

UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE
"VICTOR BABEȘ" TIMIȘOARA
FACULTATEA DE MEDICINĂ
DEPARTAMENTUL DE BIOCHIMIE ȘI FARMACOLOGIE

SORIN-CRISTIAN DOCA



TEZĂ DE DOCTORAT

**NOI COMPUȘI BIOACTIVI ÎN PROCESUL
DE OSTEOGENEZĂ**

REZUMAT

Conducător Științific
PROF. UNIV. DR. ANDREI ANGHEL

**Timișoara
2018**

CUPRINS

Lista lucrărilor publicate.....	V
Lista abrevierilor.....	VI
Indexul Figurilor.....	VIII
Indexul Tabelelor.....	XI
Mulțumiri.....	XII
INTRODUCERE.....	XIII

PARTEA GENERALĂ

1. REGENERAREA OSOASĂ.....	1
1.1. Compoziția substanței osoase	1
1.2. Metabolismul fosfo-calcic	2
1.3. Fiziologia osului	4
1.3.1. Sistemul celular al osului	4
1.3.2. Formarea și resorbția osului	5
1.3.3. Particularitățile dezvoltării osoase ale aparatului dento- maxilar	6
1.4. Materiale utilizate pentru regenerarea osoasă	8
2. COMPUȘI BIOLOGIC ACTIVI UTILIZAȚI ÎN REGENERAREA OSOASĂ	10
2.1. Fosfații de calciu. Hidroxiapatita	11
2.1.1. Structura și compoziția	11
2.1.2. Biochimia integrării țesutului osos	15
2.1.3. Aspecte clinice.....	20
2.1.4. Aplicațiile hidroxiapatitei sintetice în chirurgia orală.....	21
2.2. Bisfosfonații.....	21
2.2.1. Structura și compoziția	21
2.2.2. Biochimia bisfosfonaților	24
2.2.3. Aspecte clinice.....	26
2.2.4. Extracțiile dentare și bisfosfonații	30
2.2.5. Tendințe și provocări	30

PARTEA SPECIALĂ

3. SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI.....	31
4. METODOLOGIE ȘI MATERIALE	35
4.1. Metodologie	35

4.1.1. Sinteza hidroxiapatitei și a compozitului	35
4.1.2. Analiza termică	36
4.1.3. Analiza cinetică.....	40
4.1.4. Spectrometria FTIR- UATR	44
4.1.5. Difrakția de raze X, XRD.....	46
4.1.6. Microscopia electronică de baleiaj, SEM	48
4.2. Materiale	50
5. REZULTATE ȘI DISCUȚII.....	51
5.1. Sinteza și caracterizarea hidroxiapatitelor	51
5.2. Metodă rapidă pentru caracterizarea mezostructurii hidroxiapatitelor	74
5.3. Studiul stabilității termice a alendronatului de sodiu.....	81
5.4. Studiul interacțiilor induse termic între alendronatul de sodiu și diferiți excipienți.....	88
5.5. Eliminarea efectelor secundare la nivel digestiv prin fixarea alendronatului	93
5.6. Studiul stabilității alendronatului de sodiu și al interacțiilor induse termic în amestecurile binare cu diferiți excipienți.....	98
CONCLUZII FINALE	105
CONTRIBUȚII PROPRII.....	106
BIBLIOGRAFIE	108
ANEXE	I

CUVINTE CHEIE

Osteogeneza, implante dentare, hidroxiapatita biomimetică, bisfosfonati, compozit biomimetic și bioactiv

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE TEZEI

SCOPUL tezei este studierea condițiilor de obținere a unui material compozit adecvat protezării și regenerării osoase, cu aplicație imediată în ortopedie și stomatologie. Materialul compozit trebuie să satisfacă următoarele condiții :

- să se bazeze pe hidroxiapatită și bisfosfonați;
- hidroxiapatita (HA) sintetizată să aibă o structură mai afânată, apropiată de cea din oasele umane;
- să conțină pe suprafața HA, în formă absorbită sau legată, o cantitate de BP care să stimuleze la nivel local activitatea osteoblastelor și să o inhibe pe cea a osteoclastelor.

În vederea obținerii mezostructurii dorite s-a optat pentru sinteza HA în medii fluide biomimetice cu țesut colagenic. Prin efectul template, matricea mediului de reacție va determina formarea cristalitelor de HA cu orientare anizotropă, simulând orientarea naturală pe matricea de colagen.

Pentru componenta bisfosfonică s-a ales alendronatul de sodiu (ALE). Prin depunerea pe HA se estimează o acțiune biologică locală asupra echilibrului osteogeneză/osteoresorbție, fără o răspândire semnificativă a ALE în întreg organismul, situație generatoare de efecte secundare neplăcute (v. cap 2).

ALE a fost studiat și sub aspectul stabilității și compatibilității cu excipienți uzuali în formulările solide. Pentru comparație s-au studiat aceleași aspecte în cazul risedronatului de sodiu (Rise), pentru a observa efectul heterociclului.

OBIECTIVELE TEZEI sunt:

- Obținerea și caracterizarea unor hidroxiapatite cu biomimetism înalt față de matricea colagenică;
- Căutarea unei metode rapide de caracterizare/identificare a hidroxiapatitelor biogenetice;
- Studierea stabilității alendronatului de sodiu și a interacțiilor acestuia cu excipienții folosiți la formulările solide;
- Obținerea și caracterizarea unor compozite de hidroxiapatită înalt biomimetică cu alendronat fixat pe suprafață.
- Compararea comportării termice a alendronatului cu cea a risedronatului.

Etapele realizării acestor obiective sunt următoarele:

1. Sinteza de HA în fluide biomimetice;
2. Caracterizarea HA;
3. Studiul stabilității termice a ALE;
4. Studiul interacțiilor ALE cu excipienți folosiți în formulările solide;
5. Obținerea compozitelor HA/ALE și caracterizarea acestora.
6. Studiul comportării termice a Rise în comparație cu ALE.

Aceste obiective pot fi atinse în diferite etape, prezentate în succesiunea lor logică în Tabelul 3.1 împreună cu activitățile asociate fiecărei etape.

Tabelul 3.1. Defalcarea pe etape și activități a obiectivelor

Obiective (Denumirea obiectivului)	Activități asociate
1.Sinteza de HA în fluide biomimetice	1.1.prepararea fluidelor biomimetice
	1.2.precipitarea precursorilor de HA în câmp de ultrasunete
	1.3.studiul tratamentului termic al precursorilor
2.Caracterizarea HA	2.1.analiza cristalografică prin RX
	2.2.analiza în infrarosu
	2.3.analiza texturii prin SEM, EDAX
	2.4.caracterizarea mezostructurii prin adsorbție
	2.5.publicarea rezultatelor
3.Studiul stabilității termice a ALE și a Rise	3.1.analiza termică în regim neizoterm
	3.2.analiza cinetică a termooxidării
	3.3.publicarea datelor
4. Studiul interacțiilor ALE și Rise cu excipienți folosiți în formulările solide	4.1.obținerea datelor termoanalitice pentru excipienți
	4.2.analiza termică a amestecurilor binare BP/excip.
	4.3.analiza termică a FOSAMAX
	4.4.publicarea concluziilor
5. Obținerea compozitelor HA/ALE și caracterizarea acestora	5.1.depunerea ALE din soluții apoase în câmp de microunde
	5.2.verificarea depunerii
	5.3.depunerea documentației pentru obținerea proprietății intelectuale

Arborele de decizie corespunzător este prezentat în Fig. 3.1.

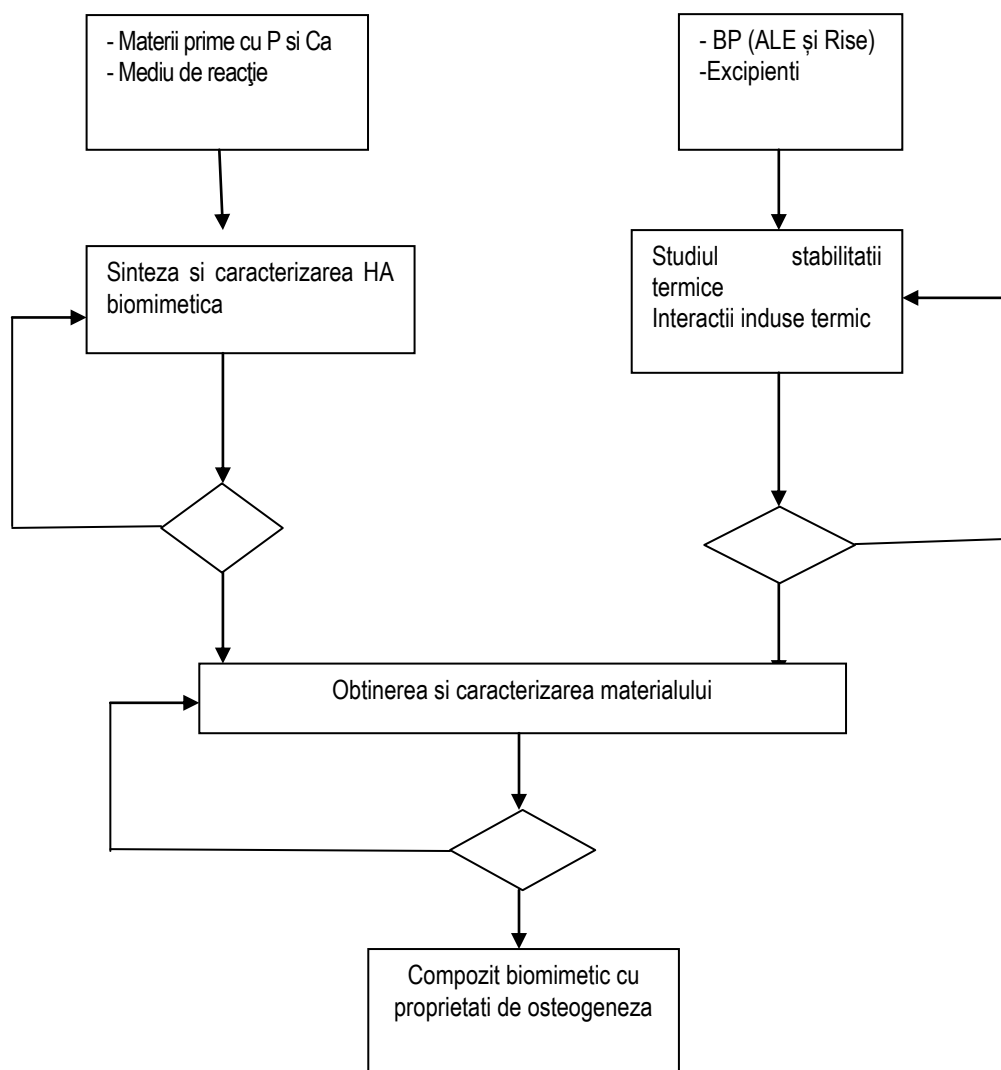


Figura 3.1. Arborele de decizie folosit în cadrul tezei.

Noutatea în teză este însăși ideea de a depune/fixa BP pe HA sintetizată într-o matrice biomimetică.

Complexitatea obiectivelor rezultă din următoarele:

- folosirea unor tehnologii neconvenționale pentru sinteza HA (câmp de ultrasunete), respectiv depunerea BP (câmp de microunde), tehnologii care necesită aparatură dedicată și expertiza specifică;
- caracterizarea HA, ALE, Rise și a materialelor obținute prin tehnici instrumentale la rândul lor complexe (RX, EDAX, FTIR);
- utilizarea extinsă a analizei termice în regim neizoterm, a detecției gazelor degajate și a analizei cinetice, metode a căror aplicare în domeniul substanțelor cu acțiune biologică este intens promovată de școala timișoreană (Universitatea de Vest și UMF). Tehnica și baza teoretică sunt la rândul lor complexe și necesită o expertiză aparte.

Scopul tezei se redefinește prin cele trei obiective prezentate în ordinea logică de abordare: întâi sinteza și caracterizarea probelor de HA; separat și nu neapărat concomitent, studierea stabilității ALE și Rise ca substanțe pure și ca amestecuri cu diferiți excipienți; în final, obținerea și caracterizarea probelor de compozit.

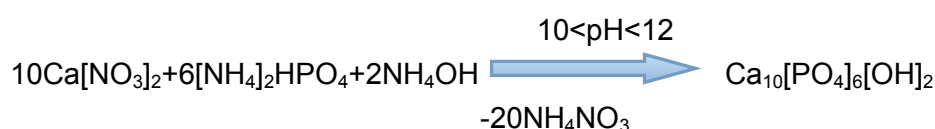
Stabilirea ca obiectiv aparte a studiului stabilității ALE, respectiv Rise, și a excipienților, a fost necesar pentru a obține datele necesare formulării compozitelor, date referitoare la farmacologia compusului, dar și pentru a acoperi un gol în literatura de specialitate.

REZULTATE ȘI DISCUȚII

5.1.

În cadrul lucrărilor prezentate în teză s-a încercat sinteza hidroxiapatitei într-o matrice de polimer, folosind efectul template. Ideea a fost ca, promovând din faza de cristalizare conformații care să favorizeze recunoașterea și/sau fixarea proteinelor din fluidul biologic, să se mărească gradul de biomimetism al compusului anorganic.

Reacția de sinteză este redată de ecuația 4.1

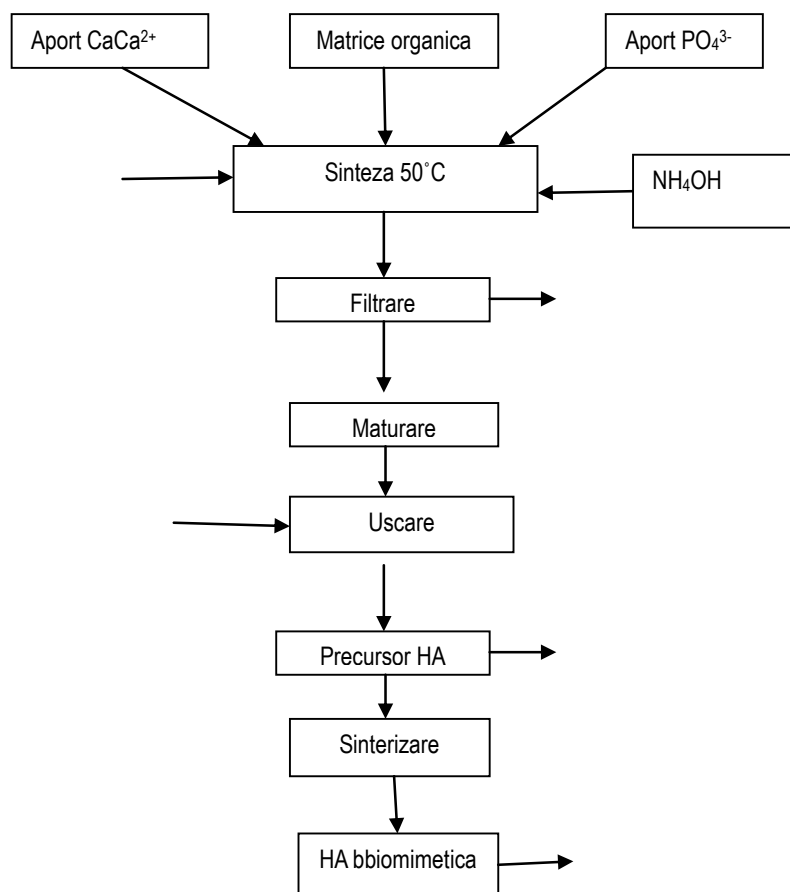


Rapoartele de sinteză sunt prezentate în Tab. 5.1., iar desfășurarea sintezei este redată în Fig. 4.1.

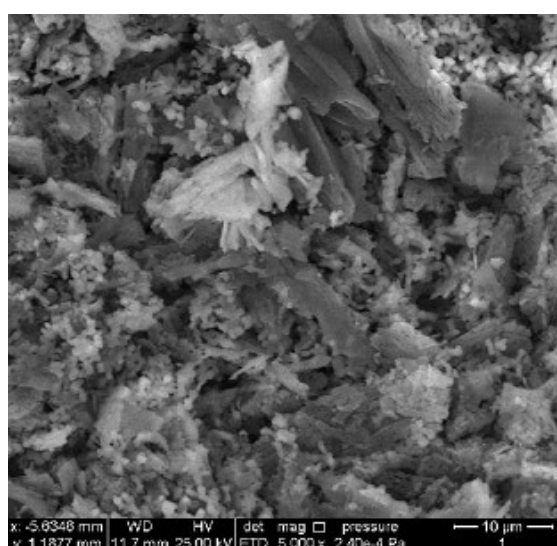
Tabelul 5.1 Rapoartele de sinteză ale probelor de HA

Simbolul	Tipul de HA	Rapoartele de sinteză		
		Atomic Ca/P	gelatină/fosfat g/mol	pectină/gelatină g/g
HAsT	standard	1, 67	0	0
HAb1	biomimetic	1, 67	16, 66	0
HAb2	biomimetic	1, 67	16, 66	1:1
HAb3	biomimetic	1, 67	16, 66	1:2

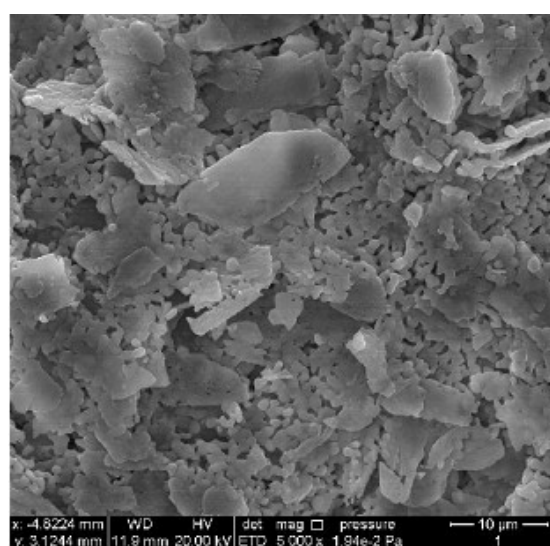
Figura 4.1 Schema bloc de sinteză a HA biomimetice



S-a constatat că adaosul de gelatină (polipeptid) la sinteza hidroxiapatitei conferă acesteia un biomimetism înalt, prin aceea că determină formarea de cristale aciculare a căror orientare este influențată de conformația biopolimerului (v. Fig. 5.7).



a)



b)

Figura 5.7. Imaginile SEM după sinterizare pentru: a) HAb2; b) HAb3.

Adaosul de pectină (polizaharid) potențează formarea de cristale nanodimensionale. Dar un adaos mare de pectină determină o viteză ridicată de termooxidare a matricii organice (la faza de sinterizare), ceea ce are drept consecință colapsul conformației componente anorganice. În consecință, pentru obținerea compozitului se reține ca substrat produsul HAb3.

5.2.

S-a elaborat o metodă rapidă pentru identificarea și compararea materialelor de tip hidroxiapatită. Metoda se bazează pe interpretarea curbelor Heat Flow ale unui amestec de hidroxiapatită și reactiv (Precise Path/Giese Diagnostic Roma). După cum se poate observa în Fig. 5.19,

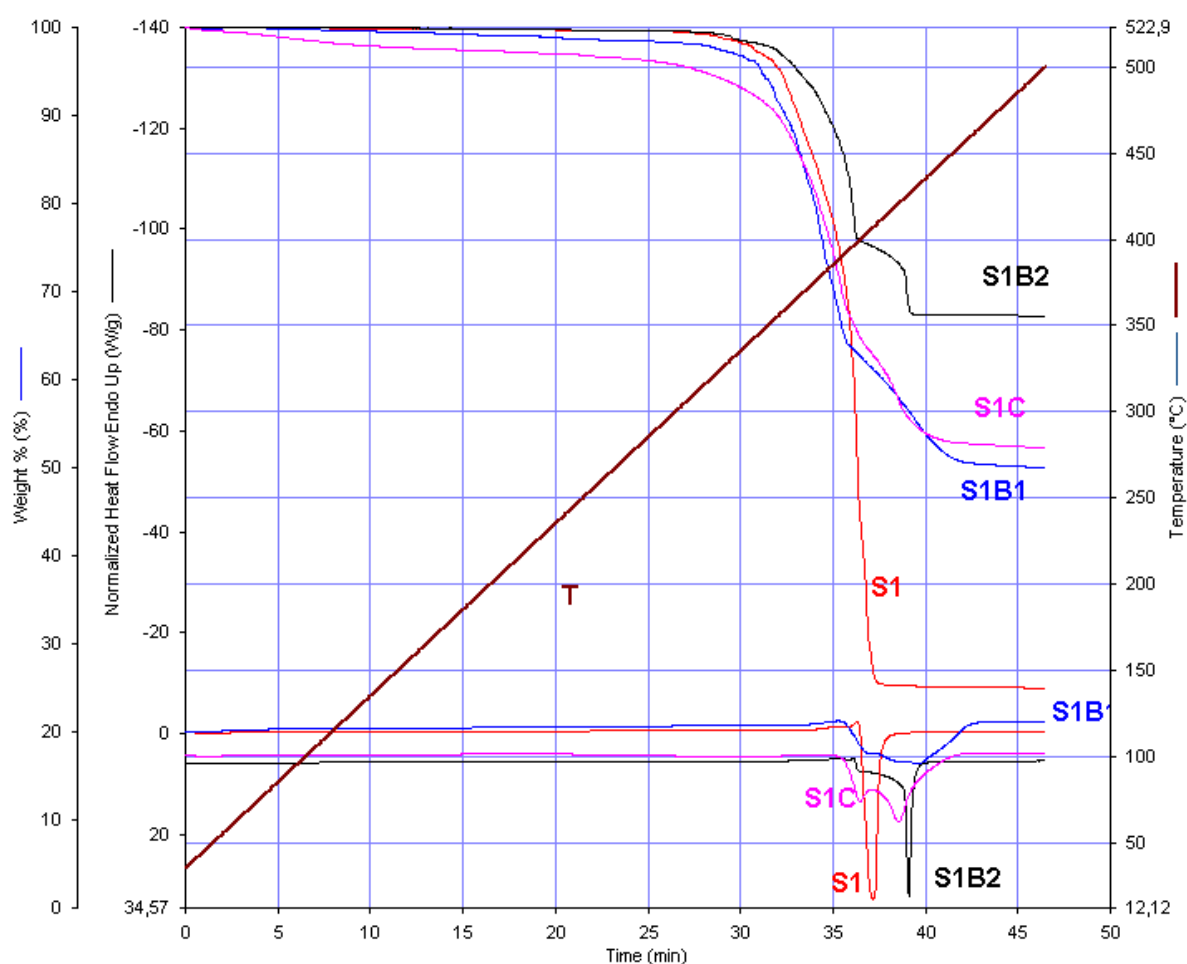
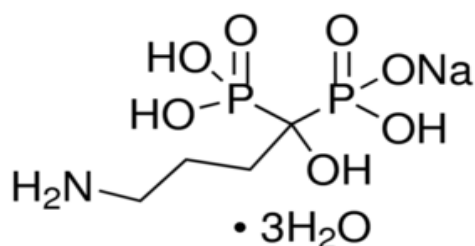


Figura 5.19. Curbele Heat Flow și TG pentru probele S1B1, S1B2 și S1C.

semnalele HF constituie amprente probelor, fiind astfel utile pentru identificarea hidroxiapatitelor. Prezența semnalelor HF în același interval de temperatură confirmă că hidroxiapatita biomimetică sintetizată, B2, are o mezostructură similară cu două hidroxiapatite biogene, B1 și C.

5.3.

Alendronatul de sodiu trihidrat, ALE (v. Schema 5.1), a fost studiat



Schema 5.1. Alendronatul de sodiu trihidrat

sub aspectul stabilității, fiind primul candidat pentru realizarea compozitului, datorită celor două proprietăți esențiale:

- similitudinea structurală între grupările fosfonice și ionii de fosfat din hidroxiapatită;
- activitatea biologică a radicalului organic de inhibare a formării osteocitelor.

La data apariției articolului (2016) a fost prima lucrare cu acest subiect. Mecanismul de degradare propus (v. Fig. 5.22) a contrazis

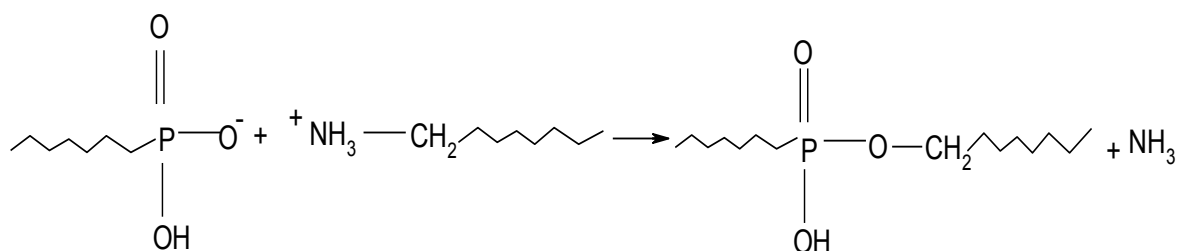


Figura 5.22. Mecanismul de deaminare

părerea acceptată până atunci. De asemenea s-a subliniat că etapa de deshidratare poate aduce modificări în acțiunea biologică.

Datele cantitative privind stabilitatea ALE au fost obținute printr-o analiză cinetică detaliată.

5.4.

Prin analiză termică în condiții neizoterme s-au studiat eventualele interacții induse termic între ALE și diferiți excipienți ce pot fi folosiți la personalizarea formulărilor solide. Celuloza microcristalină, amidonul și gelatina nu interacționează cu ALE; maltoza și stearatul de magneziu au stabilitate termică redusă, se degradează sub temperatura de siguranță a ALE, de aceea se recomandă evitarea folosirii acestora în formulările solide conținând alendronat.

S-a studiat și produsul comercial FOSAMAX, constatându-se că procesele de degradare care interferează cu cele ale alendronatului sunt datorate lactozei din amestecul de excipienți (v. Fig. 5.31).

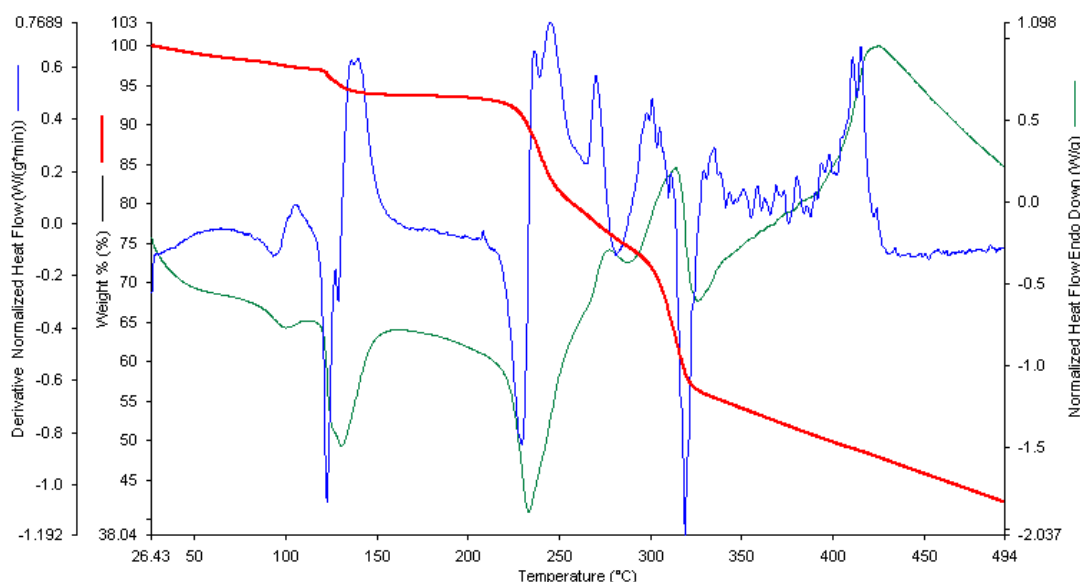


Figura 5.31. Termograma medicamentului FOSAMAX la viteza de încălzire $\beta=10^{\circ}\text{C}/\text{min}$

5.5.

S-a obținut un compozit (sub forma unui material pulverulent) printr-o depunere controlată a alendronatului de sodiu pe suprafața hidroxiapatitei. Controlul depunerii s-a realizat prin tehnici spectroscopice (de ex. prezența azotului aminei primare în spectrul EDX), iar cantitatea depusă, 22% masă, s-a determinat prin termogravimetrie.

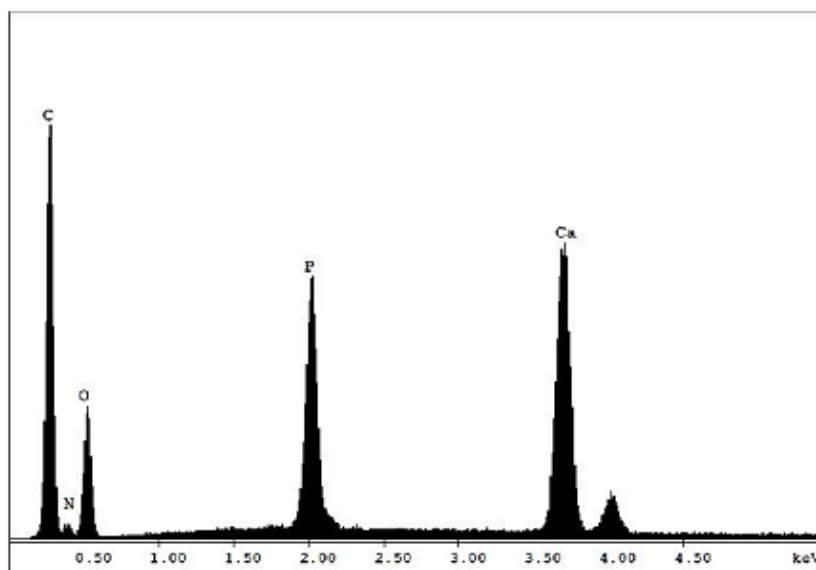


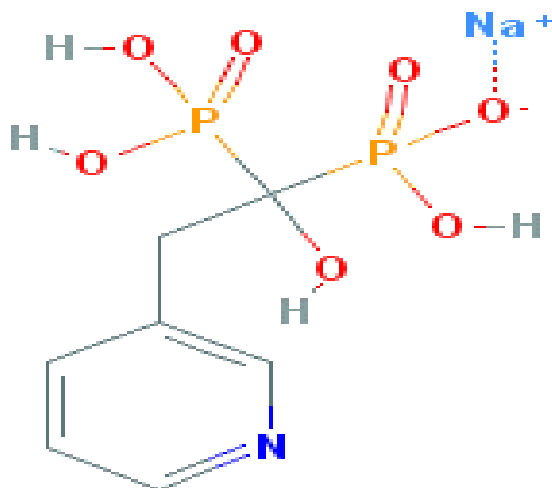
Figura 5.32. Spectrul EDX al compozitului.

Avantajele compozitului:

- hidroxiapatita a fost sintetizată într-o matrice de polimeri care îi oferă un biomimetism înalt;
- alendronatul de sodiu inhibă acțiunea osteoresorbtivă a osteoclastelor;
- acțiunea biologică se manifestă doar în zona intervenției chirurgicale, evitându-se răspândirea ALE în restul organismului, în acest fel limitând, sau chiar eliminând efectele secundare ale acestuia.

5.6.

Risedronatul de sodiu (v. Schema 5.2), cu o activitate biologică de zece ori mai mare decât a ALE, este un candidat de perspectivă atât pentru obținerea de compozite bioactive, cât și pentru formulări solide personalizate.



Schema 5.2. Structura Risedronatului de sodiu

Risedronatul de sodiu prezintă o stabilitate termică inferioară alendronatului de sodiu. Datele termoanalitice și analiza cinetică au confirmat o suită de procese complexe de degradare (Tab. 5.7).

Tabelul 5.7. Datele termoanalitice pentru Rise la 10°C/min

Etapă	Pierdere de masă experimental (%)	Masa moleculară calculată cf. pierderii de masă	Intervalul de temperatură, °C
I	5.6	17	---85
II	4.0	12.2	144-167
III	2.0	6	179-218
IV	3.38	10.3	220-255
V	6.3	19.2	255-264
VI	2	6	Over 380
Total	23.28	71	

Dintre excipienții studiați s-a constatat că celuloza microcristalină și amidonul nu influențează stabilitatea risedronatului, însă manitolul și stearatul de magneziu o înrăutățesc semnificativ. Ținând seama că Rise ca atare are o stabilitate mediocră, se recomandă ca pentru formulările solide să se recurgă la stabilizarea prin cașerarea cu polimeri biocompatibili.

CONCLUZII FINALE

1. Scopul tezei a fost obținerea unui material compozit de tip hidroxiapatită cu utilizare în regenerarea crestei osoase, ca fază premergătoare implantului dentar.
2. Noutatea adusă de teză este realizarea acestui material în condiții cât mai asemănătoare cu produsul natural de sinteză osoasă. Astfel, procesul de sinteză are loc în prezența unei matrici proteice și în condițiile utilizării unor agenți de fixare de tip bisfosfonat. În acest fel, procesul de adaptare a țesutului osos la noul material de regenerare este scurtat și eficientizat.
3. În realizarea obiectivelor tezei s-au folosit o serie de tehnologii și metode moderne și complexe, cum ar fi: spectrometria în infraroșu cu transformată Fourier, reflexia totală atenuată, difracția de raze X, imagistica electronică, analiza termică.
4. Sinteza neconvențională a hidroxiapatitei, prezentată în teză, folosește ca unică sursă de energie, atât pentru încălzire cât și pentru agitare, un câmp de ultrasunete și aplică efectul template pentru orientarea cristalitelor în procesul de sinteză/precipitare. Matricea necesară a fost asigurată de soluții de gelatină și gelatină/pectină. Gelatina are rolul de a mima fragmente din conformația collagenului, iar pectina, de a modifica echilibrul hidrofil/hidrofob la interfețele de creștere a cristalelor.
5. Rezultatele tezei au constatat în obținerea unui nou material pentru regenerarea osoasă “ Hidroxiapatită biomimetică”, material comparabil cu țesut osos biogen, prin urmare cu biocompatibilitate și eficiență ridicate la osteointegrarea componentelor anorganice ale osului.

6. De asemenea, rezultatele obținute au fost publicate în 3 articole, a căror sumă a factorilor de impact ISI Thompson este 5,860.
7. Verificarea eficienței materialului obținut s-a făcut comparativ cu țesut osos de referință, prin metoda fixării proteinelor din ser control de referință. Experimentele au arătat că noul material fixează proteinele, calitativ și cantitativ, similar cu un țesut osos biogen.
8. S-au demonstrat avantajele folosirii tehnicilor instrumentale în fazele non-clinice ale dezvoltării unor medicamente sau materiale bioactive. Trebuie menționată în mod deosebit analiza termică pentru versatilitatea acesteia la studiul formulărilor solide care pot fi promovate într-o etapă avansată a studiilor non-clinice.
9. În paralel cu dezvoltarea materialului "Hidroxiapatită biomimetică" s-au studiat și posibilități excipienți necesari în cazul formulărilor solide cu bisfosfonați, precizându-se o formulă stabilă ce conține următorii excipienți: silica, amidon, microceluloză cristalină și gelatină; manitolul și stearatul de magneziu nu sunt recomandați în acest caz.
10. Rezultatele obținute în cadrul tezei "Noi compuși bioactivi în procesul de osteogeneză" deschide posibilitatea personalizării materialelor utilizate în procesele biologice prin simularea proceselor naturale în sinteza acestora. Astfel hidroxiapatita clasică, care obligă țesutul osos să se adapteze într-o formă nefiziologică, a fost înlocuită cu o hidroxiapatită structurată de la început pe o matrice proteică, urmând ca integrarea acestei hidroxiapatite în matricea colagenică osoasă să decurgă firesc și ușor.

CONTRIBUȚII PROPRII

1. S-a obținut un produs nou pe baza unei metode inovatoare de sinteză umedă a hidroxiapatitei în prezența unei matrici proteice, urmată de depunerea controlată a unui bisfosfonat.
2. S-a elaborat un studiu asupra hidroxiapatitei ca material de protezare ortopedică și stomatologică. De asemenea s-a trecut în revistă literatura despre bisfosfonați ca substanțe care intervin direct în echilibrul osteoblaste-osteoclaste.

3. S-a formulat ideea de a realiza un compozit având ca bază o hidroxiapatită cu grad înalt de biomimetism, pe care să se depună alendronat de sodiu, astfel ca acesta să-și manifeste activitatea biologică în zona protezării, fără ca efectele secundare să se manifeste în restul organismului.
4. S-au efectuat mai multe sinteze de hidroxiapatită în condiții neconvenționale: aportul de energie necesar încălzirii și agitării s-a realizat de la o sursă de ultrasunete, iar mezostructura apropiată de hidroxiapatita biogenă s-a asigurat prin efectul template al gelatinei și pectinei.
5. Prelucrarea datelor obținute de la un ansamblu de tehnici instrumentale: analiza termogravimetrică, difracția de raze X, spectrometria în IR, imagistica SEM, spectrometria EDX. Interpretarea acestor date a permis dirijarea sintezei spre un material cu structura și textura apropiate de cel biogen.
6. S-a efectuat un studiu aprofundat asupra comportării termice a alendronatului de sodiu trihidrat, respectiv a risedronatului de sodiu. Coroborarea datelor TG și HF a permis propunerea mecanismelor de reacție pentru cele două etape de degradare induse termic: dehidratarea, respectiv deaminarea. Prelucrarea datelor TG și DTG a condus la o analiză cinetică detaliată a termodegradării.
7. Studiul comportării termice a amestecurilor binare bisfosonați-excipienti a permis identificarea efectelor a peste șapte excipienți asupra stabilității compusului bioactiv. Datele sunt esențiale pentru orientarea formulărilor solide în etapele non-clinice ale elaborării medicamentelor.
8. S-a studiat comportarea termică a medicamentului FOSAMAX și s-au identificat interacțiunile substanță activă-excipient care afectează stabilitatea alendronatului de sodiu trihidrat.
9. S-au realizat mostre de compozit hidroxiapatită biomimetică-alendronat de sodiu, utilizând o tehnologie neconvențională bazată pe microunde și pe modificarea de polaritate a solventului la faza de depunere. Mostrele au fost caracterizate fizico-chimic și pot fi avansate spre studii clinice pe animale.
10. S-a propus o metodă rapidă pentru identificarea biocompatibilității materialelor de tip hidroxiapatită, folosind tehnica analizei termice și un ser control element uzual în laboratoarele clinice.

LISTA LUCRĂRILOR PUBLICATE SAU COMUNICATE

1. **Doca, S. C.**, Ceban, I, Vlase, T, Albu, P, Vlase, G, Biomimetic hydroxyapatite / biopolymer matrix composite: Synthesis, characterization and kinetic analysis, CCTA 12, 6-10 Sept. 2015, Zakopane, Polonia, p.424.
2. **Doca, S. C.**, Doca, N., Pricop, M., Urechescu, H., Vlase, G., Vlase, T., Rapid quantitative test of natural bone granulates used in dental practice, CCTA 12, 6-10 Sept. 2015, Zakopane, Polonia, p.426-7.
3. Albu, P., **Doca, S. C.**, Anghel, A., Vlase, G., Vlase, T., Thermal behavior of sodium alendronate; a kinetic study under non- isothermal conditions, J. Therm. Anal. Calorim., 127(2017)571-6.
4. **Doca, S. C.**, Albu, P., Ceban, I., Anghel, A., Vlase, G., Vlase, T., Sodium alendronate used in bone treatment. A complex study on the thermal behaviour of the bioactive compound and its binary mixtures with several excipients, J. Therm. Anal. Calorim., J. Therm. Anal. Calorim., 126(2016)189-94.
5. Vlase, G., Albu, P., **Doca, S. C.**, Mateescu, M, Vlase, T, The kinetic study of the thermally induced degradation and an evaluation of the drug-excipient interaction performed for a new generation of bisphosphonates - Risedronate. J. Therm. Anal. Calorim., DOI 10.1007/s10973-018-7216-9.