

Rezumat  
**Biomateriale Polimerice cu Aplicatii Targetate**  
Doctorand: Radu Ionut Cristian

Teza, in ansamblu sau insumeaza 190 pagini din care circa o treime este dedicata unui amplu referat de literatura care cuprinde 5 mari subcapitole:

- O introducere generala asupra biomaterialelor polimerice cu aplicatii medicale in care sunt prezentate principalele realizari ale acestui domeniu in ultimii 30-40 de ani. Pornind de la primele definitii ale biomaterialelor, subcapitolul ajunge sa prezinte materialele inteligente dezvoltate in prezent. Acesta se axeaza pe importanta nanotehnologiei asupra unor noi metode de sinteza a materialelor si nanomaterialelor in ingineria tisulara si domeniul farmaceutic. Prezentarea detaliata a principalelor categorii de polimeri ca impartire generala in sintetici si naturali, ofera un spectru larg de intelegere a aplicatiilor polizaharidelor (celuloza, alginat, chitosan, amidon, etc.), proteinelor (colagen, gelatina, lana, sericina, fibroina, etc), poliesterilor (polihidroxicanoati), sau poliamidelor. Mai mult, acest prim subcapitol nu subliniaza doar importanta polimerilor in dezvoltarea domeniului medical, dar si implicarea altor tipuri de materiale precum ceramicele sau metalele.

- Al doilea subcapitol din referatul de literatura este dedicat importantei domeniului livrarilor de medicamente si este si el impartit in mai multe subcapitole (introducere in domeniul livrarilor de medicamente; evolutia dezvoltarii micro si nanoparticulelor; nanoparticule pentru terapia cancerului). Prezentarea domeniului include date si informatii despre administrarea conventionala a medicamentelor prin diferite rute cat si date despre evolutia dezvoltarii de nanoparticule polimerice. Este prezentata istoria evolutiei sistemelor de particule de la inceputul erei Macro in anii 1970 si pana la ultimele tehnologii si metode de preparare a nanoparticulelor polimerice. Sunt discutate in detaliu principalele tintele ale domeniului farmacologic (prevenirea aparitiei bolilor, reducerea frecventei de administrare, reducerea sau eliminarea simptomelor clinice, intarzierea sau stoparea unor conditii medicale, stabilizarea starilor medicale, etc.). De asemenea, au fost clasificate principalele rute de administrare: administrare locala ca metoda accesibila si administrarea sistemica (metoda ingreunata) cu impartirea in administrare directa si administrare indirecta. Accentul a fost pus pe administrarea sistemica intravasculara si intravenoasa deoarece reprezinta obiectul domeniului nanoparticulelor polimerice. Au fost

detaliat principalele avantaje aduse de utilizarea nanoparticulelor polimerice și dezvoltarea nanotehnologiei. Sunt prezente noțiuni concrete despre principalele scopuri pe care nanotehnologia dorește să le atingă prin dezvoltarea continuă a diferitelor tipuri de nanoparticule: creșterea specificității sistemelor de livrare; reducerea toxicității cu menținerea nivelului procesului terapeutic; creșterea biocompatibilității, biodegradabilității și disponibilității; dezvoltarea de noi metode de preparare; Metodele de administrare pentru nanoparticulele au fost prezentate și clasificate în administrarea orală și administrarea intravasculară cu principalele avantaje și dezavantaje. Au fost subliniate principalele avantaje ale administrării intravasculare prin apariția efectului EPR (permeabilitatea crescută a peretilor vaselor de sânge), capacitatea de țintire mai mare a zonelor de interes (tipuri de țesut sau zone ale organismului), creșterea stabilității și a biodisponibilității medicamentelor. Au fost atinse și noțiuni teoretice despre mecanismele de internalizare ale nanoparticulelor, mecanismele de marcarea sistemului imunitar asupra nanoparticulelor, capacitatea de camuflare a nanoparticulelor în fața sistemului imunitar reprezentat de macrofage sau posibilitatea biodegradării nanoparticulelor în interiorul celulelor (în special celule tumorale). Principalele mecanisme de acțiune ale nanoparticulelor au fost discutate în detaliu cu exemple concrete din literatură. Impartirea mecanismului general de acțiune în submecanisme a oferit o bună înțelegere asupra proceselor pe care nanoparticulele le suferă imediat după administrare. Totodată sunt discutate principalele avantaje, dezavantaje și diferențe dintre mecanismul activ de acțiune și mecanismul pasiv de acțiune.

Principalele metode de sinteză și preparare sunt expuse sub forma unei clasificări generale în metode de polimerizare (polimerizare în emulsie; polimerizare în suspensie; polimerizare interfacială, etc) și metode din polimeri preformați (metoda nanoprecipitării; metoda emulsificării și difuziei; metoda emulsificării și eliminării de solvent; metoda dublei emulsificări; metoda autoasamblării, etc). Din toate aceste metode și categorii de metode sunt alese pentru detaliere metoda nanoprecipitării și metoda emulsificării-difuziei deoarece reprezintă studiul direcțiilor de cercetare. Accentul prezentării metodelor este pus pe metoda nanoprecipitării ca metoda principală generatoare de nanoparticule cu intervale dimensionale în jur de 100 nm și sub 100 nm.

- Al treilea subcapitol al literaturii prezintă în detaliu principalii polimeri utilizați în partea experimentală pentru dezvoltarea sistemelor polimerice de nanoparticule. Acest subcapitol este împărțit la rândul său în subcapitole (poliesteri naturali de tip PHBV; polimeri naturali;

polimeri sintetici). Toate categoriile de polimeri sunt prezentate din punct de vedere al structurii, proprietatilor, aplicatiilor biomedicale si al aplicatiilor in dezvoltarea de nanoparticule.

Prima parte a subcapitolului pune in evidenta categoria poliesterilor naturali de tip polihidroxiacanoati prin prezentarea in detaliu a poli-(3-hidroxi-butirat)ului (PHB) si a poli-(3-hidroxi-butirat-co-3-hidroxi-valerianat)ului (PHBHV) ca reprezentanti principali. Sunt mentionate notiuni despre sinteza, structura, proprietati mecanice, biocompatibilitate, biodegradare si importanta caracteristicilor asupra utilizarilor in domeniul biomedical. Principalele tipuri de aplicatii biomedicale (implanturi; suporturi; pansamente; tuburi; parti protetice; stenturi; vase de sange;) sunt prezentate sub forma de notiuni generale. Accentul se pune pe utilizarea acestei categorii de poliesteri pentru dezvoltarea de micro si nanoparticule. Sunt expuse numeroase exemple din literatură de nanoparticule din PHBVB preparate prin diverse metode (gelifiere termica in toluen; emulsie de tip ulei in apa, etc) pentru diferite aplicatii (livrari de medicamente hidrofobe). Sunt prezentate avantajele acestui polimer prin prisma faptului ca este de origine bacteriana (polimer natural). A doua categorie de polimeri naturali prezentati sunt proteinele extrase din coconul de matase. Fibroina si sericina sunt prezentate ca proteine principale cu proprietati speciale. Aceste proprietati tin in primul rand de compozitia in aminoacizi si de modul de structurare. Notiuni generale despre diferite aplicatii ale acestor doua proteine in domeniul biomedical si alimentar sunt expuse. Ca si in cazul PHBHV, sunt detaliate aplicatiile acestor proteine in dezvoltarea de sisteme de livrare pe baza de nanoparticule. A treia parte a acestui subcapitol este prezentarea Poli-N-izopropil acrilamidei (PNIPAM) ca polimer sintetic utilizat in domeniul ingineriei tisulare si domeniul sistemelor de livrare pe baza caracterului termosensibil. Sunt prezentate exemple concrete ale aplicatiilor PNIPAM in sinteza de nanoparticule polimerice termosensibile si importanta acestui caracter asupra mecanismului de livrare a medicamentelor.

- Al patrulea capitol al referatului de literatura prezinta notiuni generale despre cancer si terapia cancerului. Sunt expuse pe larg principalele tipuri de terapie (chimioterapie; radioterapie; extirpare prin interventie chirurgicala). Se detaliaza domeniul chimioterapiei prin expunerea principalelor limitari existente si aparitia rezistentei la citostatice. Sunt prezentate principalele avantaje ale utilizarii sistemelor de livrare pe baza de nanoparticule.

- Ultima parte a referatului de literatura este dedicata perspectivelor, noilor cerinte si noilor tendinte in nanotehnologia moderna pentru dezvoltarea de sisteme de livrare pe baza de nanoparticule.

Partea a-II-a a tezei, consacrată contribuției originale este structurată în 3 mari capitole si directii de cercetare. Fiecare directie mare este impartita in cate 3 subdirectii sau obiective majore. In primul capitol intitulat „Dezvoltarea de nanoparticule polimerice pe baza de poliesteri (PHBHV)”, sunt prezentate rezultatele experimentale obținute dupa sinteza unor astfel de micro si nanoparticule prin diferite metode.

Astfel, într-un prim subcapitol, destinat obținerii de micro si nanoparticule prin metoda emulsificarii-difuziei, se raportează obținerea unor particule cu dimensiuni si morfologii diferite in functie de parametrii de sinteza. Metoda presupune utilizarea a doua faze suport, o faza organica reprezentata de polimer (PHBHV) si o faza apoasa reprezentata de stabilizator (alcool polivinilic). Aceste faze prezinta variatii ale concentratiilor pentru stabilirea unei proceduri generale prin care sa se controleze principale caracteristici ale particulelor (dimensiune; distributie dimensionala; morfologie; forma; numar de particule). Metoda de sinteza este laborioasa si presupune picurarea fazei organice peste faza apoasa cu un debit controlat si intr-un raport bine stabilit. Metoda necesita o etapa de evaporare a solventului poliesterului (cloroform) si o etapa de centrifugare pentru recuperarea particulelor.

Caracterizarea morfologica (SEM) evalueaza in primul rand morfologia si dimensiunea nanoparticulelor. Se constata o dependenta a dimensiunilor si morfologiei particulelor cu concentratia solutiei de poliester si concentratia solutiei de stabilizator. Este evidentiata setul de parametrii care genereaza particulele cu dimensiunea cea mai redusa si cu distributia dimensionala cea mai ingusta (PHBHV 2% - PVA 2%).

Caracterizarea dimensionala confirma rezultatele morfologiei (SEM) si prezinta nanoparticulele cu dimensiunea corespunzatoare.

Testele de eliberare au presupus intr-o prima etapa incarcarea nanoparticulelor cu 5-fluorouracil (5-FU) ca si medicament antitumoral. Dupa incapsulare este realizat testul de eliberare care prezinta un profil specific si o eficienta de eliberare de 20%.

Nanoparticulele incarcate si neincarcate cu (5-FU) au fost supuse si unui set de investigatii biologice (teste de viabilitate si citotoxicitate) prin care se evidentiaza actiunea sistemelor asupra liniilor celulare.

A doua parte a acestei directii de cercetare presupune dezvoltarea de nanoparticule print-o alta metoda consacrata, metoda nanoprecipitarii. Au fost folosite aceleasi seturi de parametrii (faza organica; faza apoasa) si s-a optimizat metoda pentru cazul polimerului (PHBHV). In acest caz viteaza si debitul de picurare sunt esentiale pentru controlul parametrilor nanoparticulelor.

Analiza morfologica prin SEM si AFM prezinta sinteza de nanoparticule cu dimensiuni mai reduse (100 nm si sub 100 nm) in comparatie cu prima metoda utilizata, emulsificare-difuzie.

Analiza dimensionala prin difuzia luminii (DLS) confirma obtinerea de nanoparticule cu dimensiuni mai reduse fata de emulsificare-difuzie dar cu pastrarea aceleiasi dependente ca in primul caz.

Evaluarea testelor de eliberare presupune incarcarea nanoparticulelor cu un nou medicament, silimarina ca adjuvant, si in ultima etapa eliberarea propriu-zisa. Se evidentiaza un profil de eliberare specific si o eficienta de eliberare de 38%.

Interactia dintre celulele tumorale (cancer colorectal) si nanoparticule este pusa in evidenta prin doua analize de morfologie, SEM si AFM. Investigatia stabileste faptul ca nanoparticulele din PHBHV au capacitatea a penetra membrana celulara si de a patrunde in celule in vederea eliberarii medicamentului.

Nanoparticulele incarcate si neincarcate cu (5-FU) au fost supuse si unui set de investigatii biologice (teste de viabilitate si citotoxicitate) prin care se evidentiaza actiunea sistemelor asupra liniilor celulare.

Al treilea subcapitol al acestei directii de cercetare urmareste o investigatie asupra degradarii enzimaticе a nanoparticulelor dezvoltate in primele 2 subcapitole. Acesta investigatie are la baza prezentarea mecanismelor de eliberare a medicamentelor si cresterea eficientei de eliberare.

Testele de eliberare in prezenta celor doua enzime (esteraze din ficat de porc si ficat de iepure) arata cresterea capacitatii de eliberare datoritata procesului de biodegradare.

Analiza fizico-chimica urmareste actiunea celor doua enzime asupra structurii si integritatii celor 2 polimeri (PHBHV; APV) si prezinta noile posibile structuri generate.

Prima directie de cercetare se incheie cu prezentarea principalelor concluzii si diferente dintre cele doua metode de preparare utilizate.

In capitolul doi intitulat „Dezvoltarea de nanoparticule polimerice pe baza de proteine (fibroina; sericina)”, sunt prezentate rezultatele experimentale obținute după sinteza unor astfel de nanoparticule prin metoda nanoprecipitarii. Acest capitol este și el divizat în 3 părți cu puternice conexiuni între ele și care deriva una din cealaltă.

Primul subcapitol al acestei direcții de cercetare arată optimizarea unor sisteme de eliberare controlată pe baza de fibroina. Astfel de sisteme au mai fost raportate în literatura dar fără o evidențiere clară a controlului proprietăților nanoparticulelor generate. Metoda nanoprecipitarii presupune de această dată înlocuirea fazei apoase, utilizate în capitolul anterior, cu o nouă fază (faza de precipitare reprezentată de către un non-solvent/ acetona). Prepararea nanoparticulelor de fibroina se face tot prin picurarea fazei organice dar fără un control necesar. Nanoparticulele se sintetizează, în acest caz, instant în prezența acetonei și nu mai este necesară utilizarea unui stabilizator.

Se constată o dependență a dimensiunilor și morfologiei particulelor cu concentrația soluției de fibroina. Este evidențiat setul de parametri care generează particulele cu dimensiunea cea mai redusă și cu distribuția dimensională cea mai îngustă (SF 4%). Are loc scăderea dimensiunii nanoparticulelor cu creșterea concentrației de fibroina (invers față de situația nanoparticulelor de PHBHV).

Analiza morfologică prin SEM și AFM prezintă sinteza de nanoparticule cu dimensiuni mai reduse (100 nm și sub 100 nm) cu o dependență clară. Analiza distribuției dimensionale prin DLS confirmă rezultatele prezentate de analiza morfologică.

Evaluarea testelor de eliberare constă în încărcarea inițială a nanoparticulelor cu două medicamente antitumorale (5-FU și doxorubicin) și în ultima etapă eliberarea propriu-zisă. În cazul medicamentului (5-FU) se constată un profil de eliberare rapid și eficient de eliberare de peste 90%. În cazul medicamentului doxorubicin nu se constată eliberarea medicamentului din nanoparticule.

Nanoparticulele încărcate și neîncărcate cu (5-FU) au fost supuse și unui set de investigații biologice (teste de viabilitate și citoschelet) prin care se prezintă acțiunea sistemelor asupra liniilor celulare (linii celulare de cancer de colon și rect). O activitate semnificativă se vede după aproximativ 24 de ore.

In al doilea subcapitol al celei de-a doua directii de cercetare se dezvoltă un nou tip de nanoparticula pe baza de fibroina modificata. Modificarea fibroinei vine din dorinta de a creste controlul asupra eliberarii medicamentelor (5-FU) si doxorubicin.

Modificarea chimica a fibroinei consta intr-o reactie de grefare prin mecanism radicalic in prezenta unui sistem de initiere redox. Sistemul de initiere are la baza azotat amoniacal de ceriu si acid azotic. Astfel de sisteme se folosesc frecvent pentru grefarea polimerilor sintetici cu monomeri vinilici si prezinta un mecanism de reactie specific.

Optimizarea paramerilor de sinteza are ca scop controlul caracteristicilor nanoparticulelor si crearea unor grefe sub forma de lanturi laterale secundare.

Caracterizarea fizico-chimica este prima etapa in evidentirea reactiei si expunerea mecanismului de sinteza. Investigatia a fost realizata prin mai multe tehnici (FTIR, RAMAN, XPS) si arata un mecanism de aditie a monomerului vinilic (N-izopropil acrilamida) diferit fata de datele prezente in literatura pentru polimerii sintetici. In acest caz, monomerul sintetic se leaga covalent la aminoacidul tirozina si nu la aminoacidul serina (nucleul aromatic asigura o mai buna stabilizare in etapa de formare a radicalului).

Fibroina modificata (SF-g-PNIPAM) este supusa unor seturi de investigatii structural-conformationale (XRD; CD) si termice (DSC; TGA) prin care se confirma influenta cresterii polimerului sintetic (PNIPAM) pe lantul de fibroina. In acelasi timp sunt prezentate influentele aduse de PNIPAM asupra aranjarii structurale a fibroinei. In urma investigatiilor se constata obtinerea unei structuri direct reticulate.

In urma reactiei este expus un mecanim de reactie ce implica stari de tranzitie de tip radical/carbocation pana la desfacerea dublei legaturi si aditia monomerului la ciclul aromatic al tirozinei.

Cu ajutorul fibroinei modificate se sintetizeaza nanoparticule prin aceeasi metoda, nanoprecipitare. Nanoparticulele sintetizate au o structura reticulata chimic si sunt incarcate cu cele doua medicamente, (5-FU) si doxorubicin.

Testele de eliberare au aratat in cazul medicamentului (5-FU) un profil de eliberare asemanator cu cazul nanoparticulelor din fibroina simpla. In cazul medicamentului doxorubicin profilul de eliberare prezinta un control mai mare asupra eliberarii si o eficienta de eliberare mai mare.

Ultimul capitol al celei de-a doua directii de cercetare dezvolta nanoparticule pe baza de sericina prin metoda nanoprecipitarii. Acestea se obtin in aceleasi conditii ca si nanoparticulele de fibroina si fibroina grefata. Au fost sintetizate nanoparticule din sericina cu dimensiuni mai reduse comparativ cu alte sisteme pe baza de sericina.

Analiza morfologica prin TEM evidentiaza dimensiunile reale ale nanoparticulelor (15-40 nm ) in comparatie cu SEM si analiza DLS care evidentiaza doar dimensiunea aglomeratelor de nanoparticule.

Evaluarea testelor de eliberare consta in incarcarea initiala a nanoparticulelor cu doua medicamente antitumorale (5-FU si doxorubicin) si in ultima etapa eliberarea propriu-zisa. In cazul medicamentului 5-FU se constata un profil de eliberare prea rapid fara un control eficient. In cazul medicamentului doxorubicin se constata eliberarea medicamentului din nanoparticule in procente diferite in functie de mediul de eliberare (ph neutru, acid sau conditii enzimatic).

Nanoparticulele incarcate si neincarcate cu doxorubicin au fost supuse si unui set de investigatii biologice (teste de viabilitate, citotoxicitate si citoschelet) prin care se prezinta actiunea sistemelor asupra liniilor celulare (linii celulare de cancer de san). O activitate semnificativa de vede dupa aproximativ 24 de ore.

Teza se incheie cu un capitol separat de concluzii generale si contributi originale.