

## Raport stiintific etapa 4

### Denumirea proiectului:

**Substraturi hibride biodegradabile si antibacteriene cu morfologie controlata si bio-activare localizata -Antimicrobial and degradable biohybrid substrates with controlled surface architecture combining localized bio activation with antifouling properties**

### Obiective generale:

Existenta unei platforme care sa permita stimularea si ghidarea cresterii celulelor pentru regenerarea tesuturilor este esentiala atat in diverse studii bio-medicale, cat si in ingineria tesuturilor; si implica necesitatea obtinerii de structuri bi si tridimensionale, specific localizate, cu suprafete micro si nano texturate, din materiale hibride sau compozite.

Acest proiect are ca principal scop obtinerea prin metode laser (Evaporare Laser Pulsata Asistata de o Matrice -MAPLE si Transfer Indus Inainte cu Laserul-LIFT si iradierea directa a materialului) de suporturi polimerice hibride complexe micro si nano structurate, folosite ca platforme pentru cresterea orientata de celule. O directie complementara urmarita de acest proiect este evaluarea efectului texturarii si a dispunerii de "arhitecturi" de tip bi si tridimensional, specific localizate, cat si studiul modificarii proprietatilor chimice/functionalizarii a suprafetelor asupra adeziunii, cresterii, inhibarii si a interactiilor celulare *in vitro*.

### Obiectivele fazelor de executie (1-3):

- ❖ Adaptarea sistemelor MAPLE, LIFT si iradiere a materialului pentru obtinerea de platforme hibride biodegradabile de studiu celular *in vitro*.
- ❖ Obtinerea de filme subtiri polimerice biocompatibile, antimicrobiene si degradabile prin MAPLE si spin coating (WP2);
- ❖ Obtinerea de microstructuri polimerice cu topografii controlate (santuri/canale, cratere) prin iradierea cu laseri (WP3);
- ❖ Obtinerea de microstructuri polimerice specific localizate controlate prin LIFT (matrici de pixeli polimerici) (WP3);
- ❖ Transferul localizat de factori bioactivi prin LIFT (WP 4);
- ❖ Testarea filmelor subtiri si a microstructurilor obtinute *in vitro* (WP5)
- ❖ Diseminare si raportare faza proiect (WP6).

### **Rezumatul fazelor:**

In prima etapa de cercetare corespunzatoare anului 2011, au fost adaptate si testate sistemele de depunere a straturilor subtiri polimerice (Evaporare Laser Pulsata Asistata de o Matrice -MAPLE); sistemul de transfer de "structuri" polimerice-LIFT, precum si sistemul de iradiere a substraturilor/materialelor existente in cadrul grupului PPAM (Procesare Fotonica de Materiale Avansate). Scopul a fost acela de a indeplini conditiile de depunere de straturilor organice ca filme subtiri si de transfer localizat si controlat de structuri polimerice, precum si de modificare a proprietatilor fizice si chimice prin iradierea directa cu un fascicul laser.

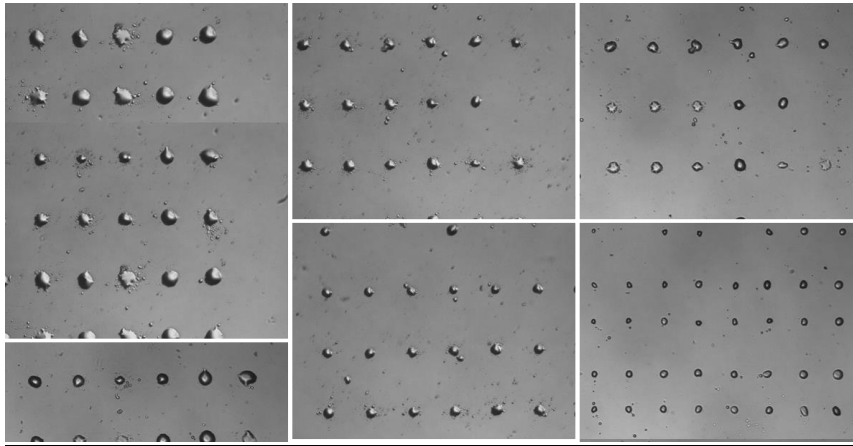
S-a efectuat achizitionarea unei hote chimice, unui spin coater, precum si a materialelor necesare (polimeri naturali si sintetici cu mase moleculare diferite, proteine, factori bioactivi, reactivi chimici si biologici) pentru realizarea de structuri polimerice hibride complexe si cele necesare testarii lor *in vitro*.

In cele patru etape au fost realizate activitatile corespunzatoare pachetelor de lucru WP 1-6. Primii pasi au constat in optimizarea parametrilor de obtinere a straturilor organice ca filme subtiri prin MAPLE si spin coating (WP2), precum si determinarea parametrilor preliminari pentru modificarea arhitecturii suprafetei si a proprietatilor fizico-chimice prin iradierea directa cu un fascicul laser si prin LIFT (WP3). Metoda LIFT a fost folosita pentru transferul de materiale in locuri de interes pe suprafata probelor, fiind efectuate experimente atat in faza lichida cat si solida. Totodata, in paralel, au fost realizate teste *in vitro*, prin care a fost analizata morfologia celulelor de tip fibroblast pe filmele si structurile obtinute (WP5). Activitati de diseminare (WP6) corespunzatoare celei de a doua faze, in 2012, au constat in: o prezentare invitata, o prezentare orala, 7 postere si doua articole publicate (submise in 2012, sparute on line in 2013) in revista Applied Surface Science (Factor impact IF 2.112). Rezultatele obtinute in decursul anului 2013 au fost prezentate la 3 conferinte, 2 internationale (EMRS 2013, Strasbourg, Franta; si International BioIron Society Program, University College London, 2013) si una nationala (Modern Laser Applications - INDLAS 2013, Bran, Romania). 4 articole au fost publicate in 2013 in reviste cotate ISI (Romanian Reports in Physics (IF 0.5), Applied Surface Science(2.54), Biomedical Microdevices (IF 2.718)).

### **WP4: Imbunatatirea functionalitatii substraturilor si structurilor (15 luni)**

#### ***A 4.1: Transfer prin LIFT de factori bioactivi (laminina) pe substraturi 2D***

Experimente de LIFT in faza lichida au fost realizate cu o solutie ce a constat intr-un amestec de apa, laminina ( 10 µg/ml), 20 % glicerol, plus un surfactantat, sodium dodecil sulfat (SDS) dizolvat intr-o concentratie de 2 mg/ml. Prezenta glicerolului in aceste solutii reduce rata de evaporare a solutiilor.

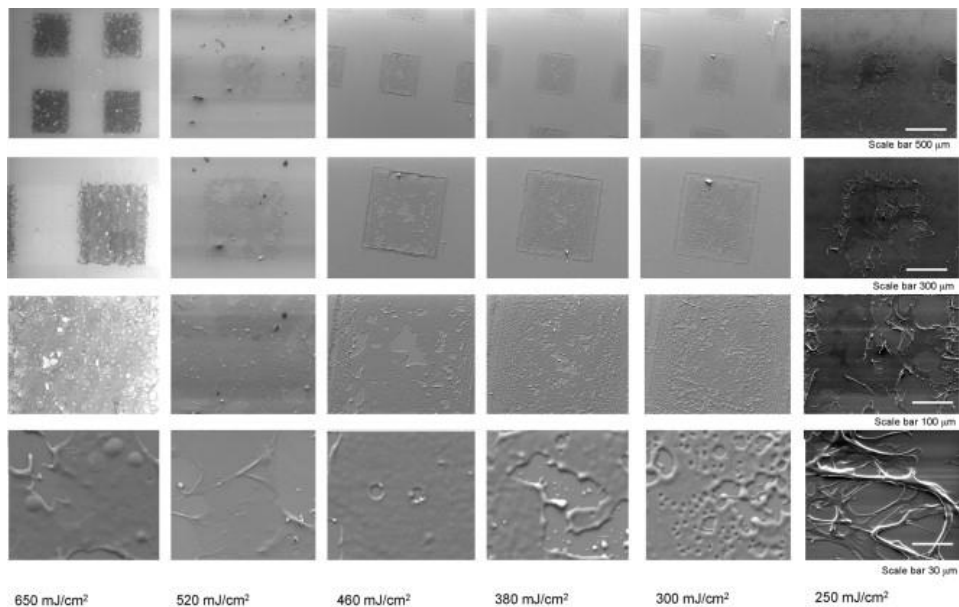


*Fig.10. Laminina transferata pe sticla*

Se poate observa din figura 10 ca structuri sub forma de picaturi, cu diametre variabile de la 30 microni pana la 80 microni pot fi obtinute prin varierea fluentei de la  $100 \text{ mJ/cm}^2$  pana la  $250 \text{ mJ/cm}^2$ .

#### ***A 4.2: Arhitecturi complexe obtinute prin LIFT***

In acest proiect scopul principal a fost de a proiecta diferite topografii, prin utilizarea de material moale pe post de strat receptor, pentru a se obtine o suprafata mai dura si mai poroasa a pixelilor de polimer transferati in comparatie cu cele de pe un receptor rigid.



*Figura 10 Imagini SEM ale retelelor de pixeli polimerici pe substraturi de sticlă la valori ale fluentei fasciului laser variind între  $250\text{-}650\text{mJ/cm}^2$  [V. Dinca, L. Rusen et al., Applied Surface Science, 278, (2013): 190-197]*

In cazul transferului pe substraturi de sticlă rigide, se poate observa că pentru fluente laser destul de mari ( $650\text{-}460\text{ mJ/cm}^2$ ) se poate realiza un transfer regulat, fără resturi sau stropi in jurul pixelilor. In cazul transferului pe substraturi moi de Thermanox, se poate observa că pentru fluente laser ridicate, structurile prezintă o rugozitate pronunțată, dar și o structurare poroasă pe suprafața de pixeli (fig. 11).

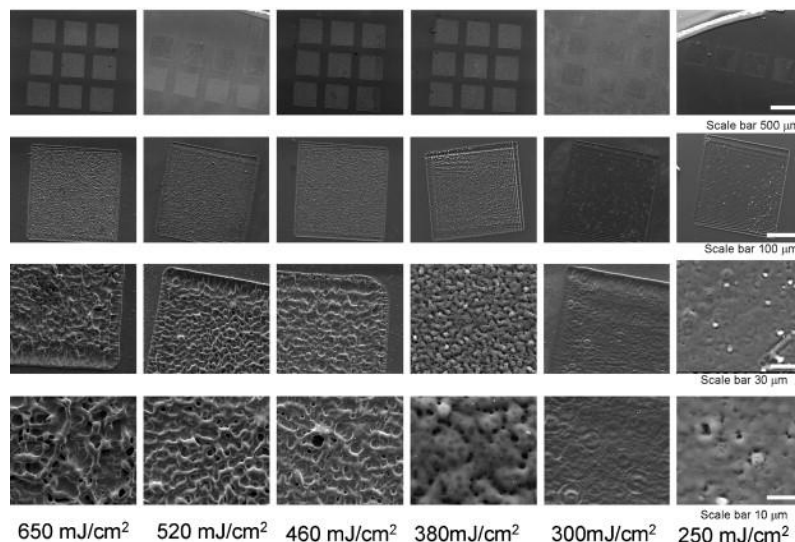


Figura 11. Imagini SEM ale rețelelor de pixeli polimerici pe substraturi de Thermanox, la valori ale fluentele fasciculului laser variind între  $250\text{-}650\text{ mJ/cm}^2$  [V. Dinca, L. Rusen et al., *Applied Surface Science*, 278, (2013): 190-197]

După cum se poate observa în figura 12, se obțin și micro-găuri sferice sub formă de pori distribuite aleator; structuri cu un diametru variind de la câteva sute de nm la câteva μm în interiorul pixelilor transferați pe Thermanox pentru fluente laser mai mari de  $400\text{ mJ/cm}^2$ .

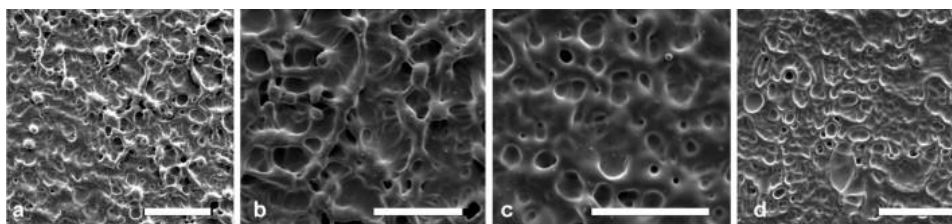


Figura 12 Imagini SEM ale morfologiei pixelilor polimerici pe Thermanox la fluente: a)  $590\text{ mJ/cm}^2$ ; b)  $500\text{ mJ/cm}^2$ ; c)  $450\text{ mJ/cm}^2$ ; d)  $400\text{ mJ/cm}^2$  [V. Dinca, L. Rusen et al., *Applied Surface Science*, 278, (2013): 190-197]

**WP5: Studii *in vitro* ale adeziunii și proliferării celulare pe suprafețele obținute. (32 luni).**

A 5.1: Cuantificarea adeziunii celulare pe suprafețele microstructurate

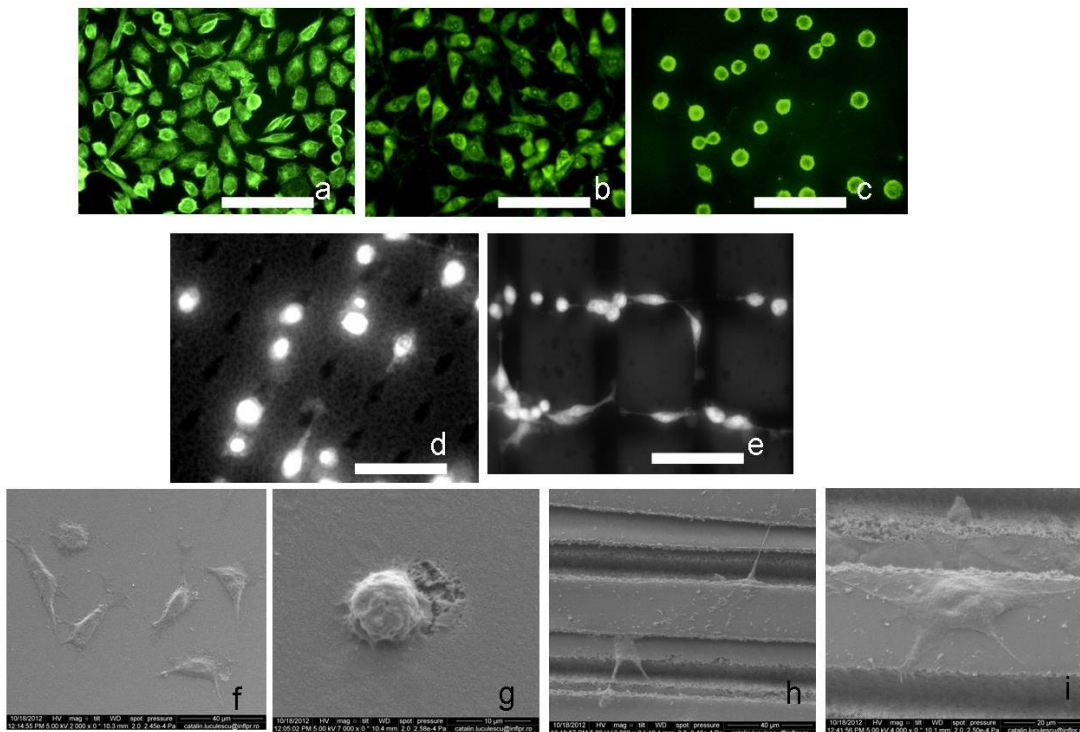
A 5.2: Teste viabilitate

A 5.4: Degradabilitate și testele de rezistență antimicrobiană

A 5.5: Corelarea topografia de suprafață și chimie cu comportamentul celulelor

Datorita aplicabilitatii structurilor obtinute pentru studii celulare, activitati caracteristice pachetului de lucru **WP5** au fost incepute si desfasurate in paralel cu activitatile prezentate anterior. Pentru realizarea testelor de biocompatibilitate in vitro s-a utilizat o linie celulara de cultura, L929 (banca de celule ATCC, USA), cu morfologie de tip fibroblast, avand ca provenienta tesut conjunctiv subcutanat (adipos si aerolar). Celulele folosite reprezinta un model pentru testele de biocompatibilitate, recomandate in multe standarde de lucru, datorita eficientei de aderare si timpului de dublare de aproximativ 24 h. Pentru a monitoriza atașamentul celulelor L929, comportamentul celulelor pe substraturile depuse prin metoda MAPLE (fluente de la  $400 \text{ mJcm}^{-2}$  la  $800 \text{ mJcm}^{-2}$ ) sunt comparate cele de pe suprafața de control (sticlă) și cele de pe suprafețele depuse prin drop-cast. Ratele de proliferare observate prin testul MTS pentru celulele crescute pe collagen sunt mai mari decât în cazul culturilor pe materiale standard. Același lucru s-a observat și în cazul lamininei, cu singura diferență că straturile de laminină au dus la o creștere a ratei de proliferare de până la 130%. Morfologia celulelor aderate pe filmele de chitosan, collagen, chitosan-collagen a fost evaluata prin microscopie de fluorescenta la 24 h, 48 h si 72h.

Se poate observa o diferenta intre morfologia celulelor dezvoltate pe suprafețele de collagen, collagen-chitosan si chitosan, suprafața cu cea mai mare afinitate pentru celule fiind cea de collagen.(Figura 13 a, b, c) Pe suprafața filmelor de chitosan, celulele adera in forma lor diferita de cea a suprafețelor de collagen sau de collagen –chitosan. Suprafețele filmelor de PEG s-au dovedit a fi inerte pentru o perioada mai mare de 24 de ore, pana la 48 de ore, in functie de grosimea filmelor si de modul de obtinere.



**Figura 13.** Imagini de microscopie de fluorescență a celulelor L929 pe suprafețele filmelor de collagen (a), collagen –chitosan(b) și chitosan(c) , pe suprafețe chitosan-collagen structurate de tip crater (d) și canale (e) după 48 de ore. Imagini SEM ale celulelor L929 pe suprafața multistrat PEG / collagen / chitosan (f) și pe suprafața structurată de Chitosan-collagen/PEG de tip crater (g) și canale (h și i)

Pe suprafețele structurate, comportamentul fibroblastelor a fost dictat în principal de morfologia și rugozitatea suprafeței structurate. Se poate observa în Figura 13 d și g că celulele adoptă o morfologie diferită, rotunjită, în cratere cu diametrul egal sau mai mic decât celula, în timp ce pe suprafețe plane, cu rugozități sub 20 nm se dezvoltă normal (Figura 13f)), ca și pe suprafețele de control (sticlă). Pe suprafețele cu canale, în funcție de distanța între canale și de diametrul canalelor, o aliniere de-a lungul acestora poate fi observată (Figura 13e).

Pe suprafețele structurate prin LIFT, studiile au fost efectuate de celule de tip fibroblaste L929 și oligodendrocite (OLN). Au fost observate morfologia celulelor cât și dezvoltarea lor; atât pe substratul de control, cât și pe substraturile realizate prin LIFT. Studiul a fost efectuat pe o durată de până la 48 ore folosindu-se un microscop cu contrast de fază inversată.

În figura 14 a și b se poate vedea un exemplu de celule fibroblaste de pe suprafața de control (Fig 14a) și pe zona realizată prin tehnica LIFT (fig 14 b) la 8 ore după însămânțarea acestor celule în mediul de cultură. Se poate observa cu claritate că celulele proliferază pe ambele tipuri de substrat, numărul celulelor fiind într-o vizibilă creștere după 48 de ore (14 c pentru control și 14 d pixeli). Pentru corelarea doar a caracteristicilor

morfoloģice asupra comportamentului de celule și nu al celor chimice de suprafață, atât substraturile realizate prin LIFT și de cele de control (Thermanox) au fost acoperite cu un strat subțire de aur ce nu a cauzat modificări morfoloģice suplimentare.

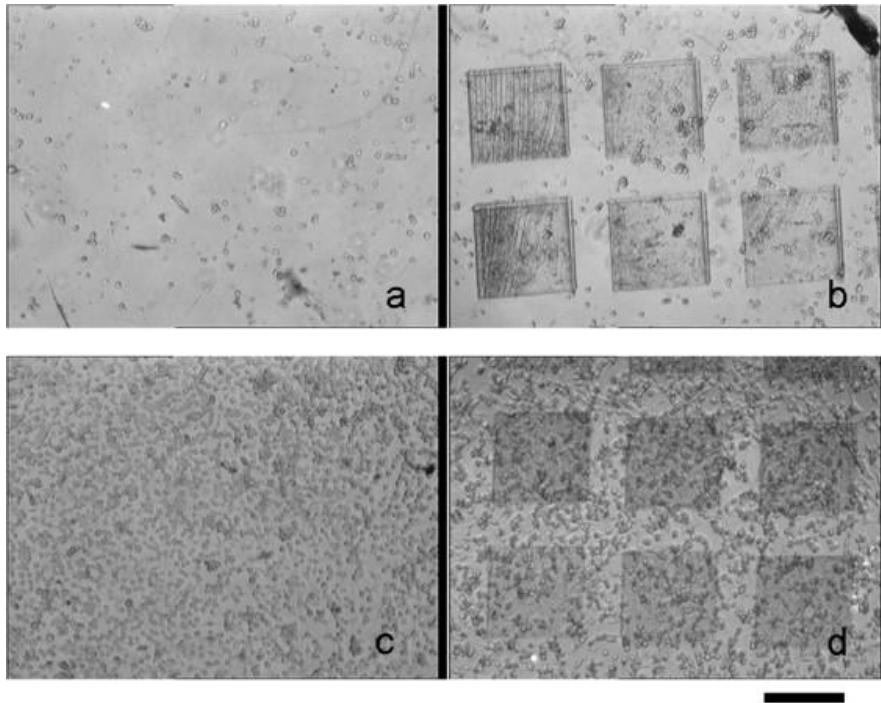


Figura 14 Imagini de microscopie optică ale celulelor de fibroblaste pe suprafața de control (a-după 8 ore,c-după 48 ore) și pe pixelii PEI transferați pe Termanox (b-după 8 ore,d-după 48 ore ) [V. Dinca,L. Rusen et al., *Applied Surface Science*, 278, (2013): 190-197]

Același tip de comportament este observat și în cazul celulelor OLN după 48 h (figura 16 a - control și b - pixeli PEI transferați pe Termanox ) i.e. proliferarea celulelor.

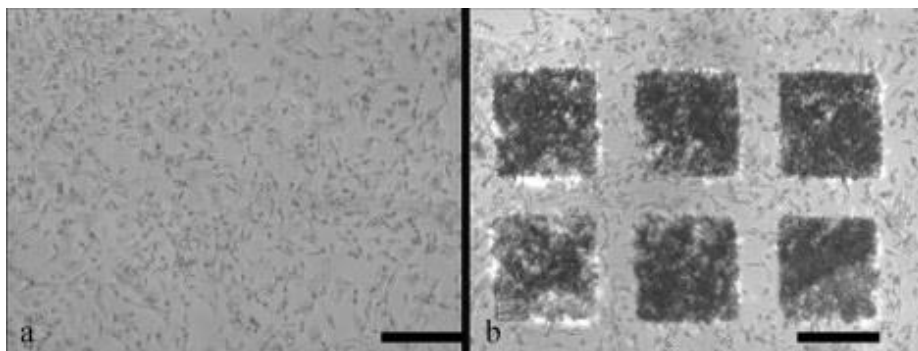
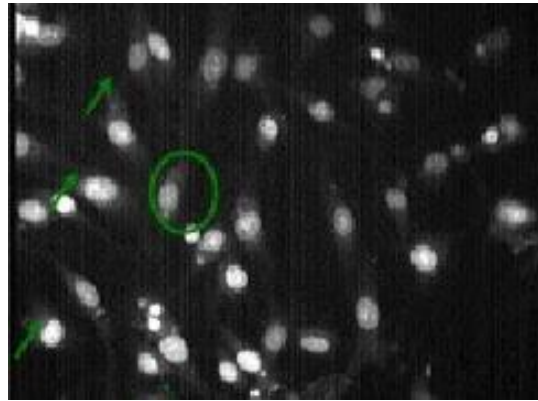


Figura 16 Imagini de microscopie optică ale celulelor OLN [V. Dinca,L. Rusen et al., *Applied Surface Science*, 278, (2013): 190-197]

Figura 17 prezintă imaginea de la microscopia de fluorescență a celulelor de OLN. Se poate observa din imagine că celulele încep să se interconecteze și totodată să-și păstreze caracteristicile lor neuronale, cum ar fi alungirea (marcată cu săgeți verzi) cu o soma (corp al celulei, marcată cu cerc verde).



*Figura 17 Imagini de microscopie de fluorescență a celulelor OLN după 48 ore [V. Dinca, L. Rusen et al., Applied Surface Science, 278, (2013): 190-197]*

Cu toate acestea, atunci când probele sunt spălate cu grijă, se observă diferențe în aderența celulelor în funcție de tipul celulei dar și de morfologia suprafeței. De exemplu, o aderență preferențială a OLN se observă pe pixelii cu suprafețe microstructurate (fig. 18a și c), în comparație cu suprafețe netede (fig. 18b și d). Suprafața microstructurată a fost obținută prin transferul pixelilor la o fluentă de  $250 \text{ mJ/cm}^2$  (a) iar prin transferul la o fluentă de  $380 \text{ mJ/cm}^2$  a fost obținută o suprafață netedă (b). Imaginile SEM ale pixelilor PEI transferați pe Termanox înainte de acoperirile cu celule sunt în figura 18 c și d



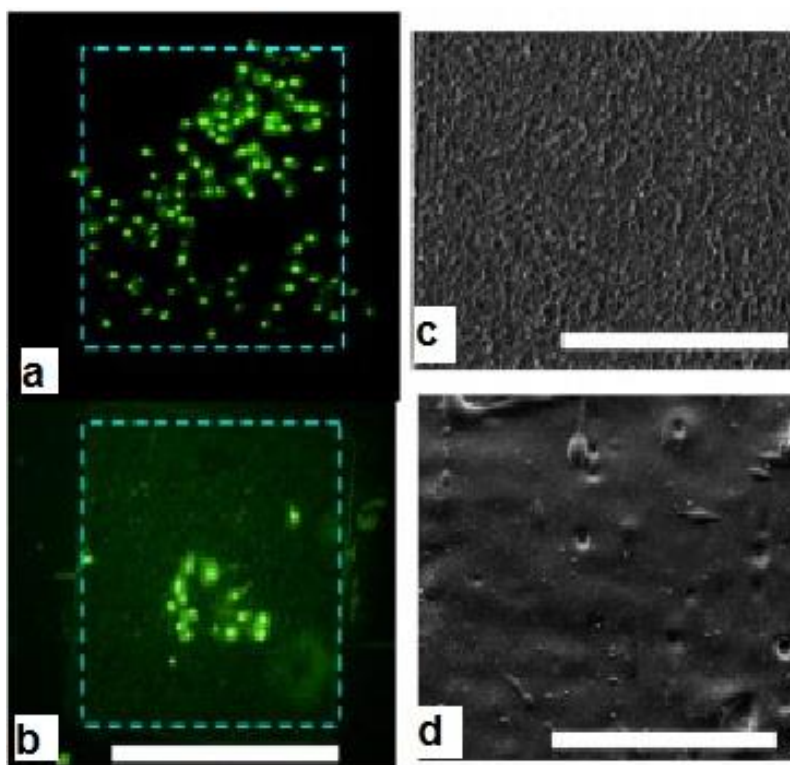


Figura 18 Dezvoltarea celulelor OLN in functie de suprafață microstructurata a pixelilor polimerici transferati [V. Dinca, L. Rusen et al., *Applied Surface Science*, 278, (2013): 190-197]

Pentru testele antimicrobiene am folosit culturi bacteriene de *E. coli*, frecvent utilizate în domeniul microbiologiei și a biotehnologiei pe filme de PEO, PEO și chitosan și suprafețe de referință (sticlă). Probele au fost sterilizate timp de 12 ore cu o lampă cu ultraviolete (model Tungsham 15 W F Germicid B2Y). Culturile bacteriene de *E. coli* (oferite de Banca de Culturi Celulare Microgen București) au fost cultivate timp de 24 de ore la temperatura de 37 °C, în baloane sterilizate conținând mediu Luria Bertani. După 24 de ore au fost analizate suprafețele prin microscopie de baleiaj.

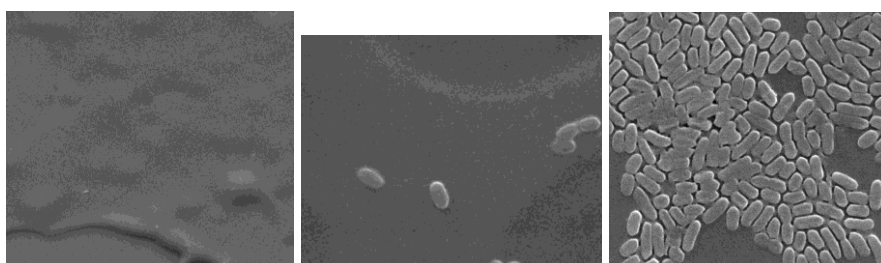


Figura 19. Dezvoltarea *E. coli* în functie de compoziția suprafeței (stanga PEO 100%, mijloc PEO-Chitosan 50-50% și dreapta-chitosan 100%)

Prezența bacteriilor pe suprafața filmelor de PEO și PEO-chitosan este redusă. Deși chitosanul preparat ca soluție a avut un puternic efect antibacterian, preparat ca film subțire a prezentat o activitate redusă în primele 4 h, coloniile bacteriene dezvoltându-se similar cu cele de pe suprafețele de referință după 24 ore.

## Concluzii

Prezentele etape de cercetare și-au atins în întregime obiectivele; astfel au fost obținute următoarele rezultate:

1. Am **obținut structuri polimerice prin LIFT** în mod controlat, atât în fază lichidă cât și solidă. Am demonstrat că metoda LIFT poate fi folosită pentru a transfera pixeli polimerici PEI cu diferite morfologii pe substraturi moi flexibile pentru diferite studii de adeziune celulară. Rezultatele promițătoare pentru o fixare selectivă a celulelor sunt obținute prin utilizarea de diferite rugozități și morfologii ale pixelilor transferați prin LIFT. Principalul parametru care trebuie să fie controlat pentru a influența adeziunea celulară este topografia suprafeței polimerului transferat. Prin varierea fluenței laser s-au observat schimbări semnificative în topografia suprafeței pixelilor transferați. În funcție de aplicația finală urmărită, tehnica LIFT poate fi combinată cu caracteristicile donorului și acceptorului pentru a obține texturarea suprafeței și funcționalizarea specifică.
2. Am studiat limitele dar și versatilitatea metodei de iradiere cu fascicul laser în femtosecunde a suprafețelor de polimer CS pentru obținerea de structuri 2D și 3D de tip „bubble”, „sponge” și „ditches”. În cazul structurilor de „bubble” și „ditches”, înălțimile structurilor din zonele iradiate sunt între câteva sute de nanometri până la câțiva micrometri și concomitent cu creșterea fluențelor laser (începând cu fluența de  $1500 \text{ mJ/cm}^2$ ), au fost observate apariția unor structuri de tip „sponge”. Celulele oligodendrocite și fibroblaste cultivate pe suprafața iradiată au arătat că creșterea timpurie a celulelor a fost condiționată de microtopografia specifică a suprafeței de CS, prezentând astfel o posibilă utilizare pentru platforme mobile de dezvoltare celulară. Rezultatele arată că morfologia structurilor bazate pe chitosan pot fi reglate în mod corespunzător pentru diferite aplicații prin schimbarea parametrilor iradierii cu fascicul laser i.e. fluența laser și numărul de pulsuri laser.
3. Au fost realizate teste biologice *in vitro*, prin care a fost observată evoluția morfologiei celulelor de tip fibroblast pe filmele și structurile obținute. Observațiile noastre în urma experimentelor *in vitro* arată că filmele obținute prin MAPLE și spin

coating au o stabilitate buna in mediu apos, in timp ce, pentru cele de referinta, obtinute prin evaporarea solventului, o detasare de pe suprafata pe care au fost depuse se produce dupa un timp de testare de 2 zile.

4. O parte din rezultatele obtinute in perioada 2011-2014 au fost incluse in teza de doctorat a drd-ului Laurentiu Rusen, sustinuta public in 12 septembrie 2014 si care a obtinut calificativul Excelent ( in colaborare cu catedra de Optica, Facultatea de Fizica, Universitatea Bucuresti).

Responsabil proiect

Dr. Valentina Dinca

