanoparticulelor de 100 nm, întrucât sub această dimensiune celulele nu mai reușesc să internalizeze particulele.

Potențialul zeta a fost determinat folosind accesoriul BI-ZETA al aparatului BROOKHAVEN 90 PLUS. Valoarea medie a potențialului zeta a fost de -40.8 mV. Smeets et al au observat că un potențial negativ al compozitului de calciu bifazic este favorabil pentru regenerarea osoasă și osteointegrare.

7. Optimizarea formulării prin studiu de design experimental

Pentru a controla cantitatea de ciprofloxacina inclusă în nanoparticulele de PLGA am realizat un studiu de design experimental prin metoda *Full Factorial (2 levels) design, interaction model*, folosind programul MODDE 9.1. de design experimental (DoE – Design of Experiments).

Designul experimental este definit ca o strategie de realizare a experimentelor într-un mod în care informația necesară să fie obținută cât mai eficient și mai precis posibil, cu un management al timpului și al cheltuielilor foarte bun.

Există o serie de parametri ce pot fi variați pentru a influența dimensiunea particulelor, eficiența încapsulării și morfologia particulelor: vâscozitatea fazei dispersate, cantitatea de medicament adăugată în faza dispersată, viteza de agitare a emulsiei dispersie, temperatura și presiunea de lucru.

Dintre acești parametri au fost aleși spre analiză 3 factori:

- Concentrație PLGA (%) cu valori cuprinse în intervalul [1,10]
- Cantitate Ciprofloxacina (mg) cu valori cuprinse între [5,35]
- Viteza de agitare (rpm) cu valori cuprinse în intervalul [500,1500]

Răspunsurile, respectiv variabilele dependente permit caracterizarea sistemului care se studiază. Pentru că numărul de variabile independente nu influențează numărul de determinări experimentale ale planului experimental, pentru a avea o caracterizare cât mai completă a fenomenului, am ales 2 răspunsuri:

- Eficiența încapsulării ciprofloxacinei exprimată în EE % (w/w)
- Dimensiunea particulelor exprimată în nm

Astfel pentru a obține o eficiență de încapsulare mare a ciprofloxacinei și dimensiuni mici ale particulelor obținute se recomandă creșterea concentrației de PLGA și scăderea concentrației ciprofloxacinei, la valori mari ale Vitezei de agitare.

Aceste rezultate sunt confirmate și de alți autori care au observat că prin creșterea vâscozității se modifică substanțial dimensiunea particulelor și se îmbunătățește eficiența de încapsulare a medicamentului. Faptul că o viteză de agitare mare determină obținerea unor particule de dimensiuni mai mici este confirmat și de Yang et al. Acest fenomen poate fi explicat prin faptul că emulsia secundară este divizată în picături mai mici datorită forței mărite ceea ce duce concomitent și la reducerea distribuției dimensiunii micro/nanoparticulelor. [108, 146]

8. Cedarea ciprofloxacinei din sisteme de cedare

Pentru a determina cedarea ciprofloxacinei, am realizat sisteme de cedare de tip grefă din nanoparticulele de PLGA cu ciprofloxacina. S-au realizat următoarele tipuri de comprimate nanoparticule de PLGA cu ciprofloxacina, nanoparticule de PLGA cu ciprofloxacina : pulbere de hidroxiapatită NP: HA (25:75), nanoparticule de PLGA cu ciprofloxacina : pulbere de hidroxiapatită NP: HA (50:50), nanoparticule de PLGA cu ciprofloxacina : pulbere de hidroxiapatită NP: HA (75:25, pulbere de hidroxiapatită în amestec cu ciprofloxacina

De asemenea am obținut sisteme de cedare de tip implant prin depunerea unui film de nanoparticule de PLGA cu ciprofloxacina pe suporturi de titan. Astfel am utilizat tehnica de depunere MAPLE pentru transferul nanoparticulelor PLGA-CIP, iar depunerea acestora s-a realizat în cadrul Laboratorului Interacțiuni Laser-Suprafață-

Plasma (LSPI), Secția Laseri, Institutul Național pentru Fizica Laserilor, Plasmei și Radiației București.

Astfel s-a evaluat in vitro capacitatea acestor formulări de a prelungi cedarea ciprofloxacinei, întrucât din comprimatul în care ciprofloxacina a fost comprimată în amestec cu hidroxiapatita cedarea acesteia a fost completă în 24 de ore.

Din rezultatele prezentate se poate observa că atât probele ce conțin numai nanoparticule cât și probele ce conțin amestec de nanoparticule și hidroxiapatită prezintă un profil de cedare împărțit în două etape. Astfel cedarea corespunzătoare primelor 3 zile corespunde unei cedări rapide de tip burst. Această cedare este caracteristică tuturor probelor, iar în această etapă se cedează aproximativ 60% din ciprofloxacina. Cedarea în acest caz urmărește o cinetică de tip 1. Apoi cedarea se realizează după o cinetică de ordinul 0 care este caracteristică pentru sistemele cu cedare prelungită. În cazul tuturor probelor cedarea s-a realizat până la 45 de zile după o cinetică mixtă. Astfel asocierea nanoparticulelor cu pulberea de hidroxiapatită nu influențează profilul de cedare al ciprofloxacinei din nanoparticule.

Cedarea rapidă de tip burst se datorează solubilizării ciprofloxacinei adsorbită pe suprafața polimerului sau difuziei ciprofloxacinei aflată în apropierea suprafeței polimerului. În momentul în care proba vine în contact cu mediul de cedare, ciprofloxacina difuzează rapid. S-a observat că această etapă este caracteristică sistemelor cu cedare prelungită.

A doua fază reprezintă cedarea medicamentului încapsulat în nanoparticule. Astfel am observat că solubilizarea ciprofloxacinei se realizează cu o viteză constantă și lentă, ceea ce permite prezența medicamentului în zona adiacentă implantului pe o perioadă extinsă de timp.

Într-un studiu anterior am realizat cedarea ciprofloxacinei din sisteme de cedare de tip grefă osoasă obținute prin sinteza chimică a unui compozit HA – CIP. Profilul de cedare al ciprofloxacinei este asemănător profilului de cedare obținut în acest studiu, cedarea realizându-se însă în acest caz până la 30 de zile. În plus în acest studiu are loc initial o cedare de tip burst ce este de dorit întrucât asigură rapid o concentrație locală de antibiotic ridicată, evitându-se astfel dezvoltarea rezistenței antibacterine

Profilul de cedare al ciprofloxacinei încapsulată în nanoparticulele de PLGA depuse prin MAPLE pe plăcuțe de titan este caracterizat printr-o cedare de tip burst în primele 48 de ore când aproximativ 60% din cantitatea de ciprofloxacină a fost eliberată, urmând ca apoi aceasta să se elibereze mai lent așa cum a fost observat și în cazul sistemelor de cedare de tip grefă. În acest caz cedarea ciprofloxacinei s-a realizat pe durata a 10 zile, ceea ce se poate datora cantității mici depuse și faptului că nanoparticulele au fost depuse sub forma unui film subțire

Profilul de eliberare a fost investigat folosind modelul Higuchi și Korsmeyer-Peppas. Astfel în urma aplicării modelului Higuchi s-a obținut un coeficient de corelare de 0.98 ceea ce sugerează că procesul de difuzie intervine în cedarea ciprofloxacinei din nanoparticulele depuse. De asemenea, după aplicarea modelului Korsmeyer-Peppas, s-a obținut un coeficient de corelare de 0.97, iar valoarea lui n a fost 0.63. Întrucât valoarea lui n a fost cuprinsă între 0.45 și 0.95 se consideră că pe lângă difuzie, cedarea ciprofloxacinei este influențată și de procesul de eroziune.

9. Determinarea activității antimicrobiene

Scopul acestui studiu este de a determina dacă prin procesul de includere al CIP în nanoparticulele de PLGA și depunerea acestora pe suporturi de titan activitatea antimicrobiană a ciprofloxacinei este modificată.

În această etapă am urmărit determinarea efectului antimicrobian al sistemelor de cedare de tip grefă și a sistemelor de cedare de tip implant prin metoda difuzimetrică.

De aceea s-au realizat antibiograme pentru a testa prin metoda difuzimetrică, sensibilitatea bacteriilor de tipul *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) și *S. Aureus meticilin rezistent* (ATCC 43300) la acțiunea ciprofloxacinei încapsulate în nanoparticulele de PLGA.

Ca referință s-a luat efectul ciprofloxacinei asupra tulpinilor de referință.

În această etapă s-a urmărit respectarea standardelor elaborate de CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) în realizarea și interpretarea antibiogramelor realizate prin metoda difuzimetrică.

Pentru pregătirea mediului Mueller-Hinton s-a turnat geloză nutritivă în plăci Petri, în strat uniform de 4 mm. Metoda aleasă pentru realizarea inoculului este suspendarea directă a coloniilor. Turbiditatea suspensiei preparate a fost standardizată la 1.5×10^8 CFU/ml. Citirea rezultatelor s-a efectuat utilizând o riglă gradată, prin măsurarea cu ochiul liber a diametrului zonelor de inhibiție (mm). Rezultatele prezentate au fost obținute în urma efectuării mediei aritmetice a diametrelor corespunzătoare a trei testări.

Astfel pentru sistemele de cedare de tip grefă osoasă, diametrul zonei de inhibiție este de 32 mm în cazul antibiogramei realizate pe *Staphilococcus aureus* și 24 mm în cazul antibiogramei realizate pe *S. Aureus* meticilin rezistent, ceea ce sugerează că ambii germeni sunt sensibili la comprimatele cu ciprofloxacina. În cazul sistemelor de cedare de tip implant, s-a obținut o zonă de inhibiție de 22 mm, pentru *S. Aureus*, ceea ce sugerează că acest germen este sensibil la acțiune filmelor depuse pe plăcuțe de titan. Ciprofloxacina încapsulată a inhibat treptat creșterea bacteriilor, iar la 24 de ore când s-a realizat citirea zonelor de inhibiție, ciprofloxacina a fost eliberată în proporție de numai 30%.

Din rezultatele prezentate anterior se observă că prin includerea ciprofloxacinei în nanoparticule de PLGA activitatea antibioticului se păstrează.

Concluzii

În această teză de doctorat, scopul studiilor realizate este crearea unor sisteme de cedare de tip grefă osoasă și de tip implant pe baza nanoparticulelor polimerice.

Obiectivele acestui studiu:

- Sinteza nanoparticulelor de PLGA cu alendronat prin metoda evaporării solventului dintr-o emulsie dublă de tip A/U/A și caracterizarea fizico-chimică prin Spectrometrie IR cu Transformată Fourier. De asemenea s-au folosit metode cromatografice HPLC pentru determinarea eficienței de încapsulare și evaluarea profilului de cedare al alendronatului din sistemele de cedare de tip grefă osoasă.

- Sinteza nanoparticulelor de PLGA cu ciprofloxacina prin două metode: evaporarea solventului dintr-o emulsie dublă de tip A/U/A și respectiv evaporarea solventului dintr-o emulsie – suspensie de tip S/U/A.
- Obținerea unor sisteme de cedare de tip grefă prin comprimarea nanoparticulelor de PLGA cu ciprofloxacina și a pulberii de HA și a unor sisteme de cedare de tip implant prin depunerea nanoparticulelor pe suporturi de titan, folosind tehnica MAPLE.
- Caracterizarea nanoparticulelor cu ciprofloxacina și a filmelor depuse prin Spectrometrie IR cu Transformată Fourier și prin difuzie dinamică a luminii (DLS) în vederea evaluării potențialului zeta și a distribuției dimensiunii. Morfologia nanoparticulelor a fost evaluată prin microscopie SEM.
- realizarea unui studiu de design experimental în vederea realizării controlului asupra cantității de ciprofloxacina incluse în nanoparticule și de asemenea asupra dimensiunii prin metoda *Full Factorial (2 levels) design, interaction model*.
- Evaluarea profilului de cedare al ciprofloxacinei din sisteme de cedare de tip grefă osoasă și respectiv din sisteme de cedare de tip implant
- determinarea efectului antimicrobian al sistemului de cedare de tip grefă osoasă și respectiv al sistemului de cedare de tip implant asupra germenilor de tipul *Staphilococcus aureus* (ATCC 25923) și *S. Aureus meticilin rezistent* (ATCC 43300) prezenți în mod frecvent în infecțiile ortopedice.

Astfel din rezultatele prezentate se poate observa că atât probele ce conțin numai nanoparticule cât și probele ce conțin amestec de nanoparticule și hidroxiapatită prezintă un profil de cedare împărțit în două etape. Prima parte a curbei respectiv cedarea corespunzătoare primelor 3 zile corespunde unei cedări rapide de tip burst, ce este utilă în cazul infecțiilor osoase întrucât asigură rapid o concentrație locală eficientă asupra germenilor prezenți în infecțiile locale. Apoi cedarea s-a realizat cu o viteză constantă până la 45 de zile. Astfel cedarea ciprofloxacinei se realizează cu o viteză constantă și lentă, ceea ce permite prezența medicamentului în zona adiacentă implantului pentru o perioadă extinsă de timp.

De asemenea am urmărit dacă prin procesul de includere al CIP în microparticulele de PLGA și depunerea acestora pe suporturi de titan activitatea

antimicrobiană a ciprofloxacinei este modificată și am determinat că prin includerea ciprofloxacinei în nanoparticule de PLGA activitatea antibioticului se păstrează.

Această lucrare de doctorat oferă o serie de noi direcții de cercetare precum includerea în nanoparticule polimerice a altor medicamente din clasa bifosfonaților și a antibioticelor; includerea nanoparticulelor în matrice HA – Colagen cu aplicații în afecțiuni ale țesutului osos și respectiv realizarea unor teste de cedare in vivo pe animale de experiență.

Bibliografie selectivă

1. Cattalini J, Boccaccini A, Lucangioli S, Mouriño V. Bisphosphonate-Based Strategies for Bone Tissue Engineering and Orthopedic Implants. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2012; 18(5):323-40.
4. Paulo F, Santos L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. *Materials Science and Engineering: C*. 2017; 77:1327-40.
7. Ding C, Chen Z, Li J. From molecules to macrostructures: recent development of bioinspired hard tissue repair. *Biomaterials Science*. 2017; 5(8):1435-49.
10. Kabore C, Wouters A, Fripiat F, Gillet P. Management of chronic osteomyelitis by long-term antibiotic suppression. *Revue Medicale Liege*. 2017; 72(7-8):363-68.
11. Ciocilteu MV, Mocanu AG, Mocanu A, Ducu C, Nicolaescu O, Manda VC, Turcu-Stiolica A, Nicolicescu C, Melinte R, Balasoiu M, Croitoru O, Neamtu J. Hydroxyapatite-ciprofloxacin delivery system: Synthesis, characterisation and antibacterial activity. *Acta Pharmaceutica*. 2018;68(2):129-44.
17. Panteli M, Giannoudis PV. Chronic osteomyelitis: what the surgeon needs to know, *Efort Open Reviews*. 2016; 1(5):128–35.
28. Mobarak D, Salah S, Elkhashen S. Formulation of ciprofloxacin hydrochloride loaded biodegradable nanoparticles: optimization of technique and process variables. *Pharmaceutical Development and Technology*. 2013; 19(7):891-900.
38. Torbert JT, Joshi M, Moraff A, Matuszewski PE, Holmes A, Pollak AN, O'toole RV. Current bacterial speciation and antibiotic resistance in deep infections after operative fixation of fractures. *Journal of Orthopaedic Trauma*. 2015; 29(1):7-17.

52. Metssemakers WJ, Emanuel N, Cohen O, Reichart M, Potapova I, Schmid T, Segal D, Riool M, Kwakman PH, de Boer L, de Breij A, Nibbering PH, Richards RG, Zaat SA, Moriarty TF. A doxycycline-loaded polymer-lipid encapsulation matrix coating for the prevention of implant-related osteomyelitis due to doxycycline-resistant methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Controlled Release*. 2015; 209:47-56.
53. Kanellakopoulou K, Giamarellos-Bourboulis EJ. Carrier Systems for the Local Delivery of Antibiotics in Bone Infections. *Drugs*. 2000; 59(6):1223-32.
73. Wang H, Leeuwenburgh S, Li Y, Jansen J. The Use of Micro- and Nanospheres as Functional Components for Bone Tissue Regeneration. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2012; 18(1):24-39.
76. Neamtu J, Bubulica MV, Rotaru A, Ducu C, Balosache OE, Manda CV, Turcu-Stiolica A, Nicolicescu C, Melinte R, Popescu M, Croitoru O. Hydroxyapatite–alendronate composite systems for biocompatible materials. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*. 2016;127(2):1567-82.
97. Azouz L, Dahmoune F, Rezgui F, Sell C. Full factorial design optimization of antiinflammatory drug release by PCL –PEG–PCL microspheres. *Materials Science and Engineering C*. 2016; 58:412–19.
98. Kadam NR, Suvarna V. Microspheres: a brief review. *Asian Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences*. 2015; 5(47):13-9.
108. Li M, Rouaud O, Poncelet D. Microencapsulation by solvent evaporation: State of the art for process engineering approaches. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008; 363(1-2):26-39.
135. Yang S, Zhang J. Matrix-Assisted Pulsed Laser Evaporation (MAPLE) technique for deposition of hybrid nanostructures. *Frontiers in Nanoscience and Nanotechnology*. 2017;3(1).
136. Neamtu J, Mihailescu I, Ristoscu C, Hermann J. Theoretical modelling of phenomena in the pulsed-laser deposition process: Application to Ti targets ablation in low-pressure N₂. *Journal of Applied Physics*. 1999; 86(11):6096-106.

141. Deca AG, Belu I, Croitoru O, Bubulica MV, Manda CV, Neamtu J. Formulation and In Vitro Evaluation of Alendronate Sodium /PLGA Microspheres for Applications in Bone Related Disorders. *Current Health Sciences Journal*. 2015; 41(3):246-250
143. Billon-Chabaud A, Gouyette A, Merle C, Bouler J. Development of bisphosphonates controlled delivery systems for bone implantation: influence of the formulation and process used on in vitro release. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 2010;21(5):1599-604.
144. Mocanu AG, Belu I, Croitoru O, Ciocalteu MV, Manda CV, Neamtu J. Formulation and Characterization of Ciprofloxacin loaded PLGA Microspheres for Applications in Orthopedic Infections. *Current Health Sciences Journal*. 2017;43(4):306-10.
150. Mocanu AG, Turcu-Stiolica A, Belu I, Ciocilteu MV, Manda VC, Nicolicescu C, Neamtu J. Quality by design for ciprofloxacin encapsulation in PLGA: Factors assessment followed by screening and optimization. *Revista de chimie*.
151. Montgomery DC. Design and analysis of experiments, 5th ed., Wiley, New York, 2001.
155. Weissman S, Anderson N. Design of Experiments (DoE) and Process Optimization. A Review of Recent Publications. *Organic Process Research & Development*. 2014;19(11):1605-1633.
162. Yang YY, Chung TS, Bai XL, Chan WK. Effect of preparation conditions on morphology and release profiles of biodegradable polymeric microspheres containing protein fabricated by double-emulsion method. *Chemical Engineering Science*. 2000; 55(12): 2223–36.
168. Blondeau JM. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Survey of Ophthalmology*. 2004; 49(2):S73–8.
172. Cavalieri S. Manual of antimicrobial susceptibility testing. Washington, DC: American Society for Microbiology; 2009.
176. Clinical and Laboratory Standards Institute, Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. Approved standard M2-A10, 2009 Wayne, PA Clinical and Laboratory Standards Institute.