



## “BIOMATERIALE POLIMERE CU APLICAȚII SPECIALE”

### - Rezumat -

Teza de doctorat cuprinde următoarele capitole principale: 1. Prezentarea tematicii de doctorat. Concepte, metode și obiective; 2. Articolele în extenso publicate ca rezultate științifice ale tezei de doctorat; 3. Concluzii generale; 4. Contribuții originale; 5. Diseminare; 6. Referințe bibliografice.

**Cuvinte cheie:** colagen tip II, biomateriale, sisteme de eliberare a medicamentelor

**În primul capitol** al tezei este prezentată tema de doctorat și este realizat un studiu critic asupra literaturii din domeniu pentru prezentarea proprietăților biomaterialelor pe bază de colagen și colagen tip II ce pot fi utilizate în aplicații medicale. În continuarea acestui capitol sunt definite obiectivele acestei teze de doctorat astfel și obiectivele specifice utilizate pentru dezvoltarea cercetării originale:

**Obiectivul 1.** Dezvoltarea unei noi tehnologii de extracție a colagenului de tip II și stabilizarea extractelor colagenice prin reticulare chimică folosind diferiți agenți de reticulare.

**Obiectivul 2.** Proiectarea noilor biomateriale bazate pe colagen de tip I și tip II ca sisteme de eliberare a medicamentelor compozite cu polimeri naturali și antibiotice.

**Obiectivul 3.** Caracterizarea extractelor colagenice și a biomaterialelor obținute prin metode moderne structurale, morfologice, biologice termice, goniometrice și mecanice.

**Obiectivul 4.** Stabilirea direcțiilor de utilizare a biomaterialelor obținute în medicină, farmacie și industria alimentară.

Pentru atingerea obiectivelor principale au fost stabilite obiective strategice și specifice:

**Obiectiv specific 1.** Obținerea și caracterizarea colagenului de tip II din cartilajul bovin ca un potențial biomaterial care poate fi utilizat în regenerarea cartilajului.

**Obiectiv specific 2.** Studiarea sinteza biomaterialelor de colagen de tip II cu și fără agenți de reticulare.

**Obiectiv specific 3.** Proiectarea și caracterizarea unor suporturi de colagen/condroitin sulfat cu doxiciclină pentru regenerarea țesutului cartilajului.

**Obiectiv specific 4.** Obținerea, caracterizarea și optimizarea formulării de microcapsule pe bază de colagen de tip II, alginat de sodiu și carboximetil celuloză de sodiu încărcate cu doxiciclină ca un medicament model antibiotic care ar putea fi încorporat în continuare în hidrogeluri pentru a îmbunătăți terapia localizată a artritei septice.

**Obiectiv specific 5.** Obținerea de noi probe compozite folosind colagen de tip II și diferite tipuri de argile minerale. Pentru investigarea influenței tipului de nanoargilă asupra eficienței eliberării medicamentului, probele compozite obținute au fost încapsulate suplimentar cu gentamicină.

**Obiectiv specific 6.** Obținerea și caracterizarea biomaterialelor pentru regenerarea țesuturilor moi ale sistemului digestiv.

**În cel de-al doilea capitol** al tezei de doctorat sunt prezentate articolele în extenso publicate în urma rezultatelor de cercetare originale obținute în cadrul acestei lucrări:

1. **M. M. Marin**, M.G. Albu Kaya, A. Ficai, M.V. Ghica, L. Popa, R. Tutuianu, *Collagen hydrolysate-based ingestible bioproducts for the treatment of gastric disorders*, Romanian Journal of Materials, 2018, 48 (1), 121-126. (IF: 0.563)
2. **M. M. Marin**, M. G. Albu-Kaya, G.M. Vlasceanu, J. Ghitman, I. C. Radu, H. Iovu, *The effect of crosslinking agents on the properties of type II collagen biomaterials*, Plastic Materials, 2020, 57 (4), 166-180. (IF: 0.593)
3. **M. M. Marin**, M. G. Albu-Kaya, H. Iovu, C. E. Stavarache, C. CHELARU, R. R. Constantinescu, C. DINU-PÎRVU, M. V. Ghica, *Obtaining, evaluation, and optimization of doxycycline-loaded microparticles intended for the local treatment of infectious arthritis*, Coatings, 2020, 10 (10), 990. (IF: 3.236)
4. **M.M. Marin**, M. G. Albu-Kaya, M.V. Ghica, E. Dănilă, G. Coară, L. Popa, C. Chelaru, D.A. Kaya, V. Anuța, C.E. Dinu Pîrvu, I. Cristescu, *Design and evaluation of doxycycline/collagen/chondroitin sulfate delivery systems used for cartilage regeneration*, Proceedings of ICAMS 2020 – 8<sup>th</sup> International Conference on Advanced Materials and Systems, 2020, 201-206.
5. **M. M. Marin**, M. G. Albu-Kaya, C. E. Stavarache, R. R. Constantinescu, C. CHELARU, J. Ghitman, H. Iovu, *Extraction and studies on the properties of type II collagen as potential biomaterial in cartilage repair*, University Politehnica of Bucharest Scientific Bulletin Series B, 2021, 83 (1), 229-238.
6. **M. M. Marin**, R. Ianchis, R. Leu Alexa, I. C. Gifu, M. G. Albu-Kaya, D. I. Savu, R. C. Popescu, E. Alexandrescu, C. M. Ninciuleanu, S. Preda, M. Ignat, R. Constantinescu, H. Iovu, *Development of new collagen/clay composite biomaterials*, International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23 (1), 401. (IF: 6.208)

**În cel de-al treilea capitol al tezei** sunt prezentate concluziile generale ale tezei de doctorat privind sinteza și caracterizarea colagenului de tip II din cartilajul bovin și a biomaterialelor pe bază de colagen tip I și tip II ce pot fi utilizate în aplicații medicale. Rezultatele experimentale publicate în articolele de cercetare menționate mai sus au arătat că

noul colagen de tip II obținut reprezintă un biomaterial promițător care poate fi utilizat în domeniul medical. Stabilizarea noului colagen de tip II a fost realizată cu succes utilizând trei tipuri de agenți de reticulare: TA, GE și EDC/NHS. Pentru a îmbunătăți proprietățile colagenului de tip II, scaffold-uri pe baza de colagen reticulate cu diferiți agenți de reticulare au fost preparate prin procesul de liofilizare. Toate aceste rezultate sugerează că acest studiu ar putea fi util pentru dezvoltarea unui nou biomaterial pe bază de colagen pentru aplicații de inginerie tisulară având proprietăți adecvate și antigenicitate redusă cu toți agenții de reticulare. Mai mult, au fost proiectate și caracterizate suporturi de colagen/condroitin sulfat cu doxiciclină pentru regenerarea țesutului cartilajului. Probele pe bază de colagen, sulfat de condroitină și doxiciclină au fost reticulate cu diferite concentrații de glutaraldehidă și apoi liofilizate în scopul obținerii de noi scaffold-uri colagenice. Rezultatele obținute recomandă aceste noi schele pe bază de doxiciclină/colagen/condroitin sulfat ca o abordare promițătoare pentru tratamentul problemelor cartilajului. Găsind rezultatele favorabile după stabilizarea colagenului extras printr-o nouă metodă brevetată, s-a obținut o formulare suplimentară de microcapsule pe bază de colagen de tip II, alginat de sodiu și carboximetil celuloză de sodiu încărcate cu doxiciclină. A fost obținută, caracterizată și optimizată o nouă formulare de microcapsule ca model de tratament cu antibiotic. Rezultatele obținute recomandă aceste noi microcapsule optimizate ca sisteme de medicamente promițătoare pentru a fi încorporate în continuare în hidrogelurile de colagen de tip II ce pot utilizate pentru artrita septică. De asemenea, colagenul de tip II extras a fost utilizat pentru a dezvolta noi biomateriale compozite de colagen/argilă. Prin utilizarea a 5 tipologii de argile au fost sintetizate biomateriale compozite moderne. Folosind aceste rezultate ca bază pentru cercetări ulterioare, a fost studiată influența încărcării compozitelor de colagen/argile minerale cu concentrații diferite de nanopulberi minerale asupra viabilității și a potențialelor caracteristici de eliberare a antibioticelor. Rezultatele obținute în studiu sugerează că noile compozitele pe bază de colagen și nanoargile sunt candidați promițători pentru noi materiale dezvoltate în ramura medicală. În final, o altă direcție a fost obținerea și caracterizarea biomaterialelor pentru regenerarea țesuturilor moi ale sistemului digestiv. Prin liofilizare s-au obținut pulberi cu diferite concentrații de hidrolizat de colagen tip I, zeolit și propolis. Sunt necesare studii ulterioare pentru a stabili clar și complet modificările fizico-chimice ale zeoliților după ingestii și pentru a evalua influența biologică.

Rezultatele cercetării prezentate în cadrul tezei prezintă un grad ridicat de originalitate vizând sinteza de noi biomateriale pe bază de colagen de tip I și tip II. Rezultatele vor influența semnificativ cunoștințele privind tehnologiile pentru extracția și caracterizarea colagenului.

**Al patrulea capitol** prezintă contribuțiile originale ale tezei în domeniul biomaterialelor pe bază de colagen și colagen de tip II. Contribuțiile personale aduse la aceste subiecte sunt structurate după cum urmează:

*1. Extracție și studii asupra proprietăților colagenului de tip II ca potențial biomaterial în repararea cartilajului*

Studiile experimentale ale acestei teze au început cu obținerea colagenului de tip II folosind o nouă metodă de extracție care a fost, de asemenea, înregistrată la OSIM (cererea de brevet nr. A 00840/26.10.2018). Aplicarea noului colagen extras duce la următoarele avantaje:

- procedeul, conform noii tehnologii, permite prepararea extractelor de colagen din țesuturile cartilajinoase numai prin hidroliza acida și alcalina, fără utilizarea de enzime greu de inactivat;

- procedeul conform invenției este simplu, se desfășoară la temperatura camerei: 20 ... 25°C, cu consum redus de energie și cu aparatură simplă, permițând prepararea de extracte cu puritate ridicată, specifice materialelor pentru aplicații medicale.

Originalitatea acestui studiu este legată de noul colagen de tip II extras din cartilajul bovin și se bazează pe faptul că tehnologia promovată nu folosește enzime care pot afecta structura de triplu helix a colagenului.

*2. Efectul agenților de reticulare asupra proprietăților biomaterialelor pe bază de colagen de tip II*

Acest studiu prezintă un concept original pentru investigarea influenței diferiților agenți de reticulare, cum ar fi genipina, acidul tanic și sistemul EDC/NHS asupra performanțelor unei schele pe bază de colagen de tip II care urmează să fie utilizate în regenerarea țesutului cartilajului. Biomaterialele pe bază de colagen de tip II au fost reticulate cu doi agenți naturali (GE, TA) și unul sintetic (EDC/NHS) și a fost investigat efectul acestor agenți de reticulare asupra morfologiei, proprietăților mecanice și termice. Mai mult, a fost investigat impactul agenților de reticulare selectați asupra conformației secundare a colagenului de tip II, care este responsabilă pentru activitatea terapeutică a proteinei, folosind dicromismul circular. De asemenea, s-a studiat comportamentul de gonflare și degradarea enzimatică *in vitro* a scaffold-ului reticulat obținut cu agenți de reticulare naturali sau sintetici.

Această idee nouă nu a fost niciodată raportată în literatură, comparând aceste trei tipuri de agenți de reticulare pe colagenul de tip II și a oferit noi direcții pentru îmbunătățirea comportamentului mecanic și termic al colagenului.

### *3. Proiectarea și evaluarea sistemelor de administrare a doxiciclinei/colagenului/sulfatului de condroitină utilizate pentru regenerarea cartilajului*

În acest studiu au fost dezvoltate și caracterizate noi suporturi de colagen/condroitin sulfat de tip II cu doxiciclină pentru regenerarea țesutului cartilagos. Scaffold-urile încărcate cu doxiciclină ar trebui să prevină dezvoltarea potențialelor infecții. Probele de colagen, sulfat de condroitină și doxiciclină au fost reticulate cu diferite concentrații de glutaraldehidă și apoi liofilizate pentru dezvoltarea bureților de colagen. Toate caracteristicile noilor biomateriale sintetizate au fost mai întâi evaluate folosind metode moderne de investigare. Rezultatele obținute recomandă aceste noi schele pe bază de doxiciclină/colagen/condroitin sulfat ca o abordare încurajatoare pentru regenerarea problemelor cartilajului.

Acest concept nu a fost niciodată publicat până în prezent, acesta fiind singurul studiu de cercetare care exploatează ideea adăugării sulfatului de condroitină în matricea de colagen cu doxiciclină pentru a obține sisteme de regenerare a cartilajului.

### *4. Obținerea, evaluarea și optimizarea microparticulelor încărcate cu doxiciclină destinate tratamentului local al artritei infecțioase*

În acest studiu au fost concepute, caracterizate și optimizate formulări originale de microcapsule bazate pe colagen de tip II, alginat de sodiu și carboximetil celuloză de sodiu încărcate cu doxiciclină ca model de medicament antibiotic, care ar putea fi utilizate în continuare în hidrogeluri pentru a îmbunătăți terapia localizată a artritei septice. Noile microcapsule sintetizate au fost evaluate prin analiză spectrală (FT-IR), morfologică (microscopie optică) și biologică (biodegradare enzimatică, activitate antimicrobiană). Distribuția dimensiunilor microcapsulelor obținute a fost determinată folosind microscopie optică. S-a determinat și eficiența încapsulării medicamentului. Pentru optimizarea compoziției microcapsulelor, unele analize fizico-chimice și biologice au fost optimizate folosind o tehnică bazată pe un plan experimental, metodologia suprafeței de răspuns și tehnica Taguchi și au fost selectate formulările adecvate. Rezultatele obținute recomandă aceste noi microcapsule ca sisteme de eliberare medicamente promițătoare pentru a fi încorporate în continuare în hidrogelurile de colagen de tip II utilizate pentru tratamentul artritei.

### *5. Dezvoltarea de noi biomateriale compozite de colagen/argilă*

Studiile de cercetare prezentate în acest capitol s-au concentrat pe crearea de noi scaffold-uri compozite pe bază de colagen/argilă. Biomaterialele compozite moderne au fost create utilizând cinci tipuri de argile. Pentru investigarea influenței tipului de nanoargilă asupra eficienței eliberării medicamentului, probele compozite obținute au fost încapsulate suplimentar cu gentamicină. Acest studiu include o evaluare a efectului diferitelor nanoparticule de argilă

minerală asupra proprietăților biomaterialelor colagen tip II – argilă încapsulate cu gentamicină. Conform înțelegerii actuale, studiul reprezintă primele investigații sistematice de cercetare privind adăugarea de nanoargile naturale sau funcționalitate în matricea polimerică care pot fi utilizate pentru repararea țesutului cartilajinos, reprezentând o premieră pentru familia de cercetare a compozitelor.

Prezența nanopulberilor a dat probelor o structură poroasă cu o varietate de dimensiuni ale porilor. O structură intercalată de colagen-argilă a fost descoperită folosind tehnici de difracție cu raze X, straturile minerale fiind dispersate uniform în porțiunea organică. Spectroscopia în infraroșu cu transformă Fourier (FTIR) a arătat că adăugarea de argile nu a determinat denaturarea structurii de triplu helix a colagenului. Compozitele create prin includerea nanoparticulelor minerale au prezentat proprietăți mecanice mai mari în comparație cu probele de colagen de bază și au redus biodegradabilitate cu rapoarte mai mici de absorbție a PBS în studiile de umflare. Experimentele *in vitro* privind eliberarea de antibiotice au arătat o perioadă latentă urmată de o eliberare mare, ceea ce este în concordanță cu cinetica compozitelor pe bază de argile. Toate bacteriile aerobe patogene investigate au experimentat o inhibare a creșterii biologice datorită introducerii nanoparticulelor minerale. Trei materiale compozite testate pentru viabilitatea celulară au arătat o biocompatibilitate adecvată. Impactul încărcării compozitelor de colagen/argilă minerală cu diferite concentrații de nanopulberi minerale asupra viabilității și posibilelor caracteristici de eliberare a antibioticelor va fi investigat în continuare folosind aceste rezultate ca bază pentru studii viitoare.

Conform rezultatelor studiului, compozitele din colagen de tip II și nanoargile reprezintă candidați excelenți ca materiale noi pentru industria medicală.

#### *6. Bioproduse ingerabile pe bază de hidrolizat de colagen pentru tratamentul tulburărilor gastrice*

Ulcerul gastric este o problemă comună a tractului gastro-intestinal, cu incidența și prevalența sa crescândă, atribuită pierderii echilibrului între factorii agresivi și cei protectori. Scopul acestui studiu a fost obținerea și caracterizarea de noi biomateriale pentru regenerarea țesuturilor moi ale sistemului digestiv. Prin liofilizare s-au obținut pulberi cu diferite concentrații de hidrolizat de colagen, zeolit și propolis. Au fost studiate morfologia (SEM), caracteristicile spectrale (FTIR, XRD), goniometria (unghiul de contact), evaluarea *in vitro* la acid gastric simulat și biocompatibilitatea (teste de viabilitate) a pulberilor proiectate. Probele noi bazate pe hidrolizat de colagen, zeolit și biomateriale propolis au prezentat caracteristici care le fac potențiali candidați pentru utilizarea în tratamentul ulcerului gastric.

Teza de doctorat BIOMATERIALE POLIMERE CU APLICAȚII SPECIALE prezintă un grad ridicat de originalitate prin dezvoltarea de noi strategii pentru sinteza colagenului de tip II. Au fost dezvoltate mai multe strategii de sinteza a biomaterialelor pentru aplicații medicale, iar rezultatele obținute vor influența foarte mult metodele de obținere a biomaterialelor pe baza de colagen și colagen de tip II.

**Al cincilea capitol** al tezei de doctorat prezintă publicațiile rezultate în urma acestei lucrări și diseminarea rezultatelor la conferințe naționale și internaționale.