

**Academia
Oamenilor de Știință
din România**



**Academy
of Romanian
Scientists**

Add: Str. Ilfov nr. 3 sector 5, 050045, București, ROMANIA, Cod Fiscal: 5091859
Tel. 00-4021/314.74.91; Fax. 00-4021/314.75.39, Web-site: www.aos.ro, E-mail: aosromania@yahoo.com

RAPORT DE ACTIVITATE

Biomateriale pentru regenerare osoasă

Cercetător postdoctoral:

Ș.l. Dr. Ing. Ionela Andreea NEACȘU

Coordonator:

Prof. Dr. Ing. Ecaterina ANDRONESCU

Decembrie 2021



CUPRINS

1. Memoriu justificativ	2
2. Introducere	3
2.1. Țesutul osos - corelația dintre anatomie și fiziologie	3
2.2. Afecțiuni ale sistemului osos	4
2.3. Compuși antitumorali naturali	6
3. Materiale și metode.....	7
3.1. Materiale	7
3.2. Metoda de sinteză pentru hidroxiapatită.....	7
3.3. Metoda de sinteză pentru sistemele hidroxiapatită - curcumină.....	7
3.4. Metode de caracterizare morfologică și structurală.....	8
3.5. Metode de evaluare biologică.....	9
3.5.1. Analiza citotoxicității	9
3.5.2. Analiza ciclului celular.....	9
4. Rezultate și discuții.....	10
5. Concluzii	17
6. Referințe.....	18

1. Memoriu justificativ

Bolile musculo-scheletice (de exemplu, osteoporoză, osteoartrita, cancer osos) conduc la peste 25.000 de decese anual în Uniunea Europeană [1]. Mai mult, un raport realizat în șase dintre cele mai mari țări europene sugerează o creștere alarmantă a numărului total de fracturi osoase de la 2,7 milioane în 2017 la 3,3 milioane în 2030 [2]. Prin urmare, **terapiile capabile să regenereze și să refacă țesutul osos ar trebui să fie plasate în topul priorităților cercetării europene.** Strategiile actuale de inginerie a țesutului osos se concentrează pe materiale bioactive ceramice, polimerice sau hibride, fabricate sub diferite forme, de la pulberi la suporturi tridimensionale poroase (3D) [3], [4].

Prin abordarea sa multidisciplinară, proiectul **“Biomateriale pentru regenerare osoasă”** își propune dezvoltarea și bioevaluarea de noi materiale cu aplicații biomedicale care să faciliteze dobândirea de cunoștințe avansate în domenii științifice prioritare precum sănătatea și tehnologiile emergente. Proiectul abordează limitările actuale în terapia de regenerare osoasă prin dezvoltarea și caracterizarea complexă a unor sisteme pentru tratamentul cancerului osos pe bază de hidroxiapatită biomimetică cu proprietăți funcționale îmbunătățite. Astfel, se propune îmbunătățirea pulberilor de hidroxiapatită prin funcționalizare cu un agent antitumoral natural în diverse proporții (curcumina). Cancerul osos reprezintă unul dintre cele mai rare tipuri de cancer (1% din numărul total de cancere), dezvoltându-se la nivelul oaselor lungi ale brațelor sau picioarelor. Acesta presupune existența unei tumori în interiorul osului, care ulterior distruge țesutul înconjurător. Cancerul osos poate fi: i) cancer osos primar, unde celulele maligne se dezvoltă în interiorul osului și ii) cancer osos secundar, care apare ca urmare a metastazelor altor organe, precum sâni, plămâni sau prostată.

Scopul acestui studiu constă în sinteza și caracterizarea unor materiale pe bază de hidroxiapatită încărcată cu curcumină pentru tratamentul cancerului osos. Sinteza hidroxiapatitei este efectuată pornind de la Ca(OH)_2 și $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, în condiții controlate, pentru a obține nanoparticule fine monodisperse și pentru a evita aglomerarea ulterioară necontrolată a acestora. Precipitatul obținut este uscat, calcinat, apoi suspendat în soluție de curcumină – diclormetan (în care curcumina adăugată reprezintă 5%, 10% masic din cantitatea de hidroxiapatită) și omogenizat până la evaporarea solventului. Sistemele obținute sunt caracterizate din punct de vedere morfologic și structural, precum și din punct de vedere al comportamentului *in vitro* caracterului antitumoral.

2. Introducere

2.1. Țesutul osos - corelația dintre anatomie și fiziologie

Osul este un țesut conectiv mineralizat, ce prezintă 4 tipuri de celule: osteoblaste, celule ale mucoasei osoase, osteocite și osteoclaste. Osul exercită funcții importante în corp, precum locomoția, suport mecanic, protecție pentru țesuturile moi, stocarea de calciu și fosfat și adăpostirea măduvei osoase. Pe lângă aceste funcții, cele 206 de oase din corp ajută la producerea celulelor din sânge, depozitează minerale importante și eliberează hormonii necesari funcțiilor corporale. Spre deosebire de alte organe vii, oasele sunt ferme și puternice, dar au propriile vase de sânge, vase limfatice și nervi. În ciuda aspectului inert, osul este un organ dinamic care este resorbit în continuu de către osteoclaste și procesul de osteogeneză are loc datorită osteoblastelor.

Osteocitele se comportă ca senzori mecanici și orchestratori în procesul de remodelare osoasă. Aceste celule sunt derivate din liniile celulare stem, precum celulele hematopoietice mononucleare sau celule stem mezenchimale, cu ajutorul apariției unor factori externi (**Eroare! Fără sursă de referință.**). Structura heterogenă și anizotropă a osului este compusă din aranjamente neregulate optimizate și orientări macrostructurale, asemenea structurii osului cortical și spongios.

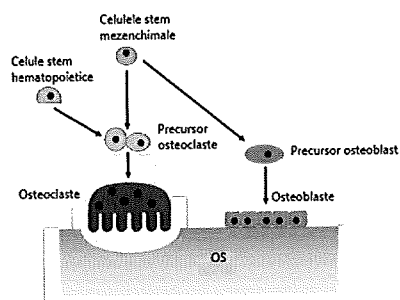


Figura 1. Evoluția osteoclastelor și osteoblastelor în os [5]

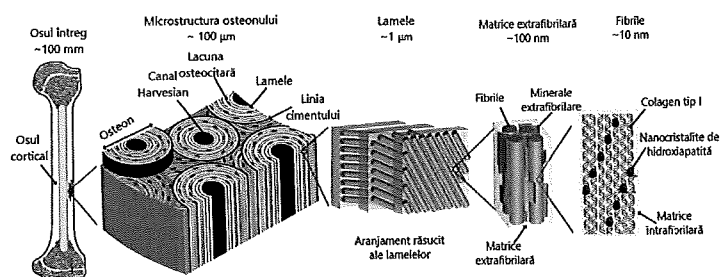


Figura 2. Structura ierarhică a osului cortical uman [6]

Urmează microstructura (Figura 2) formată din osteoni care prezintă la rândul lor canale vasculare numite canale Harversiene și o limită exterioară cu un grad mare de mineralizare numită ciment. În osteoni, fiecare canal vascular este înconjurat concentric de lamele cu o grosime de 2-9 mm. Lamelele sunt la rândul lor formate din fibre de collagen, având diferite orientări. Fibrilele sunt înconjurate de minerale policristaline extrafibrilare, la fel ca matricea intrafibrilară, care poate

să mai conțină și componente moleculare, cum ar fi proteine necolagenice. Fibrilele conțin collagen de tip I și nanocristale de hidroxiapatită (50 nm lățime, 25 nm înălțime și 1,5-4 nm grosime). Aceste componente sunt create arhitectural să îndeplinească funcțiile necesare ale fiecărei părți din os. Proprietățile mecanice ale osului depind de fazele componente și organizarea structurală ierarhică a acestora [5] [6].

Osul este compus în principal din hidroxiapatită $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$ substituită cu ioni de carbonat și magneziu (~69% masic) și componenta organică. Colagenul de tipul I reprezintă ~90% masic din componenta organică a osului, iar restul de ~10% masic sunt proteine (osteonectina, fibronectina, osteopontina etc.). Fibrele de collagen sunt elastice și rezistente la rupere, în contrast cu faza minerală, care determină duritatea țesutului osos. Combinarea dintre rezistența mare la impact și rigiditatea crescută a componentei minerale generează proprietăți mecanice excelente ale osului [7].

2.2. Afecțiuni ale sistemului osos

Una dintre cele mai comune boli specifice sistemului osos este *osteoporoza*, care afectează milioane de oameni. Persoanele cu osteoporoză prezintă un risc mai mare de fracturi, care sunt adesea debilitante fizic și care pot conduce la degenerarea condiției fizice și sănătății psihice. Cea mai comună formă de osteoporoză este cunoscută drept “osteoporoză primară”. Aceasta este rezultatul impactului cumulativ al pierderii osoase și deteriorării structurii osoase pe măsură ce oamenii îmbătrânesc [6]. *Osteopenia* și *osteomalacia* sunt condiții patologice asemănătoare cu osteoporoza, dar prezintă un grad mai blând de degradare osoasă. Osteomalacia apare datorită deficitului de vitamina D, care este foarte importantă pentru absorbția calciului și trecerea în circulația sangvină. Acestea pot fi depistate cu ajutorul densitometriei sau a testelor de sânge.

Osteoartrita este una din cele mai comune boli degenerative ale articulațiilor, afectând astfel mai mult de 25% din populația cu vârsta de peste 18 ani. Schimbările patologice observate în timpul acestei boli includ pierderea progresivă și distrugerea cartilajului articular, îngroșarea osului subcondral, formarea de osteofite, grade variabile de inflamație a sinovialului, degenerarea ligamentelor și meniscului genunchiului și hipertrofia capsulei articulare. Etiologia osteoartritei cuprinde mai mulți factori și include leziuni articulare, obezitate, îmbătrânire și cauze ereditare. Datorită mecanismelor moleculare implicate în dezvoltarea osteoartritei, progresia bolii rămâne greu de înțeles. În prezent, ca tratament se utilizează medicamente nonsteroidiene anti-inflamatoare, inhibitori COX-2, corticoizi și introducerea fluidelor artificiale articulare. De

asemenea s-au încercat și metode chirurgicale de înlocuire a osului, dar nu s-a reușit restaurarea țesutului deja degradat [8].

Boala Paget (BP) este a doua cea mai comună afecțiune a osului, după osteoporoză, în general apărând la persoane cu vârstă mai mare de 50 de ani. Această boală afectează zone localizate ale scheletului osos, mai ales pelvisul, coloana vertebrală, femurul sau tibia, fiind cel mai des diagnosticată cu ajutorul radiografiilor utilizând radiațiile X. BP este o afecțiune metabolică comună, caracterizată de creșterea nivelului de remodelare osoasă, dar într-un mod dezorganizat. De asemenea numărul, dimensiunea și nucleii osteoclastelor se găsesc într-un număr mai mare. Dovezile adunate sugerează că numărul ridicat de procese de remodelare osoasă în boala Paget este cauzată de anomaliiile căilor moleculare care reglează activitatea osteoclastelor. Unii pacienți sunt asimptomatici, dar alții pot prezenta dureri osoase sau alte complicații, precum fracturi și deformări ale oaselor [9].

Cancerul este o boală complexă care evoluează într-un mediu tumoral eterogen și adaptabil. Sarcoamele și metastazele osoase împărtășesc același mediu, unde celulele tumorale se pot atașa și prolifera. Osteosarcomul (OS), condrosarcomul (CS) și sarcomul Ewing (ES) sunt cele mai frecvente tumori maligne primare, reprezentând 70% din cazurile de cancer osos [10]. În ciuda faptului că chimioterapia a îmbunătățit mult durata de viață a pacienților, sarcoamele sunt încă considerate mortale și într-un procent ridicat de cazuri, boli incurabile. În mod similar, metastazele se formează atunci când celulele carcinomului s-au atașat de suprafața scheletului și în acest stadiu boala este de obicei considerată incurabilă. Ele pot induce evenimente legate de schelet, cum ar fi compresia măduvei spinării [11], fracturi patologice [12], sau hipercalcemie [13] și în cele din urmă duc la dureri osoase chinuitoare.

Modalitățile actuale de tratament sunt paliative și adesea asociate cu reacții adverse inconfortabile. În prezent, cele mai utilizate metode de tratament pentru cancerul osos sunt chimioterapia, radioterapia și intervenția chirurgicală. În majoritatea cazurilor, pacienții ar trebui să aibă o combinație a acestor trei metode de tratament și observarea ulterioară a efectelor [14][15]. Pentru prima metodă de tratament se folosesc diferiți agenți chemo-terapeutici (citostatice), cum ar fi cisplatina [16], paclitaxel [17], doxorubicina [18], bisfosfonați [19]. În cazul hipercalcemiei indusă de tumori, bisfosfonații sunt considerați tratamentul standard deoarece previn dezvoltarea metastazelor osoase. Modul de acțiune al acestor bisfosfonați este reprezentat de legarea de cristalele de hidroxiapatită din matricea osoasă, acumulându-se local în concentrații foarte mari în

cavitatea de resorbție a osteoclastelor, de unde sunt încorporați de celule, determinându-le astfel apoptoza [20].

Când vine vorba de țesuturile afectate de cancer, țesutul osos este unic prin activitatea sa, în sensul că prezintă o caracteristică importantă - remodelarea constantă. Acest lucru se întâmplă din cauza resorbției secvențiale a osteoclastelor și formării osteoblastelor. Fenomenul de remodelare este dependent de factorii de creștere și de hormonii sistemici circulanți și, în același timp, este foarte coordonat în condiții normale pentru a susține un echilibru între resorbția osoasă și formarea de os nou [21], [22]. Astfel, este necesar să înțelegem cum o astfel de boală modifică structura matricei osoase care duce la un risc mai mare de fractură și modul în care tratamentele terapeutice corespunzătoare pot afecta proprietățile mecanice ale osului.

2.3. Compuși antitumorali naturali

În prezent, se recomandă utilizarea materialelor naturale pentru aplicații în domeniul biomedical, în tratamentul anumitor boli, în special cancerul [23][24][25]. De-a lungul timpului au fost studiate mai multe substanțe care au un efect similar cu activitatea bifosfonaților, printre care unele studii recente au demonstrat că efectele antiresorbtive ale curcuminei asupra remodelării osoase funcționează în același mod [26]. Un studiu realizat de French et al., constând în evaluarea activității pe termen lung a curcuminei administrată ca tratament la șobolanii adulți care au suferit ovariectomie (pentru inducerea de osteoporoză postmenopauză), a concluzionat că curcumina a efectuat modificări favorabile în mișcarea oaselor și o îmbunătățire a rezistenței osoase în modelul *in-vivo* ales [27].

Curcumina este un polifenol hidrofob și un ingredient esențial extras din rizomul plantei *Curcuma Longa*. Rădăcina acestei plante are colorație galbenă, motiv pentru care a fost utilizată ca agent colorant în produse alimentare și medicamente în țările asiatice [28]. Curcumina (1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadien-3,5 dionă) are o varietate largă de aplicații ca agent terapeutic (potențial antiinflamator, anti-cancerigen și neuroprotector), bucurându-se de un real interes datorită structurii conjugate unice care îi permite să acționeze ca un antioxidant [29].

Studii clinice și preclinice au arătat efectele benefice ale curcuminei asupra câtorva tipuri de cancer precum cancer de sân, de vezică urinară, de colon, de gât, de col uterin, pulmonar, ovarian, de pancreas și cancer de prostată [30][31][32][33][34][35]. Are rolul de a crește sensibilitatea celulelor tumorale față de medicament și de a proteja celulele sănătoase, fără a produce reacții adverse. Mai mult, curcumina inhibă radicalii liberi din grăsimi și ajută la formarea

enzimelor în ficat. De asemenea, reduce angiogeneza și previne dezvoltarea celulelor canceroase din organism. Din punct de vedere farmacologic, curcumina este o substanță sigură pentru organism. Multiple studii clinice, au demonstrat lipsa de toxicitate a acesteia, chiar și la administrarea a 10g/zi [36].

Pornind de la datele încurajatoare din literatură, acest studiu investighează activitatea curcuminei într-o matrice de hidroxiapatită (deja bine studiată ca material de regenerare a țesutului osos) pentru dezvoltarea unui posibil sistem de tratare a cancerului osos.

3. Materiale și metode

3.1. Materiale

Materiile prime utilizate în acest studiu au fost fosfat de amoniu dibazic (Na_2HPO_4 , puritate $\geq 99.0\%$), hidroxid de calciu ($\text{Ca}(\text{OH})_2$, puritate 99.995%), soluție de hidroxid de amoniu 28% (NH_4OH , puritate $\geq 99.99\%$), diclorometan (CH_2Cl_2 , puritate $\geq 99.9\%$) și curcumină cu un conținut $\geq 94\%$ de curcuminoid. Acestea au fost achiziționate de la Sigma-Aldrich (Darmstadt, Germania) și utilizate fără purificare ulterioară. Pentru evaluarea biologică a fost utilizată linia celulară MG-63 (ECACC 86051601), menținută în Dulbecco's Modified Eagle Medium F-12 (DMEM: F12) suplimentat cu 10% ser fetal bovin (FBS), la 37°C , 5% CO_2 , în atmosferă umedă.

3.2. Metoda de sinteză pentru hidroxiapatită

Hidroxiapatita a fost sintetizată prin metoda co-precipitării, pornind de la hidroxid de calciu și fosfat dibazic de sodiu, menținând raportul specific Ca/P de 1,67. În prima etapă, cantități adecvate de precursori de Ca^{2+} și PO_4^{3-} au fost dispersate individual în apă ultrapură sub agitare magnetică continuă timp de 1 oră la 500 rpm. Ulterior, soluția de fosfat a fost adăugată prin picurare peste suspensia de hidroxid pentru a obține precipitatul dorit. Valoarea pH-ului a fost menținută la 10,5 cu ajutorul unei soluții amoniacale 28%, sub agitare magnetică la 500 rpm timp de încă 2 ore. După 24 de ore de maturare (pentru a se definitiva toate procesele chimice), precipitatul obținut a fost filtrat și spălat cu apă ultrapură până la pH neutru. În final, probele au fost supuse unui tratament termic de uscare la 80°C timp de 12 ore, apoi de calcinare la $600^\circ\text{C}/3\text{h}$.

3.3. Metoda de sinteză pentru sistemele hidroxiapatită - curcumină

Câte 0,1 g de pulbere de hidroxiapatită sintetizată anterior au fost dispersate în câte 5 ml soluție de diclorometan - curcumină (în care s-a adăugat curcumină astfel încât să reprezinte 5% și 10% masic din masa de hidroxiapatită, adică 5 mg, respectiv 10 mg) și s-a omogenizat viguros cu

un mojar și un pistil până la evaporarea solventului. După evaporare, s-a presupus că întreaga cantitate de curcumină este menținută în pulberile finale. Ca referință, a fost analizată în continuare hidroxiapatita neîncărcată (HAp), împreună cu cele 2 probe de hidroxiapatită încărcate cu curcumină obținute (HAp+5%curcumină și HAp+10%curcumină).

3.4. Metode de caracterizare morfologică și structurală

Pentru caracterizarea ulterioară a probelor din punct de vedere fizico-chimic, acestea au fost uscate în vid la temperatura camerei timp de 12 ore, apoi supuse analizelor de difracție de raze X (XRD), spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), împrăștierea dinamică a luminii (DLS), spectrometrie UV-Vis și microscopie electronică de baleiaj (SEM). Deoarece se dorește utilizarea sistemelor hidroxiapatită - curcumină în domeniul medical, în contact direct cu organismul, au fost evaluate suplimentar biocompatibilitatea și activitatea antitumorală.

Difracțiile de raze X au fost efectuate utilizând difractometrul PANalytical Empyrean (Malvern PANalytical, Bruno, Olanda) în geometrie Bragg-Brentano, echipat cu tub de raze X cu anod de Cu ($\lambda_{CuK\alpha}=1.541874 \text{ \AA}$) cu focalizare în linie, fantă divergentă programabilă pe partea incidentă și fantă anti-împrăștiere programabilă montată pe detector PIXcel3D pe partea difractată. Difractogramele au fost achiziționate pe domeniul de unghiuri 2θ 10-80°, cu pas de achiziție de 0.02° și timp de achiziție pe pas de 100s.

Achiziția de micrografii s-a realizat cu ajutorul unui microscop electronic de baleiaj de înaltă rezoluție Quanta Inspect F50 (Thermo Fisher - fost FEI, Eindhoven, Olanda), echipat cu spectrometru de raze X cu energie dispersivă (EDS).

Investigarea prin metoda FT-IR a pulberilor sintetizate a presupus analizarea unor cantități reduse de probă cu ajutorul spectrometrului Nicolet iS50R. Măsurătorile au fost realizate la temperatura camerei, cu modulul de atenuare totală a reflexiei (ATR), fiind efectuate 32 de scanări între 4000 cm^{-1} și 400 cm^{-1} , la o rezoluție de 4 cm^{-1} .

Măsurătorile DLS s-au realizat utilizând un aparat de tipul DelsaMax Pro (Beckman Coulter, Indiana, SUA) dotat cu un laser cu $\lambda=532 \text{ nm}$. Pulberea a fost dispersată în apă ultrapură, la temperatura camerei. Pentru realizarea unei dispersii cât mai bune, toate probele au fost supuse ultrasonării timp de 10 minute, utilizându-se o baie de ultrasonare.

Cinetica de eliberare *in-vitro* a substanței biologice activă s-a studiat prin imersarea a câte 20 mg pulbere de HAp, HAp+5%curcumină și HAp+10%curcumină în câte 10 mL soluție standard SBF (Simulated Body Fluid - Fluid fiziologic simulat) și menținerea amestecurilor la 37°C. După



diferite intervale de timp cuprinse între 5 minute și 36 ore, fiecare suspensie a fost filtrată iar filtratul a fost evaluat cu Spectroscopul UV-Vis Evolution 300 (Thermo Scientific). Măsurătorile au fost efectuate la temperatura camerei și lungime de undă fixă $\lambda=424$ nm, care este lungimea de undă maximă la care absoarbe curcumina. Pe baza absorbției standard față de curba concentrației, a fost determinată concentrația de curcumină și, prin urmare, cantitatea de curcumină eliberată la fiecare moment de timp. Procentul de eliberare la fiecare moment de timp a fost calculat pe baza cantității de curcumină încărcată per mg de material după studiile de încărcare.

3.5. Metode de evaluare biologică

3.5.1. Analiza citotoxicității

Toxicitatea sistemelor HAp-curcumină față de celulele MG63 a fost determinată cu ajutorul kit-ului de analiză CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS) (Promega). 10^4 celule au fost puse în contact cu diferite concentrații de curcumină (20 - 0,625 $\mu\text{g/mL}$) sau HAp-curcumină (400-12,5 $\mu\text{g/mL}$). Caracterul citotoxic am fost evaluat după 24, 48 și 72 ore de la adăugarea kit-ului de reacție (MTS), cu ajutorul unui fotometru TriStar, la $\lambda=490$ nm. Jumătatea concentrației inhibitorii maxime (IC_{50}) a fost calculată ca fiind concentrația de substanță biologic activă necesară pentru a inhiba 50 % din totalul celulelor MG63.

3.5.2. Analiza ciclului celular

Celulele MG63 au fost însămânțate la o densitate de 1×10^5 celule cm^{-2} în mediu de cultură DMEM:F12, cu un conținut de 10 % ser fetal bovin conținând și 100 $\mu\text{g/mL}$ HAp + 10%curcumină, 100 $\mu\text{g/mL}$ HAp + 5%curcumină, 5 $\mu\text{g/mL}$ curcumină, sau 10 $\mu\text{g/mL}$ curcumină, corespunzătoare cantităților teoretice maxime în care curcumina ar fi putut fi reținută pe substratul de HAp. Conținutul de ADN și distribuția ciclului celular au fost determinate utilizând citometrul XML Beckman Coulter. Astfel, după 48 ore de tratament, celulele MG63 au fost recoltate, fixate în etanol 70 % peste noapte, la -20°C , spălate de două ori cu PBS, apoi incubate cu 100 $\mu\text{g/mL}$ iodură de propidiu (PI) pentru 30 min, și păstrate la temperatura camerei și întuneric până la momentul analizei.

4. Rezultate și discuții

Difractogramele de raze X pentru pulberea de hidroxiapatită calcinată, neîncărcată cu substanță activă (figura 3) și pulberile de hidroxiapatită încărcate cu curcumină (figura 4) evidențiază maximele de difracție corespunzătoare indicilor Miller caracteristici hidroxiapatitei ca singura fază cristalină, conform datelor disponibile în fișa [PDF4 + 00-064-0738]. Pe baza valorilor mici de intensitate înregistrate și a prezenței unui halou de difracție la unghiuri mici, se poate considera că gradul de cristalinitate este scăzut pentru HAp dar crește ușor odată cu adăugarea de curcumină.

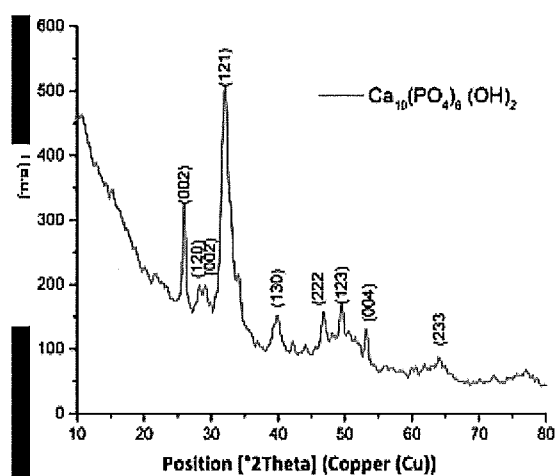


Figura 3 - Difractograma de raze X pentru hidroxiapatita neîncărcată

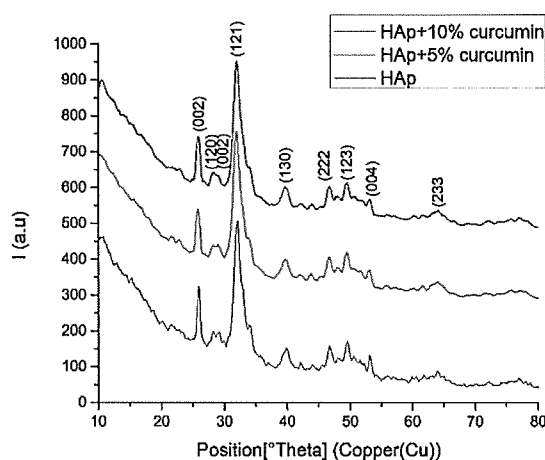


Figura 4 - Difractogramele de raze X pentru toate probele obținute

Imaginile de microscopie electronică de baleiaj (SEM) oferă informații despre morfologia și dimensiunile nanoparticulelor. În imaginile SEM reprezentative pentru HAp etalon, nanoparticulele prezintă morfologie aciculară și formează în mare parte aglomerate. În ceea ce privește dimensiunea acestora, lățimea nanoparticulelor variază între 10-30 nm (figura 5). Adăugarea de curcumină nu influențează semnificativ morfologia HAp, prin urmare forma aciculară este menținută și pentru pulberile de HAp+5%curcumină (figura 6) și HAp+10%curcumină (figura 7). Dimensiunile cresc ușor odată cu cantitatea de curcumină adsorbită, variind între 10-20 nm pentru proba HAp+5%curcumină și între 15-25 nm pentru proba HAp+10%curcumină (pentru măsurători a fost folosit software-ul ImageJ; pentru fiecare probă au fost efectuate cel puțin 10 măsurători pe particule separate, ușor de distins). În figura 8 se observă spectrul EDS care confirmă prezența elementelor O, P și Ca, caracteristice hidroxiapatitei.

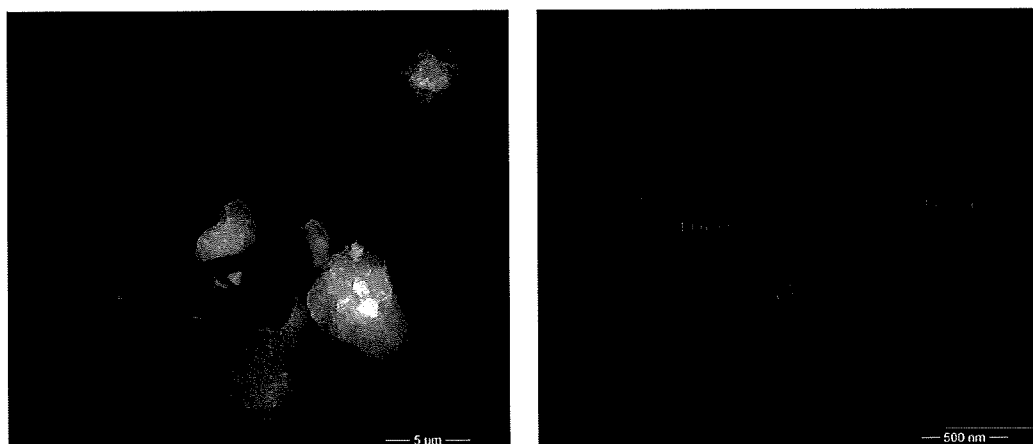


Figura 5 - Imagini SEM pentru HAp etalon

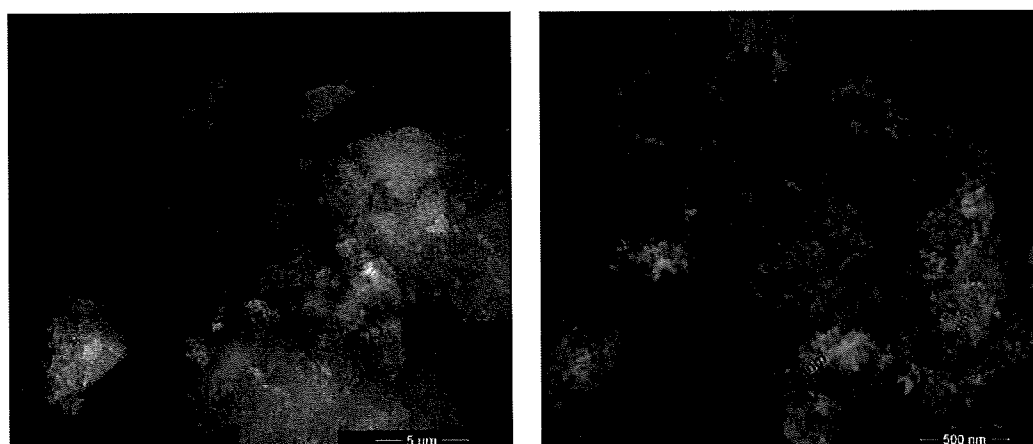


Figura 6 - Imagini SEM pentru HAp+5%curcumina

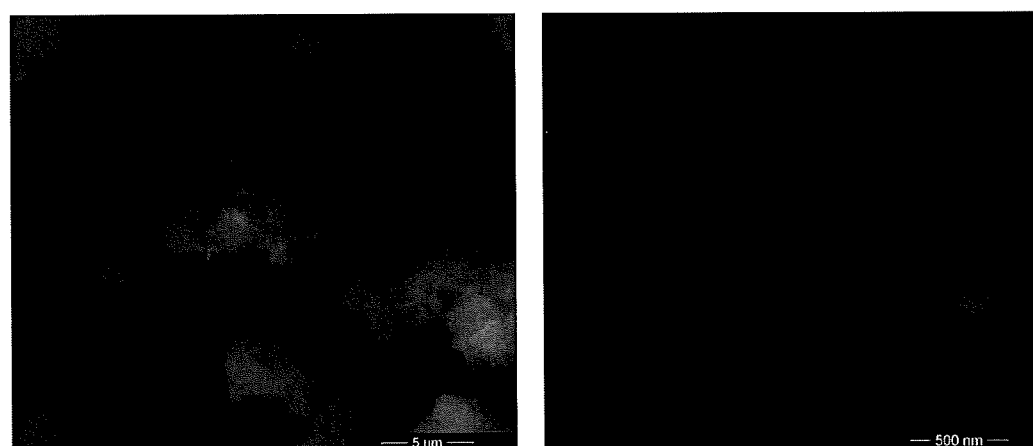


Figura 7 - Imagini SEM pentru HAp+10%curcumina

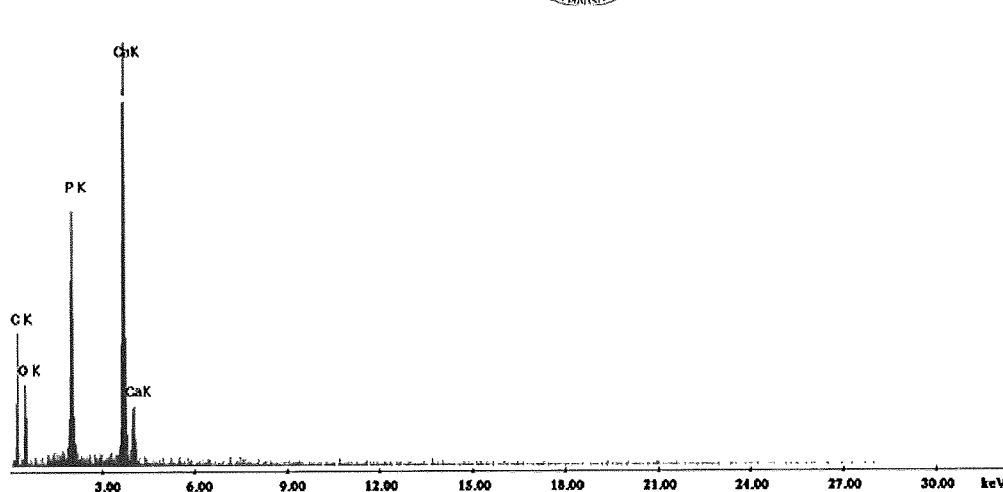


Figura 8 - Spectru EDS pentru HAp etalon

Analiza DLS confirmă tendința nanoparticulelor de a forma aglomerate, care în cazul de față au un diametru hidrodinamic al particulei în suspensie în apă de 4138,5 nm pentru HAp, 2338,1 nm pentru HAp+5% curcumină și 2175,1 nm pentru HAp+10% curcumină (figura 9).

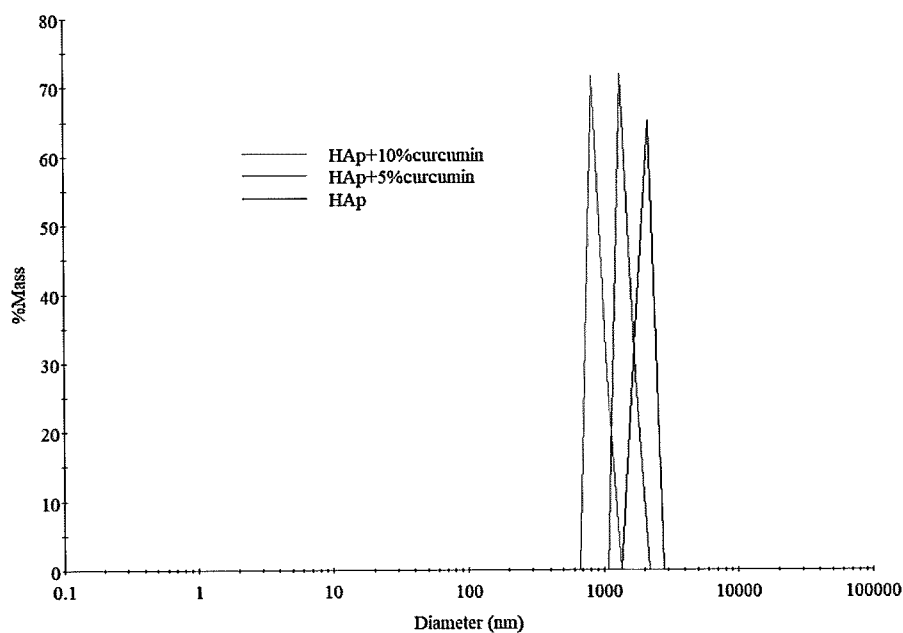


Figura 9 - Caracteristicile DLS ale probelor HAp, HAp+5%curcumină și HAp+10%curcumină

Dimensiunile măsurate prin DLS au fost mai mari decât valorile măsurate pe baza imaginilor SEM, ceea ce este de înțeles, deoarece în DLS aglomeratele mari maschează prezența particulelor și agregatelor mici, dând valori medii mai mari. De asemenea, se știe că atunci când

dimensiunea particulelor este mai mică, există o tendință mai mare de a forma aglomerate datorită suprafeței specifice mai mari. După cum se poate observa în figura 9, dimensiunile particulelor au o distribuție mono-modală, cu un indice de polidispersitate (PdI) de 0 nm pentru toate probele analizate. PdI reprezintă pătratul abaterii standard împărțit la pătratul mediei pentru fiecare vârf din analiza DLS. Valorile mai scăzute ale PdI sunt caracteristice sistemelor monodisperse, valori mai mici de 0,7 indicând o stabilitate mai mare pentru un sistem coloidal.

Pentru a demonstra imobilizarea curcuminei pe suprafața hidroxiapatitei, s-au colectat spectre FT-IR pentru toate cele 3 probe, iar rezultatele comparative sunt prezentate în figura 9 și figura 11. La extragerea spectrului hidroxiapatitei etalon din spectrul HAp+10%curcumină, sunt identificate benzi de absorbție specifice moleculei de curcumină, mai exact pentru legăturile C = O la 1590 cm^{-1} și C = C la 1512 cm^{-1} , dovedind astfel reținerea acestora în sistemele finale. Simultan, datorită prezenței apei adsorbite pe suprafața hidroxiapatitei și grupărilor fenolice ale curcuminei, se observă o aplatizare a benzilor de absorbție de la $3200\text{--}3500\text{ cm}^{-1}$, atribuite întinderii legăturilor O-H. Legătura P-O corespunzătoare hidroxiapatitei sunt observate la numerele de undă cuprinse între $1000\text{--}1200\text{ cm}^{-1}$, $900\text{--}950\text{ cm}^{-1}$ și $530\text{--}550\text{ cm}^{-1}$. La compararea celor două probe încărcate cu curcumină, se observă intensități mai scăzute ale benzilor specifice hidroxiapatitei în proba cu conținut mai mare de curcumină, deoarece o cantitate mai mare de substanță biologic activă ecranează grupările PO_4^{3-} (între 500 cm^{-1} - 600 cm^{-1}).

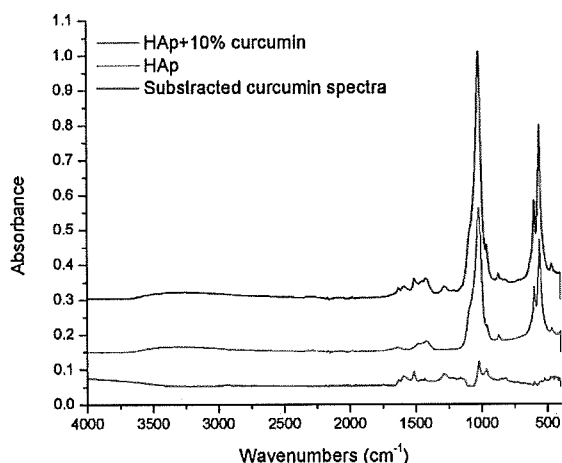


Figura 10 – Spectre FT-IR pentru HAp și HAp+10%curcumin

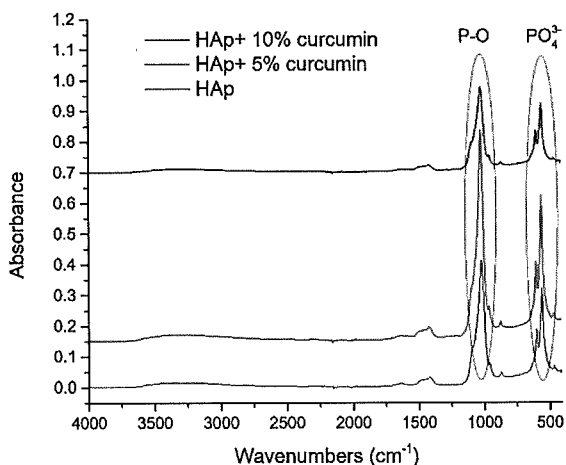


Figura 11 – Spectre FT-IR pentru toate probele

Eliberarea curcuminei din hidroxiapatită a fost studiată în soluție de SBF cu pH-ul 7,25 care conține speciile ionice și concentrațiile acestora corespunzătoare plasmii sanguine umane. Ca

o consecință a hidrofobicității sale, curcumina a prezentat o eliberare limitată din matricea de hidroxiapatită [37]. Rezultatele sunt prezentate ca procent din absorbția UV-VIS a curcuminei pure în SBF, care reprezintă în acest caz rata de eliberare de 100%. După cum se poate observa, după 36 de ore, ambele probe încărcate cu curcumină au prezentat doar ~20% eliberare din încărcarea totală a medicamentului, după care a fost atins intervalul de platou. O explicație ar putea apărea din capacitatea de chelare a ionilor metalici ai curcuminei, care determină atașarea curcuminei la matricea anorganică prin legarea la ionii de calciu prezenți în HAp. Pentru ambele probe, eliberarea medicamentului a prezentat o creștere inițială bruscă (“burst release”), în primele minute de incubare, urmată de un profil de eliberare treptată până la 24 de ore (figura 12).

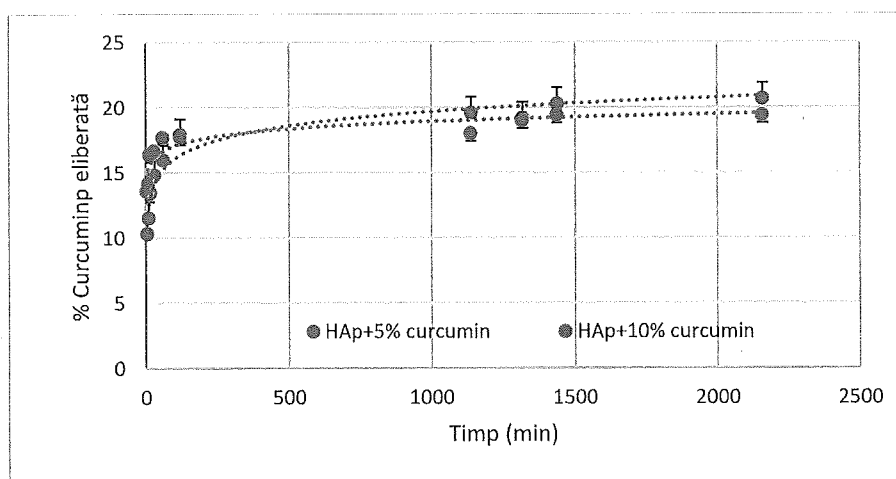


Figura 12 – Profilul de eliberare a curcuminei din pulberile de HAp

Efectul citotoxic al nanoparticulelor încărcate cu curcumină a fost evaluat pe celulele MG63 utilizând testul MTS la 24, 48 și 72 de ore (figura 13). Efectul inhibitor al noilor sisteme, precum și cel al curcuminei, se dezvoltă în timp. După un tratament de 72 de ore cu HAp + 5% curcumină, HAp + 10% curcumină și curcumină liberă, IC_{50} au fost de 17,991 $\mu\text{g/mL}$, 15,483 $\mu\text{g/mL}$ și, respectiv, 5,081 $\mu\text{g/mL}$ (figura 14A).

Însă, bazându-ne pe studiile de eliberare a medicamentului, conform cărora după 72 de ore doar 20% din curcumină este eliberată din sistemele cu HAp, concentrația reală de medicament eliberat care inhibă 50% din celulele MG63 este de fapt de 3,5982 $\mu\text{g/mL}$ pentru HAp + 5% curcumină și 3,0966 $\mu\text{g/mL}$ pentru HAp + 10% curcumină (figura 14B), dovedind că sistemele pe bază de HAp – curcumină au o eficiență mai bună în timp decât curcumina liberă.

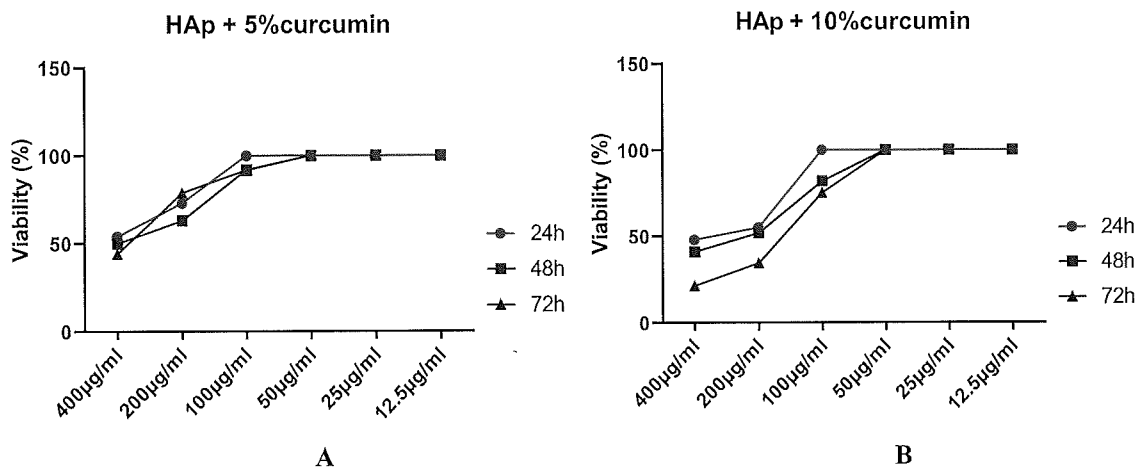


Figura 13 – Efectul sistemelor curcumină – hidroxiapatită asupra viabilității celulelor MG-63
(A) HAp + 5%curcumin (B) HAp + 10%curcumin

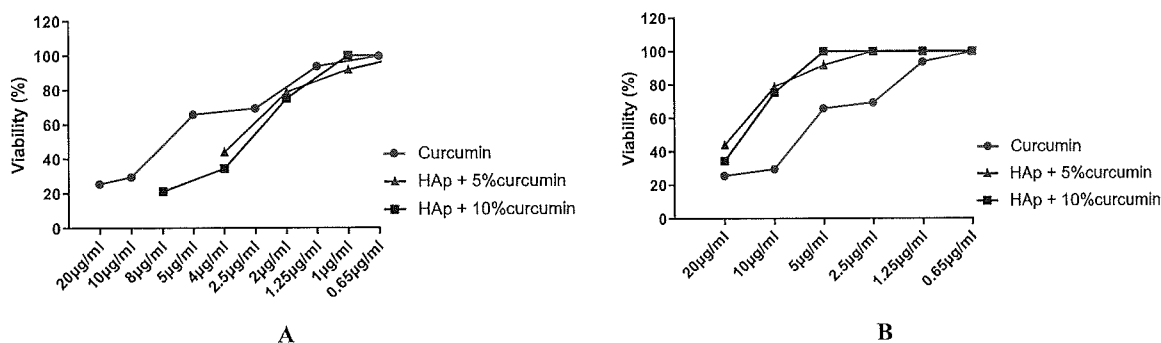


Figura 14 - Viabilitatea celulelor MG6 în funcție (A) de concentrația finală de curcumină încărcată în hidroxiapatită și (B) de concentrația curcuminei eliberată după 72h

În ceea ce privește influența compușilor testați asupra progresiei ciclului celular, evaluată la 48 de ore de la incubare, s-a observat că prezența curcuminei a dus la o creștere a numărului de celule aflate în faza G2/M, rezultatele fiind în acord cu studiile de literatură care au raportat un efect al curcuminei de a stopa ciclul celular. Tratamentul cu curcumină a dus de asemenea la scăderea numărului de celule aflate în faza G0/G1 și la o creștere a celor aflate în faza S. Materialele de tipul HAp + curcumină au generat creșterea fazei G2/M și scăderea fazei G0/G1. În ceea ce privește influența HAp + curcumină asupra fazei S, aceasta a fost scăzută în cazul HAp + 5% curcumină și nu a fost afectată de tratamentul cu HAp + 10% curcumină (figura 15).

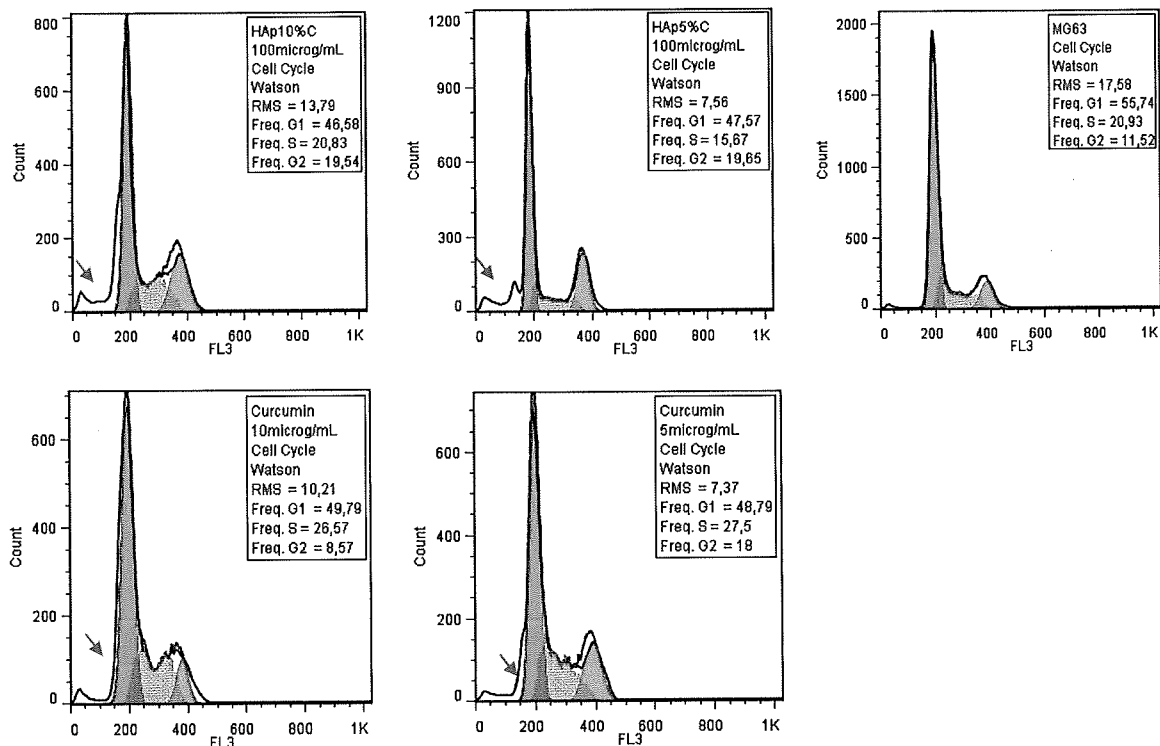


Figura 15 – Analiza ciclului celular al MG-63 după 48h de tratament cu sistemele curcumină – hidroxiapatită

5. Concluzii

Sinteza hidroxiapatitei prin metoda co-precipitării a condus la nanoparticule cristaline, monodisperse, cu morfologie aciculară. În urma evaluării biologice, s-a demonstrat că sistemele hidroxiapatită-curcumină au un efect citotoxic asupra celulelor canceroase osoase, activând apoptoza și crescând nivelul AMPK, ARRB1 asociat cu un ciclu celular G2/M. Mai mult, sistemele obținute au prezentat proprietăți biologice dependente de concentrația și profilul de eliberare al curcuminei din probele de HAp încărcate. Aceasta este o proprietate foarte utilă care poate fi evaluată pentru a reduce efectele dăunătoare asupra celulelor normale din apropiere atunci când se utilizează concentrații mari de curcumină per doză. Rezultatele demonstrează că nanocompozitele nou dezvoltate posedă proprietăți antitumorale bune, dar sunt necesare teste *in vivo* suplimentare.

Lucrări diseminate în perioada contractuală, în care cercetătorul postdoctoral a declarat afilierea la Academia Oamenilor de Știință din România:

1. Lucrarea cu titlul “Curcumin - hydroxyapatite systems used for bone cancer treatment/Sisteme curcumină - hidroxiapatită pentru tratamentul cancerului osos” și autorii: Ionela Andreea Neacșu, Lilia Matei, Alexandra Cătălina Bîrcă, Adrian Ionuț Nicoară, Vladimir Lucian Ene, Laura Denisa Dragu, Anton Ficăi, Coralia Bleotu, Ecaterina Andronescu a fost **aprobată pentru a fi publicată** în numărul 4/2021 al Revistei Române de Materiale.
2. Lucrarea cu titlul “Maturation of hydroxyapatite from biogenic calcium source – a comparative study” și autorii: Cristina Rodica Dumitrescu, Ionela Andreea Neacsu, Vasile Adrian Surdu, Adrian Ionut Nicoara, Cosmin Iulian Codrea, Cristian-Emilian Pop, Roxana Trusca, Ecaterina Andronescu a fost **transmisă spre publicare** în revista UPB Scientific Bulletin Series B.
3. Lucrarea cu titlul “Thermally Activated Al(OH)₃ Part II—Effect of Different Thermal Treatments” și autorii: Bogdan Stefan Vasile, Gheorghe Dobra, Sorin Iliev, Lucian Cotet, Ionela Andreea Neacsu, Vasile Adrian Surdu, Adrian Ionut Nicoara, Alina Boiangiu, Laurentiu Filipescu a fost **publicată** în *Ceramics* (2021) 4, 564–575.

6. Referințe

- [1] M. Jiménez, C. Abradelo, J. San Román, and L. Rojo, “Bibliographic review on the state of the art of strontium and zinc based regenerative therapies. Recent developments and clinical applications,” *Journal of Materials Chemistry B*, vol. 7, no. 12. Royal Society of Chemistry, pp. 1974–1985, 20-Mar-2019.
- [2] F. Borgström *et al.*, “Fragility fractures in Europe: burden, management and opportunities,” *Arch. Osteoporos.*, vol. 15, no. 1, pp. 1–21, Dec. 2020.
- [3] G. L. Koons, M. Diba, and A. G. Mikos, “Materials design for bone-tissue engineering,” *Nat. Rev. Mater.*, vol. 5, no. 8, pp. 584–603, 2020.
- [4] F. Curti *et al.*, “Development of 3D bioactive scaffolds through 3D printing using wollastonite–gelatin inks,” *Polymers (Basel)*, vol. 12, no. 10, pp. 1–15, 2020.
- [5] A. S. Neto and J. M. F. Ferreira, “Synthetic and marine-derived porous scaffolds for bone tissue engineering,” *Materials*, vol. 11, no. 9. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 1702, 13-Sep-2018.
- [6] R. Florencio-Silva, G. R. D. S. Sasso, E. Sasso-Cerri, M. J. Simões, and P. S. Cerri, “Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells,” *BioMed Research International*, vol. 2015. Hindawi Publishing Corporation, 2015.
- [7] M. M. Villa, L. Wang, J. Huang, D. W. Rowe, and M. Wei, “Bone tissue engineering with a collagen-hydroxyapatite scaffold and culture expanded bone marrow stromal cells,” *J. Biomed. Mater. Res. - Part B Appl. Biomater.*, vol. 103, no. 2, pp. 243–253, Feb. 2015.
- [8] D. Chen *et al.*, “Osteoarthritis: Toward a comprehensive understanding of pathological mechanism,” *Bone Research*, vol. 5. Bone Res, 17-Jan-2017.
- [9] S. H. Ralston *et al.*, “Diagnosis and Management of Paget’s Disease of Bone in Adults: A Clinical Guideline,” *J. Bone Miner. Res.*, vol. 34, no. 4, pp. 579–604, Apr. 2019.
- [10] R. E. Coleman *et al.*, “Bone metastases,” *Nature Reviews Disease Primers*, vol. 6, no. 1. Nature Publishing Group, pp. 1–28, 15-Oct-2020.
- [11] S. Hong, T. Youk, S. J. Lee, K. M. Kim, and C. M. Vajdic, “Bone metastasis and skeletal-related events in patients with solid cancer: A Korean nationwide health insurance database study,” *PLoS One*, vol. 15, no. 7 July, Jul. 2020.
- [12] L. M. Kelley *et al.*, “Pathological fracture and prognosis of high-grade osteosarcoma of the extremities: An analysis of 2,847 consecutive cooperative Osteosarcoma Study Group (COSS) patients,” *J. Clin. Oncol.*, vol. 38, no. 8, pp. 823–833, Jan. 2020.
- [13] J. Zagzag, M. I. Hu, S. B. Fisher, and N. D. Perrier, “Hypercalcemia and cancer: Differential diagnosis and treatment,” *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, no. 5, pp. 377–386, Sep. 2018.
- [14] H. Chen and Y. Yao, “Progress of biomaterials for bone tumor therapy,” *Journal of Biomaterials Applications*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 27-Jul-2021.
- [15] L. Ambrosio, M. G. Raucci, G. Vadalà, L. Ambrosio, R. Papalia, and V. Denaro, “Innovative biomaterials for the treatment of bone cancer,” *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 22, no. 15. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 8214,



- 30-Jul-2021.
- [16] E. Andronescu *et al.*, "Collagen-hydroxyapatite/cisplatin drug delivery systems for locoregional treatment of bone cancer," *Technol. Cancer Res. Treat.*, vol. 12, no. 4, pp. 275–284, Aug. 2013.
 - [17] E. M. Alexandrino *et al.*, "Paclitaxel-loaded polyphosphate nanoparticles: A potential strategy for bone cancer treatment," *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, no. 10, pp. 1298–1306, Feb. 2014.
 - [18] M. S. ur Rahman *et al.*, "Osteogenic silver oxide doped mesoporous bioactive glass for controlled release of doxorubicin against bone cancer cell line (MG-63): In vitro and in vivo cytotoxicity evaluation," *Ceram. Int.*, vol. 46, no. 8, pp. 10765–10770, Jun. 2020.
 - [19] V. F. Zymperdikas, M. P. Yavropoulou, E. G. Kaklamanos, and M. A. Papadopoulos, "Bisphosphonates as Supplement to Dental Treatment: A Network Meta-Analysis," *Journal of Dental Research*, vol. 100, no. 4, pp. 341–351, 2021.
 - [20] T.-S. Fu, T.-S. Huang, C.-C. Sun, Y.-C. Shyu, and F.-P. Chen, "Impact of bisphosphonates and comorbidities on initial hip fracture prognosis," *Bone*, vol. 154, p. 116239, Jan. 2021.
 - [21] H. C. Blair *et al.*, "Osteoblast differentiation and bone matrix formation in vivo and in vitro," *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, vol. 23, no. 3, Mary Ann Liebert Inc., pp. 268–280, 01-Jun-2017.
 - [22] U. H. Lerner, E. Kindstedt, and P. Lundberg, "The critical interplay between bone resorbing and bone forming cells," *J. Clin. Periodontol.*, vol. 46, no. S21, pp. 33–51, Jun. 2019.
 - [23] I. I. Lungu, A. M. Grumezescu, A. Volceanov, and E. Andronescu, "Nanobiomaterials used in cancer therapy: An up-to-date overview," *Molecules*, vol. 24, no. 19, Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 3547, 30-Sep-2019.
 - [24] A. Fica, C. Marques, J. M. F. Ferreira, E. Andronescu, D. Fica, and M. Sonmez, "Multifunctional materials for bone cancer treatment," *Int. J. Nanomedicine*, vol. 9, p. 2713, May 2014.
 - [25] D. Kashyap *et al.*, "Natural product-based nanoformulations for cancer therapy: Opportunities and challenges," *Seminars in Cancer Biology*, vol. 69, Academic Press, pp. 5–23, 01-Feb-2021.
 - [26] X. Chen *et al.*, "Curcumin activates DNA repair pathway in bone marrow to improve carboplatin-induced myelosuppression," *Sci. Rep.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–11, Dec. 2017.
 - [27] D. L. French, J. M. Muir, and C. E. Webber, "The ovariectomized, mature rat model of postmenopausal osteoporosis: An assessment of the bone sparing effects of curcumin," *Phytomedicine*, vol. 15, no. 12, pp. 1069–1078, Dec. 2008.
 - [28] A. Rauf, M. Imran, I. E. Orhan, and S. Bawazeer, "Health perspectives of a bioactive compound curcumin: A review," *Trends Food Sci. Technol.*, vol. 74, pp. 33–45, Apr. 2018.
 - [29] M. Sanei and A. S. Demneh, "Effect of curcumin on memory impairment: A systematic review," *Phytomedicine*, Jun. 2018.
 - [30] P. Basnet and N. Skalko-Basnet, "Curcumin: An anti-inflammatory molecule from a curry spice on the path to cancer treatment," *Molecules*, vol. 16, no. 6, pp. 4567–4598, Jun-2011.



- [31] M. C. Fadus, C. Lau, J. Bikhchandani, and H. T. Lynch, "Curcumin: An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent," *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, vol. 7, no. 3. Elsevier, pp. 339–346, 01-Jul-2017.
- [32] I. R. Afrida, F. Fatchiyah, N. Widodo, M. Amin, and M. S. Djati, "Shogaol, bisdemethoxycurcumin, and curcuminoid: Potential zingiber compounds against covid-19," *Biointerface Res. Appl. Chem.*, vol. 11, no. 5, pp. 12869–12876, 2021.
- [33] D. D. Abd El-Monem, A. A. S. Abdel Rahman, and S. H. B. Elwakeel, "Nanocurcumin improves the therapeutic role of mesenchymal stem cells in liver fibrosis rats," *Biointerface Res. Appl. Chem.*, vol. 11, no. 6, pp. 14463–14479, 2021.
- [34] Y. Wei, X. Pu, and L. Zhao, "Preclinical studies for the combination of paclitaxel and curcumin in cancer therapy (Review)," *Oncology Reports*, vol. 37, no. 6. Spandidos Publications, pp. 3159–3166, 01-Jun-2017.
- [35] A. Allegra, V. Innao, S. Russo, D. Gerace, A. Alonci, and C. Musolino, "Anticancer Activity of Curcumin and Its Analogues: Preclinical and Clinical Studies," *Cancer Investigation*, vol. 35, no. 1. Taylor & Francis, pp. 1–22, 02-Jan-2017.
- [36] M. C. Fadus, C. Lau, J. Bikhchandani, and H. T. Lynch, "Curcumin: An age-old anti-inflammatory and anti-neoplastic agent," *J. Tradit. Complement. Med.*, vol. 7, no. 3, pp. 339–346, Jul. 2017.
- [37] T. Raja Sekharan, R. Margret Chandira, S. C. Rajesh, S. Tamilvanan, C. T. Vijayakumar, and B. S. Venkateswarlu, "Ph, viscosity of hydrophobic based natural deep eutectic solvents and the effect of curcumin solubility in it," *Biointerface Res. Appl. Chem.*, vol. 11, no. 6, pp. 14620–14633, 2021.

Zimbra

ionela.neacsu@upb.ro

[Scientific Bulletin] Submission ID 11958

From : Scientific Bulletin <no-reply@scientificbulletin.upb.ro> Sun, Oct 17, 2021 10:51 AM
Subject : [Scientific Bulletin] Submission ID 11958
To : ionela neacsu <ionela.neacsu@upb.ro>, ionela neacsu <ionela.neacsu@upb.ro>

Thank you for your submission to Scientific Bulletin. Below is a copy of the information submitted for your records.

Submission ID: 11958

Title: MATURATION OF HYDROXYAPATITE FROM BIOGENIC CALCIUM SOURCE – A COMPARATIVE STUDY

Student: F

Author 1

Name: Cristina Rodica Dumitrescu

Org: University Politehnica of Bucharest

Country: Romania

Email:cristinadumitrescu0@gmail.com

Author 2 (CONTACT AUTHOR)

Name: Ionela Andreea Neacsu

Org: University Politehnica of Bucharest; National Research Center for Micro and Nanomaterials; Academy of Romanian Scientists

Country: Romania

Email:ionela.neacsu@upb.ro

Author 3

Name: Vasile Adrian Surdu

Org: University Politehnica of Bucharest; National Research Center for Micro and Nanomaterials;

Country: Romania

Email:adrian.surdu@upb.ro

Author 4

Name: Adrian Ionut Nicoara

Org: University Politehnica of Bucharest; National Research Center for Micro and Nanomaterials;

Country: Romania

Email:adrian.nicoara@upb.ro

Author 5

Name: Cosmin Iulian Codrea

Org: University Politehnica of Bucharest; Institute of Physical Chemistry – Ilie Murgulescu of the Romanian Academy

Country: Romania

Email:cosmin.codrea@stud.chimie.upb.ro; ccodrea@icf.ro

Other Authors: Cristian-Emilian Pop, University of Bucharest; Non-

Governmental Research Organization Biologic, Romania; pop.cristian-emilian@s.bio.unibuc.ro, contact@ngobiologic.com
Roxana Trusca, National Research Center for Micro and Nanomaterials, Romania; truscaroxana@yahoo.com
Ecaterina Andronescu, University Politehnica of Bucharest; National Research Center for Micro and Nanomaterials, Academy of Romanian Scientists, Romania; ecaterina.andronescu@upb.ro
Contact Alt Email: ionela.neacsu@upb.ro
Contact Phone: +40726606301

Keywords: hydroxyapatite nano-powder; microwave assisted hydrothermal maturation; eggshell; co-precipitation

Abstract: This research aims to synthesize hydroxyapatite powders from a biogenic calcium source (hen egg-shell) and study the effect of two maturation methods (a classical method and a combined short time maturation at 135°C in microwave assisted hydrothermal conditions) on its final properties. The synthesized specimens consist of nanometric polycrystalline particles of carbonated apatite, with enhanced osteogenic effect due to the presence of trace elements, and high crystallinity (up to 72.44%). It was concluded that the maturation conditions impacted the morpho-structural and compositional characteristics of the obtained powders, as well as their cytotoxic behavior in contact with mouse osteoblasts MC3T3-E1 culture.

Această lucrare urmărește sinteza unor pulberi de hidroxiapatită pornind de la o sursă biogenă de calciu (coaja de ou), și studierea efectului pe care procesul de maturare (clasic, respectiv maturare de scurtă durată la 135°C în condiții hidrotermale asistate de microunde) îl are asupra proprietăților materialului final. Au fost obținute particule nanometrice policristaline de apatită carbonată, cu efect osteogenic sporit datorită prezenței oligoelementelor, și cristalinitate ridicată (până la 72,44%). S-a ajuns la concluzia că parametrii de maturare au influențat caracteristicile morfo-structurale și compoziționale ale pulberilor obținute, precum și comportamentul citotoxic al acestora în contact cu osteoblastele de tip MC3T3-E1.

Comments:

Please do not reply to this message. For further help or to contact support, please use scientificbulletin@yahoo.com



FUNDAȚIA PENTRU ȘTIINȚA ȘI INGINERIA
MATERIALELOR - "ȘERBAN SOLACOLU"
Str. Gheorghe Polizu, nr. 1, cod 011061, Sector 1, București,
Tel. 021-402.38.35, CIF 17719729, Nr. Reg. Spec. 9/31.05.2005
e-mail dga10@yahoo.com, Rev.Romana.de.Materiale@gmail.com

Nr. 13/25.11.2021

SCRISOARE DE ACCEPTARE

Prin prezenta confirmăm că lucrarea :

Sisteme curcumină - hidroxiapatită pentru tratamentul cancerului osos

Curcumin - hydroxyapatite systems used for bone cancer treatment

autori :

**Ionela Andreea Neacșu , Lilia Matei, Alexandra Cătălina Bîrcă,
Adrian Ionuț Nicoară, Vladimir Lucian Ene, Laura Denisa Dragu, Anton Fikai,
Coralia Bleotu, Ecaterina Andronescu**

este aprobată pentru a fi publicată în numărul 4/2021 al Revistei Române de Materiale.