

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE DIN CRAIOVA
ȘCOALA DOCTORALĂ



REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

SINTEZA CHIMICĂ ȘI CARACTERIZAREA UNOR COMPOZIȚII AI HIDROXIAPATITEI

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

PROF. UNIV. DR. JOHNY NEAMȚU

STUDENT-DOCTORAND:

BALOSACHE (NICOLAESCU) OANA ELENA

CRAIOVA
2014

CUPRINS

ABREVIERI

INTRODUCERE

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL 1. HIDROXIAPATITA – COMPONENTĂ ESENȚIALĂ A OSULUI

- 1.1. Structura macroscopică a osului
- 1.2. Structura microscopică a osului (mezostructura și microstructura osului)
- 1.3. Nanostructura osului
- 1.4. Histogeneza osului
- 1.5. Bioceramica pe bază de fosfați de calciu
- 1.6. Proprietățile hidroxiapatitei
- 1.7. Metode de sinteză
 - 1.7.1. Metoda precipitării umede
 - 1.7.2. Sinteza hidrotermală
 - 1.7.3. Sinteza sol – gel
 - 1.7.4. Metoda emulsiei multiple
 - 1.7.5. Sinteza biomimetică
 - 1.7.6. Electrodepunerea

CAPITOLUL 2. BIFOSFONAȚII ÎN PRACTICA TERAPEUTICĂ CURENTĂ

- 2.1. Clasificarea bifosfonaților
- 2.2. Relația structură-activitate
- 2.3. Date farmacologice
 - 2.3.1. Indicații terapeutice
 - 2.3.2. Mecanismul de acțiune al bifosfonaților
 - 2.3.3. Efecte adverse în tratamentul sistemic cu bifosfonați

CONTRIBUȚII ORIGINALE

CAPITOLUL 3. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A ALENDRONATULUI DE SODIU TRIHIDRAT

- 3.1. Studiul solubilității alendronatului
 - 3.1.1. Materiale și metode
 - 3.1.2. Rezultate și discuții
- 3.2. Calculul constantelor de disociere a alendronatului prin titrare potențiometrică
 - 3.2.1. Materiale și metode
 - 3.2.2. Rezultate și discuții
- 3.3. Biodisponibilitatea alendronatului

CAPITOLUL 4. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA COMPOZIȚILOR HIDROXIAPATITĂ-ALENDRONAT

- 4.1. Materiale și metode
 - 4.1.1. Sinteza hidroxiapatitei prin metoda precipitării umede
 - 4.1.2. Sinteza compozitului hidroxiapatită-alendronat
 - 4.1.3. Caracterizarea FT-IR
 - 4.1.4. Caracterizarea prin difracție de raze X
 - 4.1.5. Determinarea dimensiunii particulelor
 - 4.1.6. Determinarea concentrației de alendronat din compozit și a eficienței de incorporare prin HPLC
- 4.2. Rezultate și discuții
 - 4.2.1. Sinteza

- 4.2.2. Caracterizarea FT-IR
- 4.2.3. Caracterizarea prin difracție de raze X
- 4.2.4. Determinarea dimensiunii particulelor
- 4.2.5. Determinarea concentrației de alendronat din compozit și a eficienței de incorporare prin HPLC
- 4.3. Optimizarea sintezei HA-AL
- 4.4. Modelarea sintezei cu ajutorul design-ului experimental MODDE
 - 4.4.1. Metodă
 - 4.4.2. Rezultate și discuții

CAPITOLUL 5. DEPUNEREA COMPOZITULUI HA-AL 20 mM PE SUBSTRATURI METALICE DE TITAN ȘI CARACTERIZAREA ACESTUIA

- 5.1. Depunerea compozitului HA-AL 20 mM pe substraturi metalice de titan prin evaporare laser pulsată (MAPLE)
 - 5.1.1. Materiale și metode
 - 5.1.2. Rezultate și discuții
- 5.2. Caracterizarea compozitului HA-AL 20 mM depus pe Ti prin AFM
 - 5.2.1. Materiale și metode
 - 5.2.2. Rezultate și discuții

CAPITOLUL 6. TESTAREA BIOCOMPATIBILITĂȚII BIOMATERIALELOR HA-AL

- 6.1. Materiale și metode
- 6.2. Rezultate și discuții
 - 6.2.1. Proliferarea celulelor osoase umane în prezența HA, alendronat și HA dopată cu alendronat
 - 6.2.2. Proliferarea celulelor stem mezenchimale umane pe filme de HA-AL

CAPITOLUL 7. STUDII DE CEDARE *IN VITRO* A ALENDRONATULUI DIN COMPOZIȚII HA-AL

- 7.1. Studii de cedare in vitro a alendronatului din tabletele de HA-AL 20 mM
 - 7.1.1. Mod de lucru
 - 7.1.2. Rezultate și discuții
- 7.2. Studii de cedare in vitro a alendronatului chemisorbit pe suprafața metalică pe care a fost depusă HA prin MAPLE
 - 7.2.1. Mod de lucru
 - 7.2.2. Rezultate și discuții
- 7.3. Studii de cedare in vitro a alendronatului din HA-AL depus pe substratul metalic de titan
 - 7.3.1. Materiale și metodă
 - 7.3.2. Rezultate și discuții

CONCLUZII GENERALE. CONTRIBUȚII ORIGINALE. PERSPECTIVE DE CERCETARE BIBLIOGRAFIE

- **Cuvinte cheie:** *compoziții hidroxiapatită-alendronat; caracterizare fizico-chimică; structuri de tip implant; studii de cedare și biocompatibilitate;*

ABREVIERI

HA – Hidroxiapatită
AL – alendronat
BF – bifosfonați
SBF – Fluid Corporal Simulat (Simulated Body Fluid)
HA-AL – compozit hidroxiapatită-alendronat
d-HA – hidroxiapatită calciu-deficitară
FT-IR – Spectrometria în infraroșu cu transformată Fourier
HPLC – Cromatografia de lichide de înaltă performanță
DAD – detector cu arie de diode
XRD – difracție de raze X
AFM – Microscopie de forță atomică
PLD - Depunere Laser Pulsată
NCP – proteine necolagenice
MAPLE - Evaporarea Laser Pulsată
SD - deviația standard
SRD – deviația standard relativă
OB – celule osteoblaste
DLS – măsurători de împrăștiere dinamică a luminii (Dynamic Light Scattering)
MCS – celule stem mezenchimale
LOD – limita de detecție
LOQ – limita de quantificare

INTRODUCERE

CONSIDERAȚII GENERALE

Recent, o atenție deosebită este acordată în rândul cercetătorilor obținerii unor biomateriale cu scopul de reconstrucție a țesutului osos. Dintre aceste biomateriale, hidroxiapatita (HA) prezintă o serie de proprietăți deosebite, precum biocompatibilitate și bioactivitate, aceasta fiind frecvent folosită pentru realizarea grefelor osoase și pentru acoperirea unor componente metalice ale unor proteze utilizate în ortopedie.

Chiar dacă HA este disponibilă ca material sintetic de mai bine de 15 ani, fiind folosită și în implantologia ceramică de peste un deceniu, se caută noi soluții de a include în structura acesteia anumiți substituenți anionici sau cationici care să apropie compoziția acesteia de apatita biologică.

Având în vedere că viabilitatea implantului depinde de procesele care au loc la interfața os-implant, optimizarea fizico-chimică a suprafeței implanturilor folosite în chirurgia ortopedică este fundamentală pentru realizarea unei integrări osoase consistente și rapide¹.

Există un mare interes în rândul fizicienilor, biologilor și medicilor de specialitate pentru dezvoltarea de suprafețe biomimetice formate din fosfat de calciu și proteine, care ar îmbunătăți aderența celulară și, astfel, ar fi redus timpul de integrare osoasă². Pentru a evita pierderea de os periprotetică, se poate implementa terapia antiresorbție medicamentoasă, realizată prin includerea bifosfonaților care inhibă activitatea osteoclastelor³. Bifosfonații sunt utilizați în multe boli, cum ar fi boala Paget a osului, osteoporoza, hipercalcemia⁴.

Deși efectul principal al bifosfonaților este inhibarea resorbției osoase a osteoclastelor, există studii care arată un efect pozitiv și asupra osteoblastelor. Astfel, numeroase studii arată o creștere diferențiată a celulelor progenitoare ale osteoblaștilor, cu influențe pozitive asupra proliferației și maturării lor. În același timp, aceste studii demonstrează că bifosfonații pot preveni apoptoza osteoblaștilor⁵.

OBIECTIVE PROPUSE

În încercarea de a evita problemele generate de protezare (pierderea osoasă) și eventualele efecte adverse ce pot apărea în tratamentul de lungă durată cu bifosfonați, o soluție studiată frecvent în ultimii ani este cedarea locală a bifosfonatului.

În felul acesta se poate administra o doză mai mare în regiunea de interes cu efecte atât asupra micșorării pierderii de volum osos în zona periprotetică, dar mai ales cu efecte pozitive asupra micșorării timpului de osteointegrare și de accelerare a fixării secundare a componentei protezei. Pe de altă parte se obține astfel o fixare stabilă și în cazul osului osteoporotic.

Implanturile cu eliberare locală de bifosfonați au fost testate în studii preclinice pe diferiți cobai (șobolan, iepure, câine), rezultatele fiind încurajatoare în ceea ce privește viabilitatea implantului.

Afinitatea înaltă a bifosfonaților pentru ionul de calciu și avantajele utilizării hidroxiapatitei (HA) ca strat de acoperire a implanturilor protetice a condus la:

- căutarea de noi soluții pentru a include medicamente pe suprafața protetică;
- necesitatea sintezei unui compozit hidroxiapatită-bifosfonat, care ar putea fi depus pe implantul metalic.

Astfel, în acest studiu ne-am propus obținerea unor structuri de tip implant obținute prin depunerea compozițiilor alendronat-hidroxiapatită (HA-AL), pe substraturi metalice de titan.

Din clasa bifosfonaților a fost ales pentru acest studiu alendronatul, un bifosfonat care conține în moleculă un atom de azot (similar structural cu risedronatul și zoledronatul), conformație structurală care potențează efectele terapeutice ale acestuia.

Teza este structurată în două părți : o parte de studii teoretice (capitolele 1-2) în care sunt descrise informații din literatura de specialitate și care reprezintă stadiul actual al cunoașterii în ceea ce privește domeniul abordat și o parte de contribuții proprii, structurată în cinci capitole (capitolele 3 – 7) și care prezintă rezultatele experimentale obținute.

STADIUL ACTUAL AL CUNOAȘTERII

CAPITOLUL 1. HIDROXIAPATITA – COMPONENTĂ ESENȚIALĂ A OSULUI

Capitolul 1 cuprinde un studiu bibliografic al literaturii de specialitate în care sunt descrise proprietățile hidroxiapatitei naturale ca și componentă esențială a osului și sunt comparate principalele metode de obținere a hidroxiapatitei sintetice. Astfel, metoda precipitării umede (denumită și precipitare chimică) aleasă și de noi pentru acest studiu, este cea mai populară tehnică de sinteză a hidroxiapatitei. Lipsa solvenților organici și costurile scăzute de producție fac ca această metodă să fie intens studiată în literatura de specialitate din punct de vedere al optimizării condițiilor de sinteză.

CAPITOLUL 2. BIFOSFONAȚII ÎN PRACTICA TERAPEUTICĂ CURENTĂ

Capitolul 2 tratează utilizarea în practica terapeutică curentă a bifosfonaților. Sunt precizate noțiuni precum relația structură-activitate, mecanismul de acțiune al acestora, utilizările și respectiv efectele adverse în tratamentul sistemic cu bifosfonați. Datele legate de corelarea structură-activitate oferă mai multe exemple în care diferențe mici în structura compușilor acestei clase de medicamente duc la schimbări surprinzătoare ale afinității osoase.

Prin urmare, a fost ales pentru studiu alendronatul, întrucât așezarea spațială a configurației acestuia (N-bifosfonat) și orientarea azotului din structură joacă un rol important în afinitatea de coordonare la atomii de calciu din hidroxiapatită și implicit se poate aproxima că afinitatea lui de legare la hidroxiapatita sintetică estimează probabilitatea de atașare a acestuia la os.

CAPITOLUL 3. CARACTERIZAREA FIZICO-CHIMICĂ A ALENDRONATULUI DE SODIU TRIHIDRAT

Capitolul 3 este un studiu scurt prin care a fost caracterizat alendronatul utilizat în sinteze. A fost astfel determinată solubilitatea acestuia și calculate constantele de disociere prin titrare potențiomtrică.

CAPITOLUL 4. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA COMPOZIȚILOR HIDROXIAPATITĂ-ALENDRONAT

Capitolul 4 cuprinde sinteza și caracterizarea compozitului hidroxiapatită-alendronat. Metoda de sinteză a permis varierea unor parametri care pot afecta în mod drastic morfologia, structura și mărimea cristalelor de hidroxiapatită formate : temperatura de sinteză, pH-ul, debitul de adăugare al reactanților, viteza de agitare a amestecului de reacție.

Totodată metoda de sinteză a hidroxiapatitei și compușilor HA-Al prin precipitare umedă mai prezintă o serie de avantaje de care s-a ținut cont în momentul alegerii : simplitate în realizare, costuri relativ reduse, reactivi ușor solubili în apă ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ și $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$), al căror pH poate fi ușor ajustat pentru a păstra bazicitatea mediului de reacție.

S-a lucrat în cadrul sintezei în atmosferă de azot, după ce în prealabil a fost realizat vidul în instalație pentru a evita prezența carbonatului în HA sintetică, deoarece prezența acestui ion influențează în mod negativ biocompatibilitatea compusului și de asemenea crește solubilitatea materialului sintetizat (figura 1).

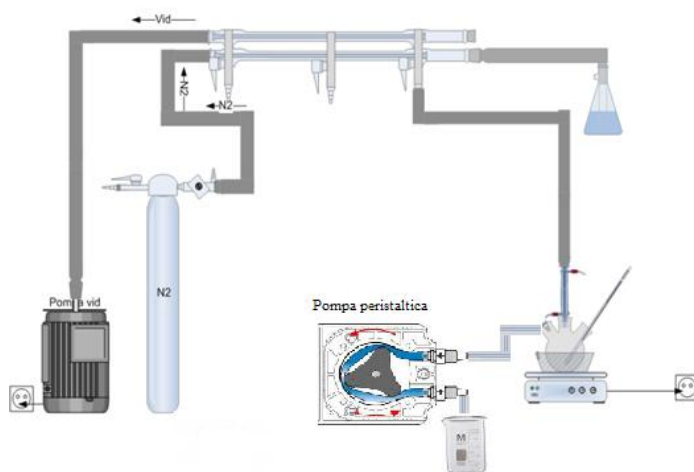


Figura 1. Instalația experimentală utilizată pentru sinteze

Atât hidroxiapatita cât și compoziții obținute au fost caracterizate calitativ prin FT-IR și prin difracție de raze X⁶.

În ceea ce privește analiza XRD, spectrele obținute atât pentru HA cât și pentru HA-AL în condițiile descrise anterior se suprapun cu spectrul HA existent în baze de date.

Deoarece nu există deplasări ale picurilor din spectrul de difracție, s-a concluzionat că pulberea obținută este HA pură și nu conține alte faze (figura 2).

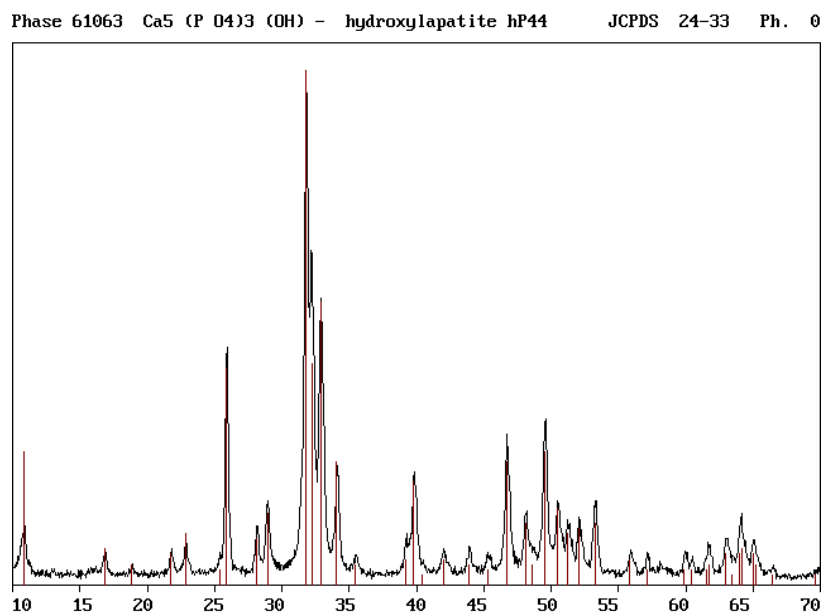


Figura 2. Spectrul de difracție al pulberii de hidroxiapatită sintetizate și poziția peak-urilor corespunzătoare HA comercială (cu roșu), din baza de date JCPDS

Pentru toți compușii sintetizați, indiferent de concentrația de alendronat s-a observat prezența în spectrele FT-IR a picurilor caracteristice alendronatului. Picul corespunzător vibrației de forfecare N-H de la 1644 cm^{-1} este deplasat ($8\text{-}10\text{ cm}^{-1}$), la 1636 cm^{-1} (HA-AL 10mM și HA-AL 20 mM), respectiv la 1634 cm^{-1} (HA-AL 5mM) comparativ cu cel din spectrul amestecului mecanic HA-AL 1:1, sugerând astfel apariția unor interacțiuni între hidroxiapatită și alendronat (figura 3).

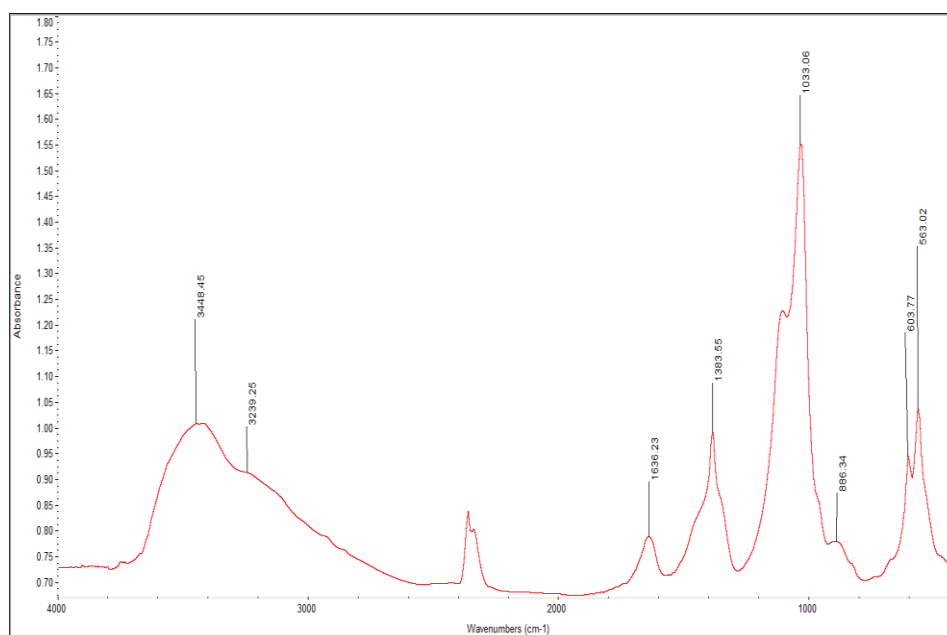


Figura 3. Spectrul FT-IR al compozitului HA-AL 20 mM

S-a constatat de asemenea apariția unei benzi largi în intervalul 3000 - 3600 cm^{-1} în spectrele compușilor, aceeași bandă care este prezentă și în spectrul alendronatului.

Compușii HA-AL prezintă în spectre la lungimea de undă de 1565 cm^{-1} picul caracteristic vibrației de întindere a grupării –OH din molecula hidroxiapatitei, cu o intensitate din ce în ce mai redusă până la dispariția totală din spectru pentru compusul HA-AL 20 mM. Aceasta se poate datora implicării grupărilor OH în formarea legăturilor cu hidroxiapatita.

Astfel, studiile efectuate sunt în concordanță cu alte studii din literatură, susținând ideea că între alendronat și hidroxiapatită există anumite interacțiuni.

Dimensiunile compozițiilor HA-AL obținute au fost evaluate prin măsurători de împrăștiere dinamică a luminii (Dynamic Light Scattering - DLS).

Rezultatele obținute prin difuzia dinamică a luminii (DLS) arată că particulele de hidroxiapatită-alendronat (HA-AL 20 mM) sintetizate au o dimensiune cuprinsă în intervalul granulometric [299-398] nm.

Graficele privind distribuția pe volum a mărimilor particulelor de HA-AL mai indică prezența unor mici aglomerate de particule de dimensiuni mai mari în intervalul granulometric [1242-1651] nm.

Analizând cele două distribuții (volum și număr) se poate constata că maximum de particule se situează în jurul dimensiunii de **397 nm** (figura 4).



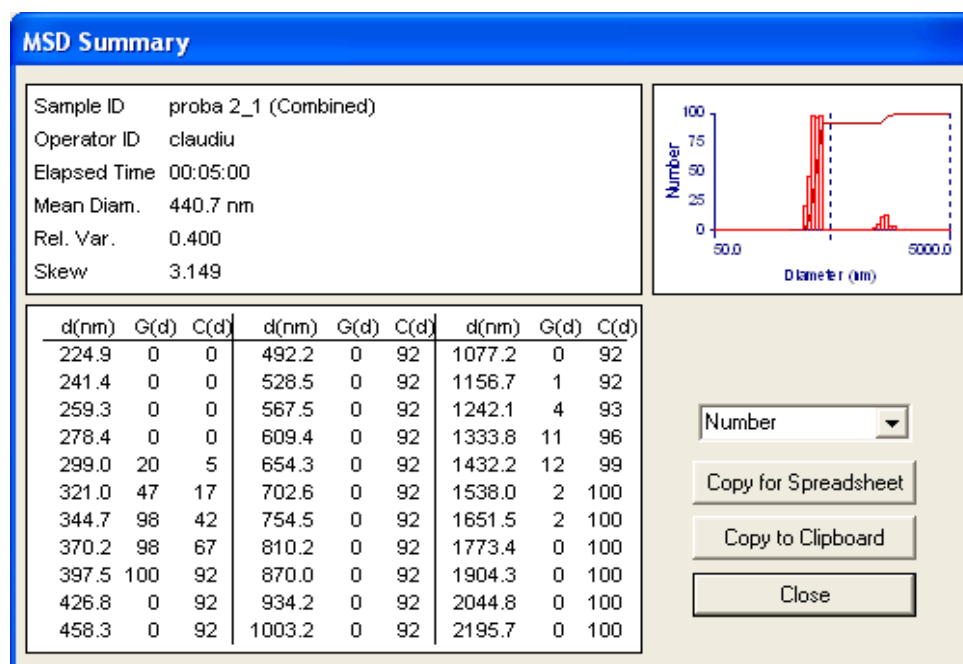


Figura 4. Distribuția pe număr a mărimilor particulelor de hidroxiapatită-alendronat

În vederea determinării cantitative a alendronatului a fost utilizată o **metodă analitică HPLC** potrivită atât pentru determinarea alendronatului din compoziții cât și pentru determinarea alendronatului din studiile de cedare *in vitro* ⁷.

FMOC-ul a fost ales ca reactiv pentru derivatizare datorită proprietăților sale superioare comparative cu alți reactivi. El reacționează în condiții blânde cu gruparea amino din alendronat, derivații rezultați fiind stabili. Amestecul de reacție a putut fi injectat în coloana nepolară, direct după ajustarea pH-ului, nefiind necesară îndepărtarea excesului de reactiv.

CAPITOLUL 5. DEPUNEREA COMPOZITULUI HA-AL 20 mM PE SUBSTRATURI METALICE DE TITAN ȘI CARACTERIZAREA ACESTUIA

În **capitolul 5** a fost realizată depunerea compușilor de tip hidroxiapatită – alendronat sintetizați pe partea metalică a implantului prin evaporare laser pulsată.

Pentru imobilizare/depunere a materialului pe suprafața metalică a colectorului au fost folosite discuri de Ti. Fixarea materialului a fost realizată prin MAPLE, iar caracterizarea ulterioară a materialului depus a fost făcută prin AFM (figura 5).



Figura 5. Discuri metalice de titan pe care a fost depus un microfilm de HA-AL 20 mM prin MAPLE

Filmele subțiri de material imobilizat pe suprafața metalică au o aderență ridicată pe substratul de titan, remarcându-se absența delaminărilor sau a oricăror alte defecte morfologice. Microparticulele de substanță activă (alendronat) sunt înglobate în rețeaua cristalină a hidroxiapatitei.

CAPITOLUL 6. TESTAREA BIOCOMPATIBILITĂȚII BIOMATERIALELOR HA-AL

În **capitolul 6** a fost investigată biocompatibilitatea compozițiilor de tip hidroxiapatită-alendronat sintetizați.

O parte a studiului a fost dedicată investigării biocompatibilității materialelor bazate pe compuși hidroxiapatită-alendronat. Adeziunea MSC pe suprafața biomaterialelor a fost evaluată prin imunofluorescență, prin marcarea filamentelor de actină în scopul analizei organizării celulelor pe suprafața de tip implant la 72 de ore după atașare.

Experimentele de biologie celulară au arătat că atât celulele osoase cât și celulele mezenchimale umane aderă și se etalează pe toate filmele subțiri bazate pe HA depuse prin MAPLE. Prezența alendronatului în filmele ce acoperă titanul crește numărul de puncte focale celulă-biomaterial (figura 7). Studii viitoare sunt necesare pentru a demonstra funcționalitatea structurilor HA-alendronat (inducerea osteointegrării)⁸.

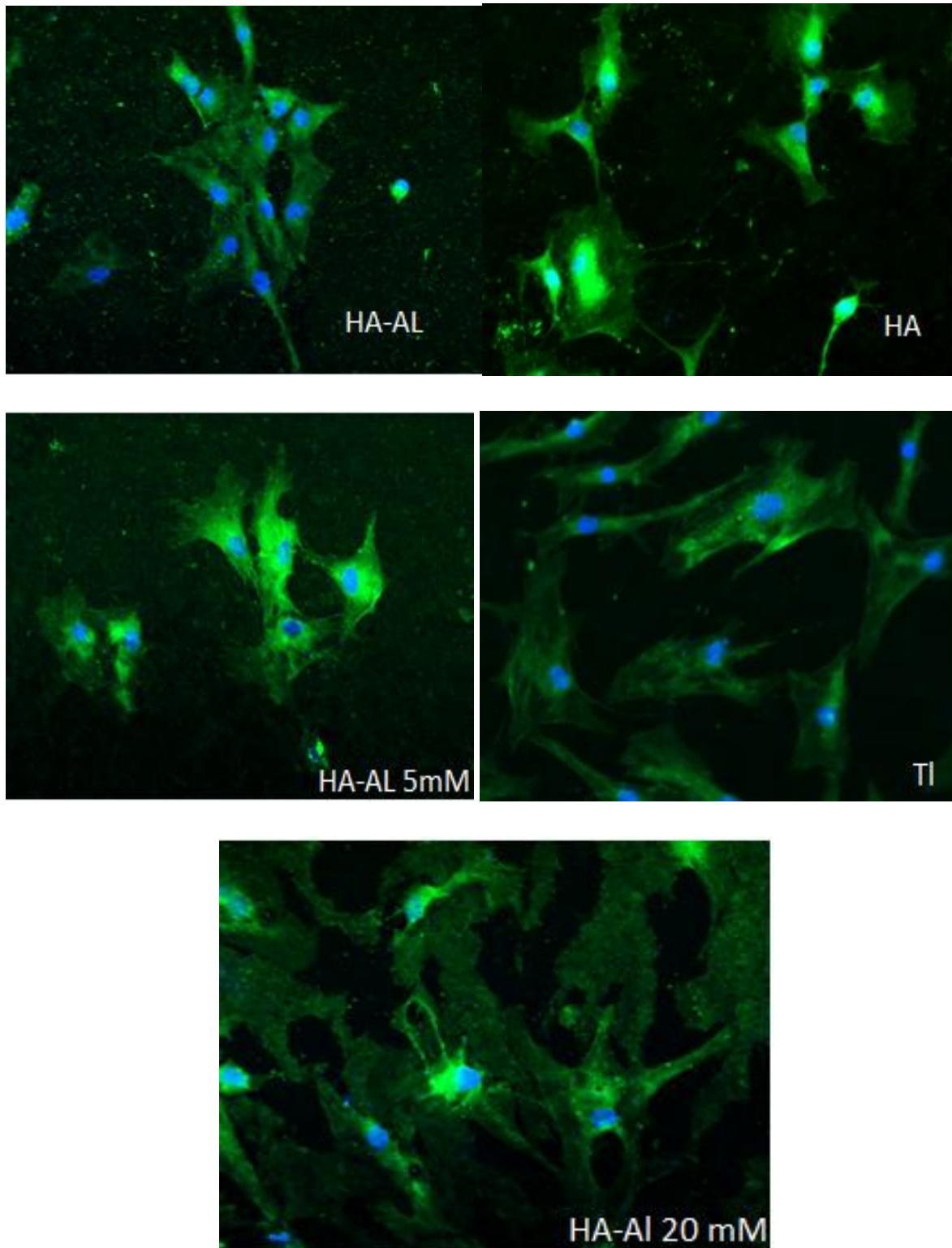


Figura 6. Imagini de imunofluorescență ale adeziunii celulelor MSC la biomateriale: actina (verde) a fost marcată cu faloidină conjugată cu Alexa Fluor 488, iar nucleii sunt marcați cu DAPI (albastru) pentru identificarea celulelor (imagini 20x suprapuse ale canalelor).

CAPITOLUL 7. STUDII DE CEDARE IN VITRO A ALENDRONATULUI DIN COMPOZIȚII HA-AL

Studiile efectuate de noi în **capitolul 7**, au evaluat comparativ cedarea pe de-o parte a alendronatului de pe plăcuțele de Ti acoperit cu HA și apoi supus unui proces de chemisorbție a AL din soluții apoase de diverse concentrații și pe de altă parte, cedarea alendronatului din compoziții de tip HA-AL depuși prin MAPLE pe părțile metalice ale protezelor (Ti).

În urma studiilor de cedare in vitro realizate în acest capitol s-a constatat că hidroxiapatita cristalină este o fază stabilă în contact cu mediul de cedare, iar alendronatul legat de HA prin procesul de sinteză este eliberat lent de pe componenta metalică (titan) în mediul de cedare, pe o durată de 10 zile, putând astfel în cazul implantării să contribuie la resorbție osoasă, concomitent cu HA care după implantare, produce specii chimice care susțin aderarea implantului la țesutul înconjurător formând o structură conectivă funcțională .

Astfel, sinteza compozitului HA-AL poate fi considerată o soluție viabilă pentru includerea bifosfonatului pe suprafața componentelor metalice ale protezelor utilizate în ortopedie.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

¹ Puleo DA. Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering (1), 2004, Marcel Dekker Inc., New York, 190-198.

² Wilson CJ, Clegg RE, Leavesley DI, Percy MJ. Mediation of biomaterial-cell interactions by adsorbed proteins: A review. Tissue Eng. 2005; 11: 1-18.

³ Suratwala SJ, Cho SK, Van Raalte JJ, Park SH, Seo SW, Chang SS, Gardner TR, Lee FY. Enhancement of periprosthetic bone quality with topical hydroxyapatite-bisphosphonate composite. J. Bone Joint Surg. Am. 2008; 90:2189–2196.

⁴ Papapoulos SE. Bisphosphonates: how do they work? Best Pract. Res. Cl. En. 2008; 22(5): 831–847.

⁵ Knoch F, Eckhardt C, Alabre CI, Schneider E, Rubash HE, Shanbhag AS. Anabolic effects of bisphosphonates on peri-implant bone stock. Biomater. 2007; 28: 3549–3559.

⁶ Gurgui-Ionescu C., **Balosache O.**, Mocanu A., Flori C., Moga S., Ducu C., Neamțu J. Studies concerning the synthesis and characterisation of hydroxyapatite powder. Acta Medica Marisiensis. 57(2):90-93, 2011

⁷ **Balosache O.E.**, Bubulică M.V., Popescu M., Manda C.V., Croitoru O., Băniceru M., Melinte R., Neamțu J. Synthesis physico-chemical characterization of a hydroxiapatite-alendronate composite. *Current Health Sciences Journal*. 39(supl. 3): 39-43, 2013.

⁸ Colnot C., Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration, *Journal of Bone and Mineral Research*, 24 (2):274-282, 2009.