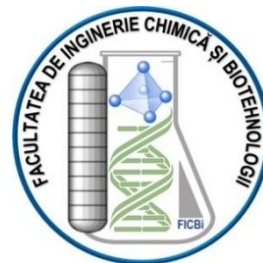




Universitatea Națională de Știință și Tehnologie
POLITEHNICA București

Școala Doctorală de Inginerie Chimică și Biotehnologii



TEZĂ DE DOCTORAT

MATERIALE COMPOZITE PENTRU TRATAMENTUL ȚINTIT AL CANCERULUI OSOS

Coordonator științific: Prof. Dr. Ing. Anton FICAI

Student doctorand: Ing. Alina Florentina VLADU

BUCUREȘTI 2025

CUPRINS

1. STADIUL ACTUAL AL DEZVOLTĂRII ÎN DOMENIU.....	2
1.1. Cancerul osos: perspective clinice, terapeutice și soluții inovatoare în ingineria țesutului.....	2
2. CONTRIBUȚII ORIGINALE.....	3
2.1. Obiective generale și specifice ale cercetării.....	3
2.2. Materiale și metode.....	4
2.3. Grefe compozite chitosan/hidroxiapatită pentru ingineria țesutului osos.....	4
2.4. Rolul agenților de reticulare în dezvoltarea materialelor compozite collagen-hidroxiapatită utilizate în ingineria țesutului osos.....	7
2.5. Terapia combinată localizată utilizând grefe osoase de collagen-hidroxiapatită pentru inhibarea cancerului osos și regenerarea țesutului.....	12
3. CONCLUZII.....	17
3.1. Concluzii generale.....	17
3.2. Contribuții originale.....	18
3.3. Direcții viitoare de dezvoltare.....	18
LISTA DE PUBLICAȚII.....	20
PARTICIPĂRI LA CONFERINȚE INTERNAȚIONALE.....	21
PREMII.....	22
BIBLIOGRAFIE SELECTIVA.....	23

1. STADIUL ACTUAL AL DEZVOLTĂRII ÎN DOMENIU

1.1. Cancerul osos: perspective clinice, terapeutice și soluții inovatoare în ingineria țesutului

Osul este un țesut mineralizat activ, implicat în susținerea organismului, hematopoieză și homeostazia minerală. Osteosarcomul (Fig.1) este cea mai frecventă tumoră osoasă malignă, cu incidență crescută la adolescenți și seniori, localizată mai ales la nivelul oaselor lungi. Se caracterizează prin producția de osteoid malign, durere localizată și risc de fracturi patologice. Metastazele apar frecvent la nivelul plămânilor, iar supraviețuirea la 5 ani rămâne modestă (~54%, respectiv ~20% în formele metastatice). Rata mare de recidivă evidențiază necesitatea dezvoltării unor terapii mai eficiente și inovatoare [1-4].

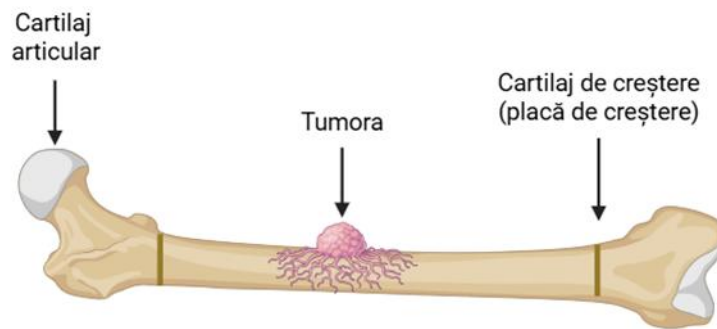


Figura 1. Ilustrație schematică a cancerului osos (Sursa imaginii: Creat cu Biorender)

Osteosarcomul se tratează prin combinarea chimioterapiei, intervenției chirurgicale și radioterapiei. Chimioterapia sistemică reduce tumora, dar este limitată de rezistența celulelor tumorale și efectele secundare. Chirurgia cu rezecție largă asigură controlul local, fiind adesea urmată de reconstrucții cu endoproteze sau grefe osoase. Radioterapia are rol adjuvant sau paliativ, mai ales în tumorile nerezecabile sau metastatice. În ciuda eficienței abordărilor convenționale, limitările lor evidențiază necesitatea dezvoltării de terapii inovatoare mai sigure și mai eficiente [5-7].

Osul este un material compozit cu fază anorganică (hidroxiapatită) și organică (colagen), iar matricea extracelulară reglează formarea și remodelarea osoasă. Limitările grefelor biologice

au condus la dezvoltarea biomaterialelor, inclusiv scaffold-uri 3D pentru ingineria tisulară, care susțin adeziunea și diferențierea celulelor. Structura și proprietățile mecanice ale scaffold-urilor influențează osteointegrarea și vascularizarea. Compozitele polimer–ceramică, precum collagen/hidroxiapatită sau chitosan/hidroxiapatită, imită osul natural și promovează regenerarea eficientă a țesutului osos [8-11].

Chimioterapia implică agenți precum doxorubicină (DOX), cisplatină, metotrexat, paclitaxel și 5-fluorouracil, adesea folosiți în sisteme de eliberare țintită (scaffold-uri, nanoparticule) pentru eficiență și reducerea efectelor secundare. Stresul oxidativ, prin acumularea speciilor reactive de oxigen (ROS), joacă un rol dublu în cancer: niveluri moderate favorizează proliferarea, migrarea și supraviețuirea celulelor tumorale, în timp ce niveluri ridicate pot induce moartea celulelor canceroase. Polifenolii naturali (curcumină, acid cafeic (CA), resveratrol) acționează ca antioxidanți, reducând ROS dăunătoare și protejând ADN-ul, dar pot acționa și ca pro-oxidanți în celulele canceroase, stimulând apoptoza. Astfel, polifenolii pot preveni inițierea cancerului prin neutralizarea ROS excesive și pot spori eficiența tratamentelor chimioterapice prin inducerea stresului oxidativ selectiv în celulele tumorale [12-14].

2. CONTRIBUȚII ORIGINALE

2.1. Obiective generale și specifice ale cercetării

Obiectivul principal a fost obținerea și caracterizarea unor materiale compozite inovative pentru regenerarea țesutului osos afectat de tumori maligne și pentru tratamentul localizat al cancerului osos, prin încărcarea cu compuși naturali și sintetici cu efect sinergic.

Obiective specifice:

1. **Obținerea de grefe chitosan–hidroxiapatită** și caracterizarea lor structurală (FT-IR, TG-DSC, SEM) și biologică prin testare a biocompatibilității și citotoxicității.
2. **Sinteza de compozite collagen–hidroxiapatită reticulate** și evaluarea absorbției apei, stabilității enzimatică, caracterizarea morfologică și structurală (SEM, EDX, FT-IR, XRD, TG-DSC), testarea mecanică și a activității antimicrobiene.

3. **Obținerea de grefe collagen–hidroxiapatită încărcate cu doxorubicină și acid cafeic** și caracterizarea fizico-chimică (absorbție apă, degradare enzimatică, SEM, EDX, FT-IR, XRD, TG-DSC) și evaluarea biologică a biocompatibilității și activității antitumorale.

2.2. Materiale și metode

Sistemele compozite pe bază de chitosan și hidroxiapatită (CS/HAp) au fost obținute prin dizolvarea chitosanului în acid acetic 1% pentru a forma o soluție de 2%, urmată de adăugarea treptată a precursorilor de hidroxiapatită (Ca(OH)_2 și $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$) pentru sinteză *in situ*. Gelul rezultat a fost liofilizat pentru a păstra structura poroasă și caracterizat prin FT-IR, TG-DSC, SEM și teste biologice de biocompatibilitate și viabilitate celulară. Compozitele pe bază de collagen și hidroxiapatită (Coll/HAp) au fost sintetizate în rapoarte de 3:1 (seria I) și 1:1 (seria II) prin amestecarea gelului de collagen 1% cu precursorii de calciu și fosfat pentru a forma hidroxiapatită *in situ* (raport Ca/P = 1,67), urmată de reticularea gelului cu glutaraldehidă, acid tanic sau genipină și liofilizarea acestuia pentru obținerea unor structuri poroase tip burete, fiind ulterior caracterizate structural și morfologic. În final, grefele Coll/HAp 1:1 au fost încărcate cu doxorubicină (DOX) și acid cafeic (CA), după reticularea cu genipină (GP), folosind doxorubicină dizolvată în apă și acid cafeic dizolvat în etanol, rezultând probele martor GP, Coll/HAp/DOX – 7A, Coll/HAp/CA – 8A, Coll/HAp/DOX/CA – 9A. Matricile poroase au fost obținute prin liofilizare și concepute pentru a combina proprietăți regenerative cu activitate antitumorală.

2.3. Grefe compozite chitosan/hidroxiapatită pentru ingineria țesutului osos

Scopul studiului a fost dezvoltarea de sisteme compozite pe bază de chitosan și hidroxiapatită (CS/HAp) pentru regenerarea țesutului osos, obținute prin sinteza *in situ* a hidroxiapatitei și liofilizare. Analiza FT-IR (Fig.2) a confirmat prezența grupărilor caracteristice atât pentru componenta organică, cât și pentru cea anorganică, evidențiind interacțiuni între chitosan și HAp. Banda largă din regiunea $3125\text{--}3325\text{ cm}^{-1}$ corespunde vibrațiilor N–H și O–H, iar benzile 2864 și 2922 cm^{-1} reflectă întinderile legăturilor C–H. Maximele de la 1541 și 1402 cm^{-1} indică vibrațiile amidei II și deformările grupărilor C–H sau carboxilice, iar banda de la 1643 cm^{-1} corespunde amidei I (C=O). Prezența hidroxiapatitei este confirmată prin benzile 655 , 615 , 560 , 960 și 1018 cm^{-1} specifice grupării fosfat.

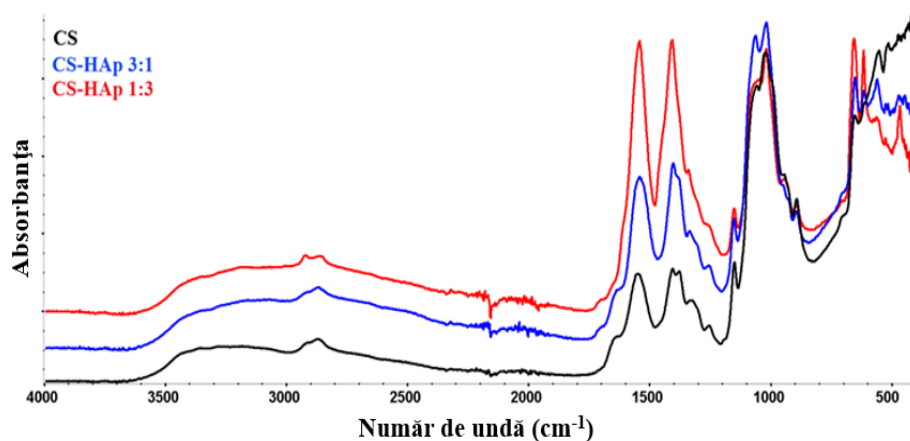


Figura 2. Spectrele FT-IR ale CS (negru), CS/HAp 1:3 (roșu) și CS/HAp 3:1 (albastru)

Caracterizarea termogravimetrică (Fig.3) a arătat diferențe în comportamentul termic al probelor în funcție de conținutul de HAp, indicând etape multiple de degradare și interacțiuni între chitosan și componentele minerale.

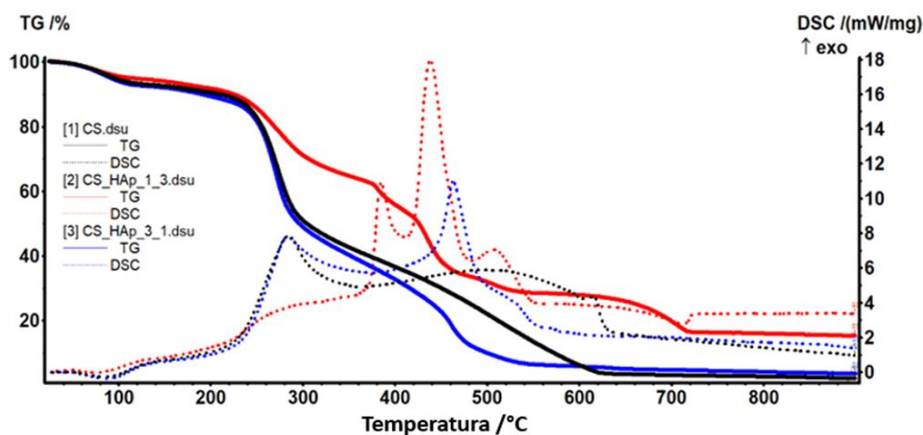
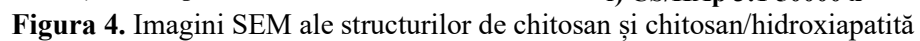


Figura 3. Curbele TG-DSC pentru sistemele compozite pe bază de CS și HAp

Imaginile de microscopie electronica de baleiaj (Fig. 4) au evidențiat structura tridimensională poroasă a suporturilor CS/HAp, cu pori interconectați ce permit pătrunderea și proliferarea celulară. Fibrele de chitosan, vizibile și în probele nemineralizate, devin mai groase și uniform acoperite de faza anorganică după mineralizare. Tijele nanometrice și sfere de hidroxiapatită cu dimensiuni între 10–500 nm s-au dispersat uniform de-a lungul fibrelor, conferind o morfologie adecvată pentru interacțiunea cu celulele osteogenice. Această combinație de porozitate și



Rezultatele testelor de biocompatibilitate și citotoxicitate (Fig. 5) indică faptul că sistemele compozite CS/HAp susțin proliferarea osteoblastelor și prezintă un nivel foarte scăzut de citotoxicitate, confirmând siguranța lor pentru aplicații în regenerarea țesutului osos și posibilă utilizare ca suport pentru eliberarea locală a medicamentelor.

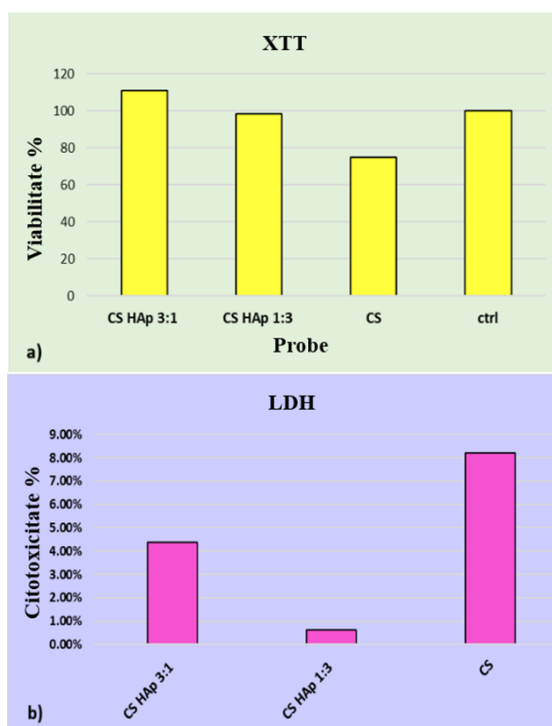


Figura 5. Viabilitatea osteoblastelor a) și citotoxicitatea sistemelor compozite b)

În concluzie, sistemele CS/HAp obținute reprezintă candidați promițători pentru repararea țesutului osos și dezvoltarea de platforme pentru eliberarea controlată a medicamentelor.

2.4. Rolul agenților de reticulare în dezvoltarea materialelor compozite collagen-hidroxiapatită utilizate în ingineria țesutului osos

Studiul a vizat dezvoltarea de suporturi de collagen/hidroxiapatită (Coll/HAp) reticulate cu trei agenți diferiți, obținute prin liofilizare după sinteza *in situ* a hidroxiapatitei, pentru aplicații în ingineria țesutului osos. Capacitatea de absorbție a apei (Fig. 6) a fost ridicată pentru toate probele, între 23 și 40 g/g, iar prezența hidroxiapatitei a redus ușor absorbția, fără influență semnificativă a agenților de reticulare. Degradarea enzimatică prin imersarea în soluție de collagenază (Fig. 6) a

arătat că probele cu mai puțină hidroxiapatită se degradează mai rapid, în timp ce cele cu un conținut mai mare de HAp au prezentat degradare mai lentă datorită protecției conferite de faza minerală.

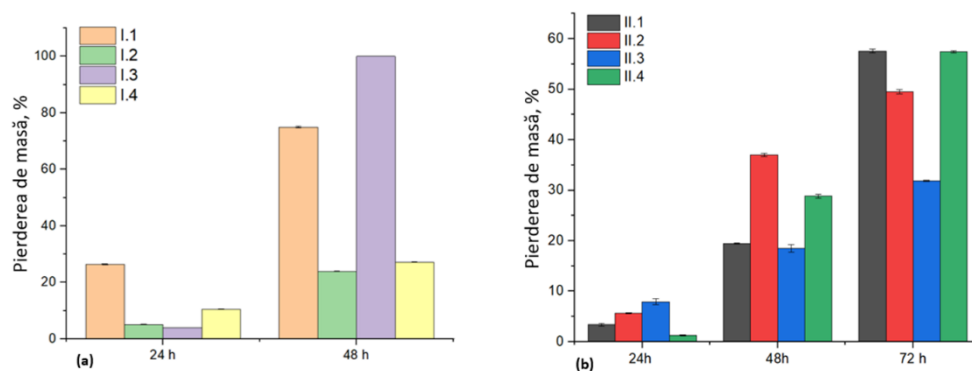


Figura 6. Degradarea enzimatică a probelor compozite: (a) Seria I; (b) Seria II

Analiza morfologică prin microscopie electronică de baleiaj (Fig. 7) a evidențiat o structură spongioasă, cu pori interconectați de 50–300 μm , favorabilă migrației și proliferării osteoblastelor. Liofilizarea a îmbunătățit morfologia matricei de collagen, iar probele reticulate cu genipină au fost mai compacte. Distribuția fazei anorganice a fost omogenă, cu aglomerate între 1 și 50 μm , iar mineralizarea fibrelor de collagen a fost uniformă.

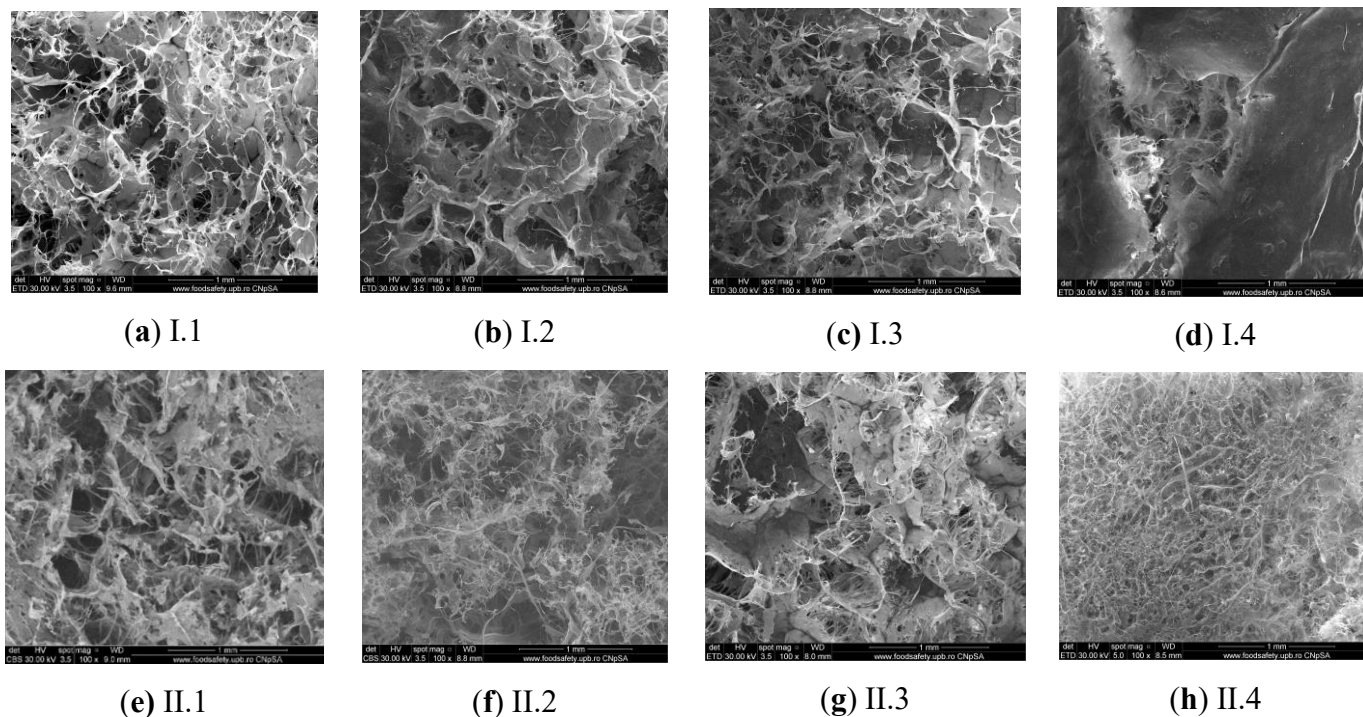


Figura 7. Imaginile SEM obținute pentru suporturile compozite ($\times 100$): (a) I.1, (b) I.2, (c) I.3, (d) I.4, (e) II.1, (f) II.2, (g) II.3, (h) II.4

Analiza EDX a confirmat prezența elementelor caracteristice hidroxiapatitei (Tabel 1), precum Ca, P și O, raportul atomic Ca/P fiind de 1,68, apropiat de cel al hidroxiapatitei stoichiometrice, iar cantitățile de Na și Cl provin din procesul de producție și sunt non-toxice.

Tabel 1. Compoziția elementală a probei II.4

Element	Procent masic %	Procent atomic %	Eroare %
C K	22.63	33.83	12.54
O K	43.26	48.55	11.18
Na K	3.03	2.37	14.86
P K	9.08	5.26	5.4
Cl K	2.17	1.1	7.23
Ca K	19.83	8.88	2

În ansamblu, probele prezentate combină porozitatea optimă, distribuția uniformă a fazei minerale și stabilitatea structurală, ceea ce le face potrivite pentru utilizare ca suporturi osoase în regenerarea țesutului afectat.

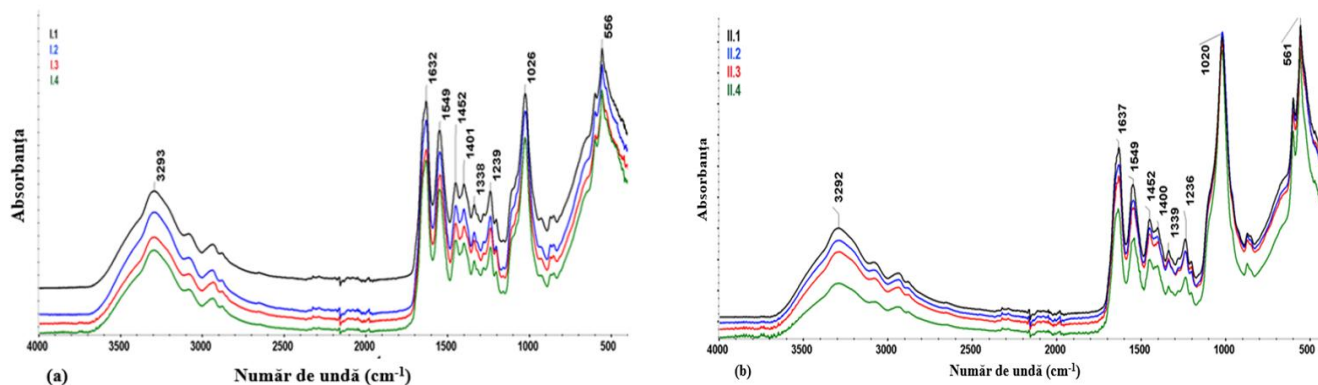


Figura 8. Spectrele FT-IR ale materialelor compozite (a) Coll/HAp 3:1 și (b) Coll/HAp 1:1

Analiza FT-IR (Fig. 8) a confirmat prezența atât a componentelor organice, cât și a celor anorganice în probele Coll/HAp. Benzile caracteristice collagenului au fost identificate în regiunile 3293–1239 cm^{-1} , corespunzătoare amidelor și grupărilor funcționale N–H, C–H și C–N, în timp ce benzile hidroxiapatitei au fost vizibile la 1026, 556 și 615 cm^{-1} , cu un mic vârf la 950 cm^{-1} și un vârf la 872 cm^{-1} , indicând prezența brușitului și a carbonatului. Difracția de raze X (XRD) a evidențiat formarea unei hidroxiapatite mai amorfe, similară cu osul natural, cu principalele maxime la $2\theta \approx 26^\circ$ și 32° (Fig. 9).

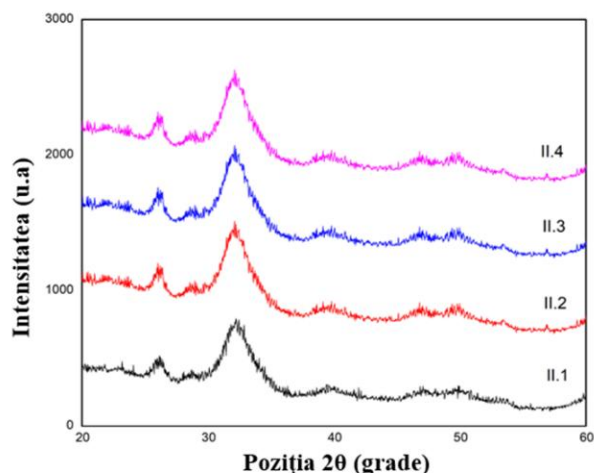


Figura 9. Difractogramele obținute pentru suporturile ce conțin Coll/HAp 1:1

Analiza termică (TG-DSC) (Fig. 10) a arătat pierderea apei slab legate până la 135°C, urmată de denaturarea parțială a collagenului și oxidarea fragmentelor între 135 și 400°C și oxidarea masei carbonice și denisificarea HAp și eliminarea grupărilor -OH după 400°C. Conținutul estimat de HAp estimat a fost de 19–22% pentru Coll/HAp 3:1 și 42–44% pentru Coll/HAp 1:1.

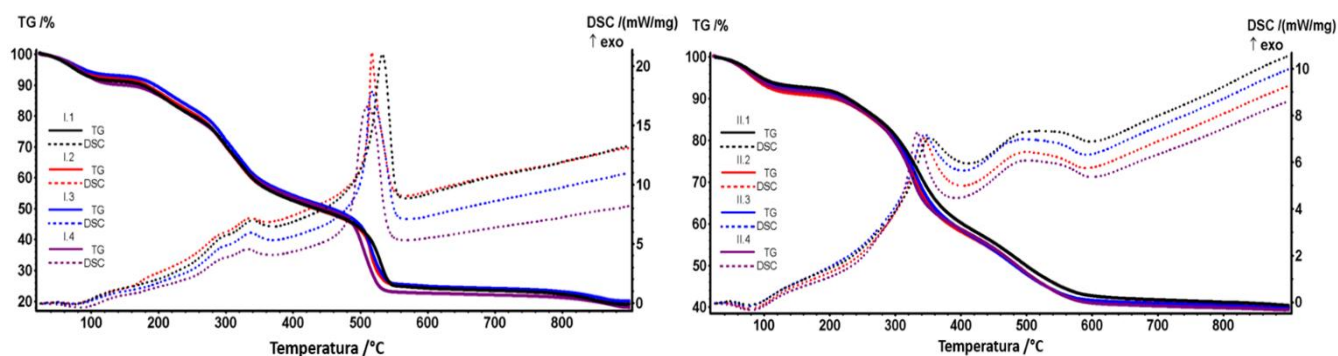


Figura 10. Curbele TG-DSC pentru seria I care conține Coll/HAp 1:3 (stânga) și pentru seria II care conține Coll/HAp 1:1 (dreapta)

Materialele compozite pe bază de collagen și hidroxiapatită (Coll/HAp) au evidențiat valori ale durității Shore A cuprinse între 21 și 30 (Fig. 11 (a)), precum și un modul Young situat în intervalul 37,5–98,5 kPa (Fig. 11 (b)), caracteristici specifice unor structuri moi și poroase. Aceste proprietăți le recomandă pentru utilizarea ca scaffold-uri destinate regenerării osoase în stadiile incipiente, în special la nivelul osului spongios. Creșterea proporției de hidroxiapatită determină o îmbunătățire a rigidității și rezistenței la compresiune, însă valorile obținute rămân moderate, fiind adecvate pentru zone cu solicitări mecanice reduse. Modulul Young scăzut favorizează procesele

celulare esențiale, precum aderența, proliferarea și diferențierea osteoblastelor, prin crearea unui microambient biomecanic comparabil cu cel al osului natural. Totodată, aceste scaffold-uri permit difuzia eficientă a nutrienților și semnalizarea mecanică specifică țesutului osos. Pentru ameliorarea proprietăților mecanice, o strategie viabilă o constituie mineralizarea suplimentară a schelelor prin imersie în soluții biomimetice (SBF) înainte de implantare..

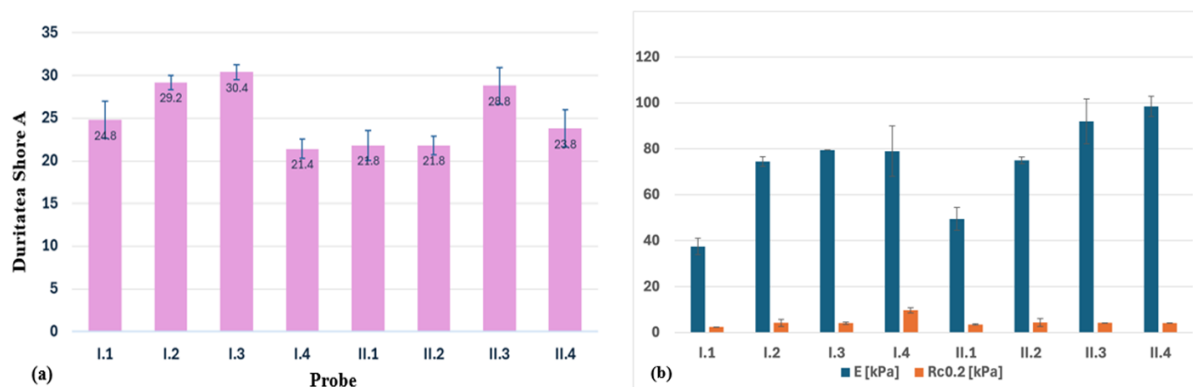


Figura 11. (a) Duritatea Shore A și (b) modulul lui Young și rezistența la compresiune ale scaffold-urilor compozite

Materialele compozite Coll/HAp au demonstrat activitate antimicrobiană împotriva *E. coli* și *S. aureus*, cu zone de inhibiție ≥ 20 mm pentru probele reticulate. Probele cu conținând o cantitate mai mare de hidroxiapatită au prezentat ușoare creșteri ale efectului datorită eliberării de ioni și modificării pH-ului local. Activitatea ridicată se datorează agenților de reticulare și compușilor fenolici, care afectează peretele celular, enzimele și ADN-ul bacterian, fiind mai intensă asupra *S. aureus*, agent frecvent implicat în infecțiile grefelor osoase (Fig. 12).

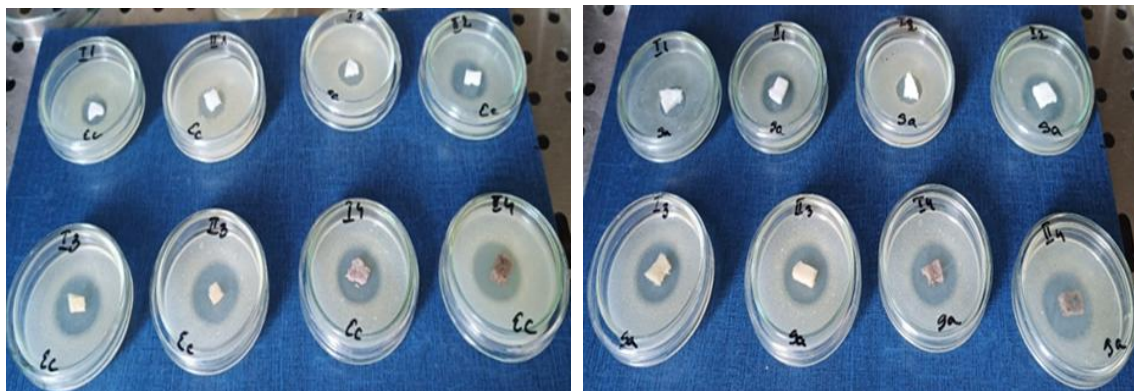


Figura 12. Efectul antibacterian al probelor Coll/HAp asupra tulpinilor *E. coli* (stânga) și *S. aureus* (dreapta)

Capitolul a evidențiat dezvoltarea compozitelor collagen–hidroxiapatită obținute prin liofilizare și reticulate cu trei agenți diferiți, cu porozitate interconectată adecvată pentru regenerarea osoasă. Hidroxiapatita s-a format *in situ*, fiind uniform distribuită, iar probele reticulate cu agenți naturali (acid tanic și genipină) au manifestat o activitate antibacteriană puternică împotriva *E. coli* și *S. aureus*. Deși proprietățile mecanice necesită optimizare pentru aplicații în zone solicitate mecanic, cele mai promițătoare rezultate au fost obținute pentru probele reticulate și cu un conținut mai mare de hidroxiapatită (seria II), care vor fi evaluate pentru citocompatibilitate și încărcate ulterior cu agenți antitumorali, în vederea utilizării lor în tratamentul cancerului osos.

2.5. Terapia combinată localizată utilizând grefe osoase de collagen-hidroxiapatită pentru inhibarea cancerului osos și regenerarea țesutului

Studiul a urmărit dezvoltarea de scaffold-uri multifuncționale collagen–hidroxiapatită, încărcate cu doxorubicină și acid cafeic, pentru tratamentul osteosarcomului, combinând regenerarea osoasă cu inhibarea tumorală. Analiza capacității de absorbție a apei (Fig. 13) a prezentat valori cuprinse între ~23–32 g/g, cu o retenție rapidă de apă și stabilizare la 24 de ore. Proba 9A a prezentat o absorbție ușor mai ridicată, atribuită hidrofiliei conferite de compușii activi, în timp ce proba GP a înregistrat valori mai scăzute, probabil din cauza densității crescute și a caracterului hidrofob al genipinei. Diferențele statistice dintre probe au fost evidente în primele ore, dar s-au estompat după atingerea echilibrului, cu excepția probei 9A, care a menținut o absorbție superioară.

Degradarea enzimatică a compozitelor Coll/HAp încărcate cu doxorubicină și acid cafeic (Fig. 13) a evidențiat o stabilitate superioară față de proba martor GP, care a fost complet degradată după 6 zile. Probele 7A și 9A au prezentat valori negative inițiale, explicate prin inhibarea collagenazei de către doxorubicină, efect potențat în cazul probei 9A de prezența acidului cafeic. Dintre toate formulările, 9A a demonstrat cea mai mare rezistență enzimatică, cu o pierdere de masă de aproximativ 40% după 7 zile, sugerând un efect sinergic stabilizator al celor doi compuși. Analizele statistice au arătat diferențe semnificative comparativ cu GP începând de la 2 ore, iar după 144 h toate matricile încărcate au prezentat o degradare semnificativ mai redusă, confirmând rolul agenților activi în creșterea stabilității structurale.

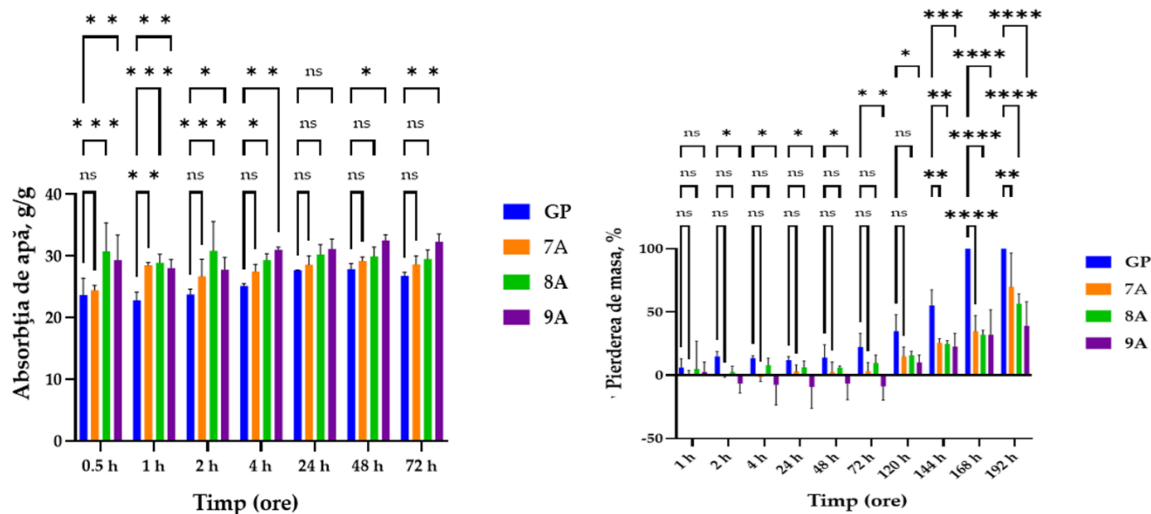


Figura 13. Absorbția de apă (stânga) și degradarea enzimatică (dreapta) pentru matricile 7A, 8A, 9A și GP. Rezultatele nu sunt statistic semnificative (ns) pentru valori $p > 0,05$; rezultatele sunt statistic semnificative pentru: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$

Microstructura scaffold-urilor compozite collagen/hidroxiapatită încărcate cu doxorubicină și acid cafeic a fost analizată prin microscopie electronică de baleiaj (Fig.14), evidențiind o arhitectură de tip burete, cu porozitate ridicată și pori interconectați, cu dimensiuni între 20 și 250 μm , favorabili migrației osteoblastelor și difuziei nutrienților. Structura fibrelor de collagen este bine conservată, iar faza anorganică (hidroxiapatita) este distribuită omogen și prezintă dimensiuni nanometrice.

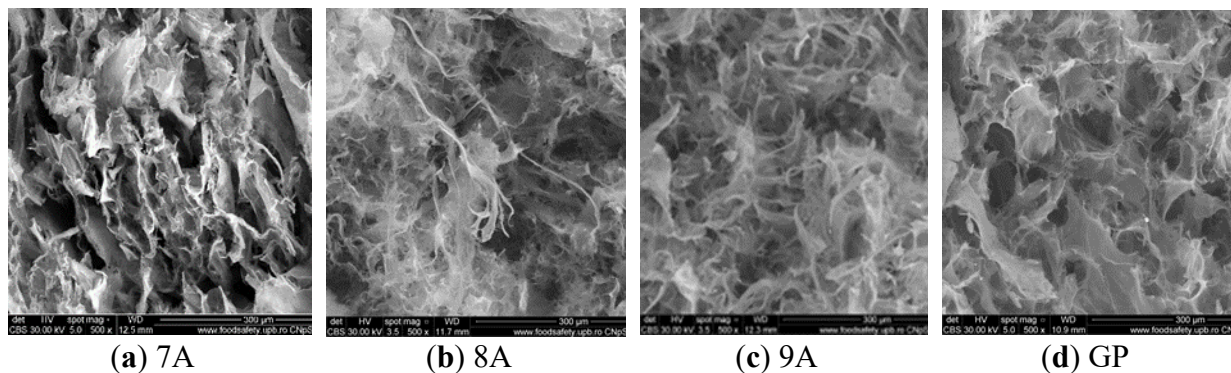


Figura 14. Microstructura scaffold-urilor compozite încărcate (x500): (a) 7A, (b) 8A, (c) 9A, (d) GP

Spectroscopia FT-IR a confirmat prezența collagenului și a hidroxiapatitei în scaffold-urile încărcate, prin identificarea benzilor caracteristice la 3294, 1636, 1541, 1448 și 1237 cm^{-1} pentru collagen și 1025, 1103, 559 și 601 cm^{-1} pentru hidroxiapatită (Fig. 15). Suprapunerea parțială a benzilor în regiunile 3100–3400 cm^{-1} și 1400–1636 cm^{-1} sugerează interacțiuni moleculare, precum legături de hidrogen sau interacțiuni electrostatice, între matricea organică și faza anorganică. Prezența doxorubicinei, acidului cafeic și genipinei nu poate fi detectată cu certitudine din cauza cantităților mici și a suprapunerii cu benzile collagenului.

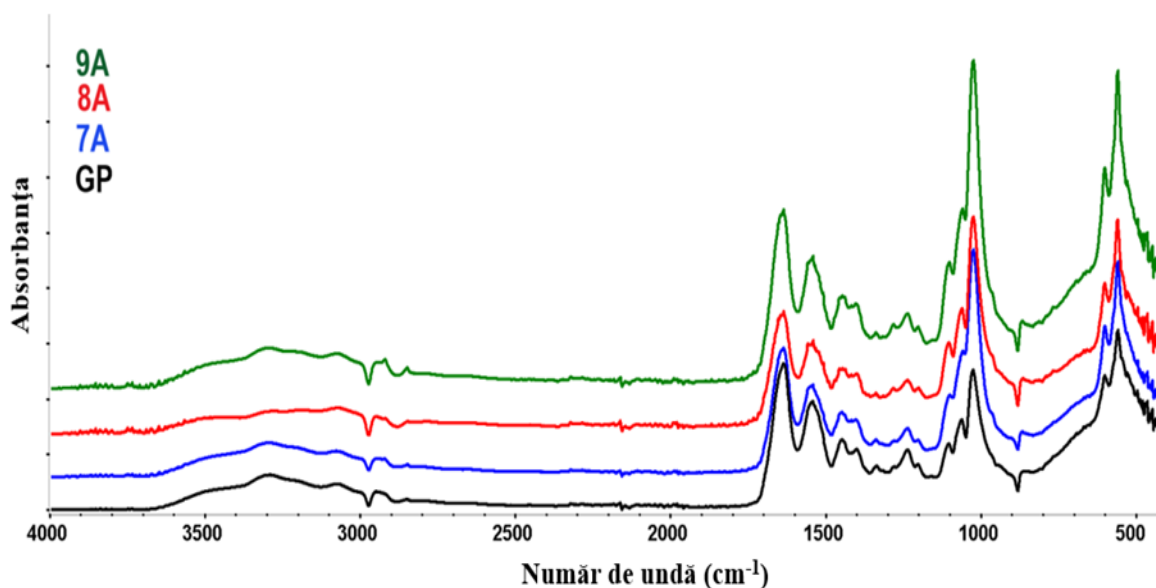


Figura 15. Spectrele FT-IR pentru probele 7A, 8A, 9A și GP

Analiza TG-DSC (Fig. 16) a evidențiat pierderea apei libere până la 200°C (8–9%), urmată de degradarea și oxidarea componentelor organice între 200–540°C (50–52%), cu maxime exotermice la 329–339°C și 465–475°C. După 540°C, pierderea de masă este redusă (~4%), corespunzând fazei anorganice. Masa reziduală finală este de 34–38%, ușor mai mică în probele încărcate cu doxorubicină sau acid cafeic, indicând stabilitate termică bună și degradare controlată a materialului.

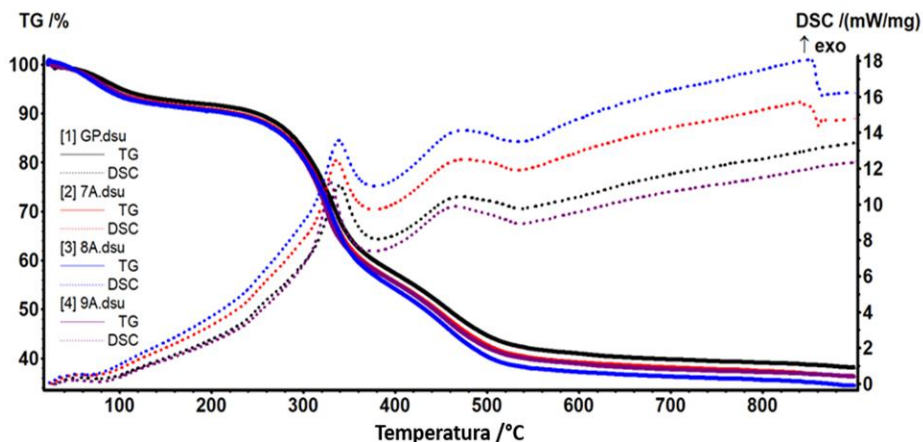


Figura 16. Curbele TG-DSC pentru probele 7A, 8A, 9A și GP

Difractogramele obținute pentru compozitele antitumorale includ maximele de difracție ale principalelor plane ale hidroxiapatitei: (002) la $2\theta = 25,88^\circ$, (120) la $2\theta = 28,92^\circ$, (121) la $2\theta = 31,76^\circ$, (112) la $2\theta = 32,19^\circ$, (030) la $2\theta = 32,89^\circ$ și (222) la $2\theta = 46,69^\circ$, având structură hexagonală (Fig. 17). Lărgirea maximelor de difracție indică cristalite de hidroxiapatită la scară nanometrică, sugerând formarea unei faze nanostructurate. Dimensiunea cristalitelor, determinată prin metoda de rafinare Rietveld, este de ~ 3 nm pentru fiecare probă analizată. Această dimensiune nanometrică este esențială pentru proprietățile bioactive ale osului. Cristalinitatea probelor este de ~ 30 – 31% , evidențiind o structură mai amorfă, biomimetică, similară cu cea a osului natural, cunoscută pentru sporirea bioactivității și resorbabilității, promovând astfel osteointegrarea și regenerarea țesutului osos.

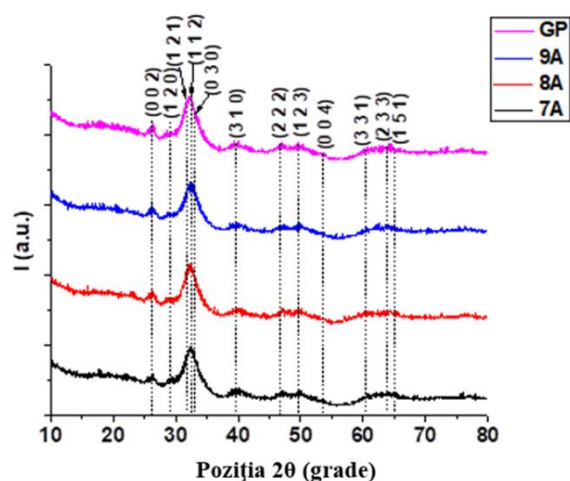


Figura 17. Difractogramele compozitelor antitumorale – 7A, 8A, 9A și GP

Testele *in vitro* au evaluat efectul citotoxic al extractelor probelor 7A (încărcată cu DOX), 8A (încărcată cu CA) și 9A (încărcată cu DOX/CA) asupra celulelor osteosarcom MG63 și a celulelor stem mezenchimale BMSC. După 24 de ore, nu s-au înregistrat eliberări semnificative de LDH, iar viabilitatea celulelor a fost în general similară cu cea a martorului. Proba 7A a redus viabilitatea sub 70%, în timp ce 8A a avut un efect ușor protector, iar 9A a menținut viabilitatea BMSC la ~94%, în timp ce MG63 a fost afectată (~51%) (Fig. 18).

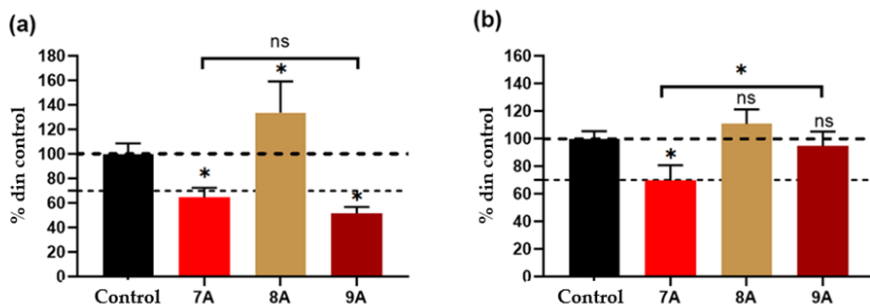


Figura 18. Viabilitatea celulară a celulelor MG63 (a) și BMSC (b) cultivate cu extracte 100% din fiecare probă, timp de 1 zi. Mediul complet de creștere a fost utilizat ca martor. Linia întreruptă indică pragul de 70% pentru efect toxic. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm abatere standard ($n \geq 3$, probe independente, $*p < 0,05$)

După 3 zile, extractele 7A și 9A au redus semnificativ viabilitatea MG63 (sub 7% și 20%), în timp ce 9A a menținut o viabilitate mai mare a BMSC (~17%), sugerând un efect protector selectiv al acidului cafeic (Fig. 19).

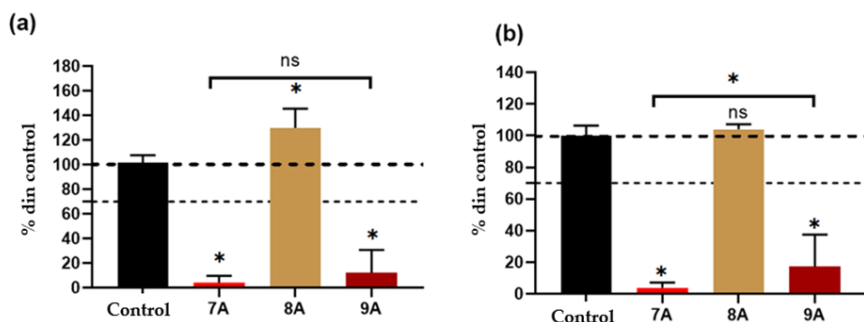


Figura 19. Viabilitatea celulară a celulelor MG63 (a) și BMSC (b) cultivate timp de 3 zile cu extracte 100% din fiecare probă. Rezultatele sunt exprimate ca medie \pm deviație standard ($n \geq 3$, probe independente, $*p < 0,05$)

Combinăția DOX–CA inhibă proliferarea osteosarcomului, menținând compatibilitatea cu celulele stem. Efectul selectiv al CA poate fi atribuit proprietăților antioxidante și mecanismelor naturale de apărare ale BMSC. Scaffold-urile 9A reprezintă candidați promițători pentru terapii combinate anti-osteosarcom, necesitând însă studii suplimentare de doză-răspuns și analize mecanistice. Concluziile subliniază potențialul scaffold-urilor ca terapie combinată locală, oferind atât activitate anticancerigenă, cât și suport pentru regenerarea osoasă, și recomandă continuarea studiilor *in vivo* pentru optimizarea încărcării și eliberării medicamentelor.

3. CONCLUZII

3.1. Concluzii generale

Teza a vizat dezvoltarea și caracterizarea scaffold-urilor compozite pentru regenerarea osoasă și tratamentul local al osteosarcomului, utilizând materiale biomimetice pe bază de chitosan sau collagen și hidroxiapatită, încărcate cu substanțe active sintetice și naturale (doxorubicină și acid cafeic).

Materialele CS/HAp și Coll/HAp au fost obținute prin sinteză *in situ* a hidroxiapatitei și liofilizare, prezentând structuri poroase cu pori interconectați (17–300 μm), fază anorganică nanostructurată dispersată uniform și proprietăți termice și mecanice adecvate regenerării osoase. Analizele FT-IR, XRD, SEM-EDX și TG-DSC au confirmat integrarea uniformă a fazelor organice și anorganice, formarea hidroxiapatitei nanocristaline și stabilitatea termică crescută, în special la probele cu conținut mai mare de HAp.

Scaffold-urile Coll/HAp au prezentat capacitate ridicată de absorbție a apei (~23–40 g/g), rezistență enzimatică crescută proporțional cu HAp, activitate antibacteriană semnificativă și duritate Shore A între 21–30, cu modul Young între 37,5–98,5 kPa, valori caracteristice materialelor moi, poroase și biomimetice.

Probele încărcate cu DOX și CA (în special 9A) au combinat eficient activitatea anticancer cu protecția celulelor stem: DOX a redus viabilitatea osteosarcomului MG63 la <7–20%, în timp ce CA a menținut viabilitatea BMSC (~17%). Scaffold-urile au demonstrat stabilitate structurală crescută, capacitate de retenție a apei și distribuție uniformă a hidroxiapatitei nanometrice, oferind suport optim pentru regenerarea țesutului osos.

În concluzie, aceste materiale compozite multifuncționale prezintă potențial terapeutic și regenerativ, oferind un sistem de administrare locală al medicamentelor care poate crește eficiența tratamentului osteosarcomului și reduce toxicitatea sistemică, deschizând noi perspective pentru ingineria tisulară și terapia oncologică ortopedică.

3.2. Contribuții originale

În cadrul acestei teze de doctorat s-au adus o serie de contribuții originale în ceea ce privește dezvoltarea de sisteme de compozite de eliberare a medicamentelor utilizate în terapia cancerului osos.

Astfel, se conturează următoarele elemente de originalitate:

- **Determinarea rolului diferiților agenți de reticulare** în dezvoltarea sistemelor compozite pe bază de colagen și hidroxiapatită utilizate în ingineria țesutului osos
- **Dezvoltarea unui tip nou de grefă osoasă** din colagen și hidroxiapatită, obținută prin liofilizare, care încorporează simultan două substanțe active — doxorubicină (agent chimioterapic sintetic) și acid cafeic (compus natural cu efecte antioxidante și anticancerigene).
- **Abordarea combinată pentru tratamentul osteosarcomului și regenerarea osoasă**, concept mai puțin explorat în literatura de specialitate, folosind concomitent un agent citotoxic și unul natural cu rol protector.
- **Studierea efectului sinergic** exercitat de combinarea acidului cafeic cu doxorubicina, care a demonstrat o citotoxicitate ridicată față de celulele de osteosarcom MG63 și efect protector parțial asupra celulelor stem mezenchimale (BMSC), posibil datorită proprietăților antioxidante ale acidului cafeic.

3.3. Direcții viitoare de dezvoltare

Rezultatele obținute în cadrul acestei teze de doctorat pentru materialele compozite prezentate evidențiază potențialul lor terapeutic și regenerativ, oferind totodată noi direcții și oportunități pentru cercetări viitoare, precum:

- **Optimizarea compoziției materialului** pentru a îmbunătăți atât proprietățile mecanice, cât și performanța biologică.

- **Testarea extinsă *in vitro*** pentru a evalua comportamentul compozitului în condiții biologice complexe și pentru a confirma eficiența în regenerarea osoasă, precum și evaluarea *in vivo* a performanței scaffold-urilor, explorarea mai aprofundată a interacțiunilor DOX–CA în micromediul tumoral și optimizarea încărcării și eliberării medicamentului; optimizarea avansată a conținutului individual al fiecărui compus activ și respectiv a raportului dintre aceștia.
- **Dezvoltarea de materiale Coll/HAp cu alte substanțe active cu rol sinergic.**
- **Analiza pe termen lung a biodegradabilității și bioactivității**, pentru a determina viteza de degradare și modul în care materialul interacționează cu țesutul osos în timp.
- **Explorarea adaptării biomaterialelor** pentru alte aplicații clinice, inclusiv tratamente personalizate și combinații cu agenți terapeutici suplimentari (antibiotice, factori de creștere).
- **Scalarea procesului de fabricație** pentru producția la scară industrială și respectarea reglementărilor necesare aprobării clinice.

LISTA DE PUBLICAȚII

1. **Vladu, A.F.**; Fica, D.; Ene, A.G.; Fica, A. Combination Therapy Using Polyphenols: An Efficient Way to Improve Antitumoral Activity and Reduce Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10244. <https://doi.org/10.3390/ijms231810244>, FI – 5.2/2022
2. **Vladu, A.F.**; Albu Kaya, M.G.; Trușcă, R.D.; Motelică, L.; Surdu, V.-A.; Oprea, O.C.; Constantinescu, R.R.; Cazan, B.; Fica, D.; Andronescu, E. The Role of Crosslinking Agents in the Development of Collagen–Hydroxyapatite Composite Materials for Bone Tissue Engineering. *Materials* **2025**, *18*, 998. <https://doi.org/10.3390/ma18050998>, FI – 3.2/2025
3. **Vladu, A.F.**; Motelică, L.; Oprea, O.C.; Trușcă, R.D.; Iordache, F.; Fica, D.; Fica, A. Chitosan/Hydroxyapatite composite grafts for bone tissue engineering. *U.P.B. Sci. Bull., Series B.* **2025**, Series B, Vol. 87, Iss. 3, FI – 0.3/2025
4. **Vladu, A.F.**; Albu Kaya, M.G.; Fica, A.; Fica, D.; Tutuianu, R.; Motelica, L.; Surdu, V.A.; Oprea, O.-C.; Trușcă, R.D.; Titorencu, I. Localized Combination Therapy Using Collagen–Hydroxyapatite Bone Grafts for Simultaneous Bone Cancer Inhibition and Tissue Regeneration. *Polymers* **2025**, *17*, 2239. <https://doi.org/10.3390/polym17162239>, FI – 4.9/2025

PARTICIPĂRI LA CONFERINȚE INTERNAȚIONALE

1. **Alina Florentina Vladu**, Anton Ficai, “Polyphenols: a natural alternative for cancer therapy”, International Scientific Conference “Applications of chemistry in nanosciences and biomaterials engineering”, online, iunie 2021, prezentare orală.
2. **Alina Florentina VLADU**, Anton FICAI, Alexandra ENE, Ecaterina ANDRONESCU, Ionela Andreea NEACSU, “Composite Drug Delivery Systems for Bone Cancer Treatment”, International Scientific Conference “Applications of chemistry in nanosciences and biomaterials engineering”, online, noiembrie 2021, poster.
3. **Alina Florentina Vladu**, Ludmila Motelica, Alexandra Ene, Ecaterina Andronescu, Ionela Neacsu, Anton Ficai, “Chitosan/Hydroxyapatite Based Composite Structures for Bone Cancer Treatment”, International Scientific Conference “Applications of chemistry in nanosciences and biomaterials engineering”, online, iunie 2022, poster
4. **Alina Florentina Vladu**, Ludmila Motelica, Roxana Trusca, Anton Ficai, “Composite Systems for Bone Tissue Regeneration”, International Scientific Conference “Applications of chemistry in nanosciences and biomaterials engineering”, online, noiembrie 2022, poster
5. **Alina Florentina Vladu**, Ludmila Motelica, Roxana Trusca, Florin Iordache, Anton Ficai, Preparation and Characterization of Composite Bone Substitutes, Virtual International Scientific Conference on “Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering” NanoBioMat 2023 – Summer Edition 28-30 iunie 2023, online, poster.
6. **Alina Florentina Vladu**, Ludmila Motelica, Ovidiu Cristian Oprea, Roxana Doina Trușcă, Florin Iordache, Denisa Ficai, Anton Ficai, Freeze-Dried Chitosan/Hydroxyapatite Based Composite Systems For Bone Tissue Regeneration, 7th International Conference On Emerging Technologies In Materials Engineering 30-31 October 2024, Bucharest, Romania, poster

PREMII

1. **Alina Florentina Vladu**, Anton Fikai, “Polyphenols: a natural alternative for cancer therapy”, International Scientific Conference “Applications of chemistry in nanosciences and biomaterials engineering”, online, iunie 2021, Best Paper Award.
2. **Alina Florentina Vladu**, Ludmila Motelica, Roxana Trusca, Florin Iordache, Anton Fikai, Preparation and Characterization of Composite Bone Substitutes, Virtual International Scientific Conference on “Applications of Chemistry in Nanosciences and Biomaterials Engineering” NanoBioMat 2023 – Summer Edition 28-30 iunie 2023, Best Poster Award

BLIOGRAFIE SELECTIVA

- [1] Stiller CA, Bielack SS, Jundt G, Steliarova-Foucher E. Bone tumours in European children and adolescents, 1978–1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *European Journal of Cancer*. 2006;42(13):2124-35
- [2] Trihia H, Valavanis C. Histopathology and Molecular Pathology of Bone and Extraskelatal Osteosarcomas. In: Agarwal MG, editor. *Osteosarcoma*. Rijeka: IntechOpen; 2012
- [3] Ritter J, Bielack SS. Osteosarcoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2010;21 Suppl 7:vii320-5
- [4] Wu Y, Cheng M, Jiang Y, Zhang X, Li J, Zhu Y, et al. Calcium-based biomaterials: Unveiling features and expanding applications in osteosarcoma treatment. *Bioactive materials*. 2024;32:385-99
- [5] Garcia-Ortega DY, Cabrera-Nieto SA, Caro-Sánchez HS, Cruz-Ramos M. An overview of resistance to chemotherapy in osteosarcoma and future perspectives. *Cancer drug resistance (Alhambra, Calif)*. 2022;5(3):762-93
- [6] Baskar R, Lee KA, Yeo R, Yeoh K-W. Cancer and Radiation Therapy: Current Advances and Future Directions. *International Journal of Medical Sciences*. 2012;9(3):193-9
- [7] Bădilă AE, Rădulescu DM, Niculescu A-G, Grumezescu AM, Rădulescu M, Rădulescu AR. Recent Advances in the Treatment of Bone Metastases and Primary Bone Tumors: An Up-to-Date Review. *Cancers [Internet]*. 2021; 13(16)
- [8] Jeong J, Kim JH, Shim JH, Hwang NS, Heo CY. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration. *Biomaterials research*. 2019;23:4.
- [9] Zhao Q, Wang M. Smart Multifunctional Tissue Engineering Scaffolds. In: Wang Q, Wang Q, editors. *Smart Materials for Tissue Engineering: Applications*: The Royal Society of Chemistry; 2017.
- [10] Zhang D, Wu X, Chen J, Lin K. The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration. *Bioactive materials*. 2018;3(1):129-38
- [11] Venkatesan J, Kim SK. Chitosan composites for bone tissue engineering--an overview. *Mar Drugs*. 2010;8(8):2252-66

- [12] Hatcher HM. 4 - Principles of systemic therapy. In: Ajithkumar TV, Hatcher HM, editors. Specialist Training in Oncology: Mosby; 2011. p. 30-44
- [13] Yang H, Villani RM, Wang H, Simpson MJ, Roberts MS, Tang M, et al. The role of cellular reactive oxygen species in cancer chemotherapy. Journal of Experimental & Clinical Cancer Research. 2018;37(1):266.
- [14] Mileo AM, Miccadei S. Polyphenols as Modulator of Oxidative Stress in Cancer Disease: New Therapeutic Strategies. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2016;2016(1):6475624