

# CULTIVAREA CELULELOR ENDOTELIALE PE SUPRAFEȚE FUNCȚIONALIZATE CU NANOPARTICULE ÎN BAZA GaN

Tudor BRANIȘTE, drd

Universitatea Tehnică a Moldovei

**Abstract:** *În această lucrare sunt identificate mecanismele de interacțiune a celulelor vii cu nanoparticulele de GaN. Viabilitatea celulară, precum și proliferarea și migrarea celulelor endoteliale pe suprafețe funcționalizate cu nanoparticule de GaN au fost investigate. Rezultatele obținute demonstrează potențialul aplicativ al nanoparticulelor în baza materialelor semiconductoare biocompatibile în domeniul ingineriei vasculare și a ingineriei tisulare în general.*

**Cuvinte cheie:** *endotelium, celule endoteliale, nanoparticule, GaN, materiale multifuncționale.*

**Introducere:** Dezvoltarea de noi "smart-materiale" multifuncționale și hibride pentru aplicații biologice și medicale este de o importanță majoră la momentul actual [1]. Cercetarea biomaterialelor este strâns legată de dezvoltarea senzorilor chimici/biochimici, hidrogeluri, membrane și organe artificiale, distribuirea medicamentelor, etc. Natura furnizează numeroase exemple de materiale biomimetice sub formă de compuși organici – anorganici, cum ar fi oase, dinți, mușchi. Având ca bază exemplele vii, noi materiale biologice inovative pot fi proiectate prin auto-organizare sau structurare directă. Regenerarea țesuturilor naturale [2], accelerarea sau întârzierea proceselor biologice și biochimice, precum și manipularea celulelor individuale sunt câteva din cele mai abordate probleme în domeniul ingineriei biomedicale [3]. Sistemele bazate pe nanoparticule sunt cea mai bună alegere pentru aplicațiile biomedicale, nu numai datorită dimensiunilor lor (de la 1 la 100 nm), dar și datorită reactivității crescute la doze mici, care derivă din concentrația mare de molecule active la suprafață, limitate într-un volum mic.

Aproape toate aplicațiile biomedicale actuale și viitoare implică transportul intravascular de nanoparticule, deoarece sângele este cel mai bun transportator pentru nanoparticule și clusterelor lor [4]. Prima barieră până la penetrarea țesutului după aplicarea intravasculară a nanoparticulelor sunt celule endoteliale - monostrat de celule pe suprafața interioară a vaselor de sânge, care formează interfața dintre sângele circulant în lumen și restul peretelui vascular. Funcția principală a celulelor endoteliale este de a asigura o barieră între sânge și restul țesuturilor corpului. Acționând asupra funcționalității celulelor endoteliale pot fi afectate nu numai vasele sanguine existente, ci și capacitatea celulară în formarea de noi vase de sânge, numit angiogeneză. Angiogeneză este un proces fundamental prin care se formează noi vase de sânge. Fiind un proces vital la creșterea și dezvoltarea unui organism viu, angiogeneză are un rol important în procesul de vindecare a rănilor, unde vase noi de sânge sunt formate din vase pre-existente [10]. Manipularea angiogenezei ar putea avea ca rezultat, de asemenea, într-o inhibare a dezvoltării vaselor sanguine. Se speră ca, prin blocarea formarea de noi vase ar putea fi posibil de a bloca dezvoltarea tumorilor canceroase. Țesutul canceros este dependent de aprovizionarea cu sânge la fel ca orice țesut normal, iar aceasta a condus la un interes deosebit asupra celulelor endoteliale și manipularea funcțională a comportamentului celular. Multe studii au fost deja efectuate, în scopul de a manipula cu funcționalitatea celulelor endoteliale, folosind nanoparticule acoperite cu peptide, iar rezultatul final a fost mai degrabă ghidat de surfactantul nanoparticulelor decât nanoparticulele în sine. GaN, datorită inerției sale chimice, ar putea fi un candidat bun, ținând cont mai ales de proprietățile piezoelectrice ale materialului, ce ar deschide posibilitatea de a transmite un semnal electric la celule (în scopul de a activa receptorii celulari) printr-o simplă activare a nanoparticulelor din exterior, folosind spre exemplu ultrasunetul.

În acest studiu celulele endoteliale porcine au fost investigate în contact direct cu nanoparticulele de nitrură de galiu. Printre caracteristicile remarcabile ale acestui material, se poate menționa proprietățile piezoelectrice, stabilitatea termică ridicată, stabilitatea la radiații și inerție chimică excelentă, care fac materialul promițător pentru aplicațiile biomedicale [5-7]. Există, totuși, cunoștințe limitate despre biocompatibilitatea GaN nanostructurat și impactul nanoparticulelor de GaN asupra celulelor vii.

## **Patrea experimentală**

**Prepararea nanoparticule de GaN.** Straturi subțiri de GaN au fost crescute pe nanoparticule de ZnO prin epitaxia din faza hidridă de vapori (HVPE). Galiu metalic, amoniacul (NH<sub>3</sub>) gaz, acidul clorhidric (HCl) gaz și hidrogenul (H<sub>2</sub>) au fost utilizate ca materii prime și gaze de transport.

În zona sursă – I, GaCl<sub>3</sub> s-a format ca urmare a reacțiilor chimice între HCl gazos și Ga lichid. GaCl<sub>3</sub> și NH<sub>3</sub> reacționează în zona de reacție I, unde la începutul temperatură a fost menținută la 600 °C timp de 10 min pentru a iniția formarea germinilor de GaN pe suprafața nanoparticulelor de ZnO și apoi a crescut până la 800 °C timp de încă 10 min pentru a crește un strat GaN pe nanoparticulele de ZnO. Rețineți că, la 800 °C, împreună cu creșterea GaN, nucleul de ZnO se descompune din cauza fluxului de hidrogen în camera de reacție. În procesul de creștere a GaN, debitele de HCl, NH<sub>3</sub> și H<sub>2</sub> au fost egale cu 15 SML/min, 500 SML/min și 3600 SML/min, respectiv. Nanomaterialul rezultat a fost utilizat în cultură cu celulele endoteliale de origine porcine.

Figura 1 ilustrează imagini TEM ale nanoparticulelor de GaN după procesul de creștere.

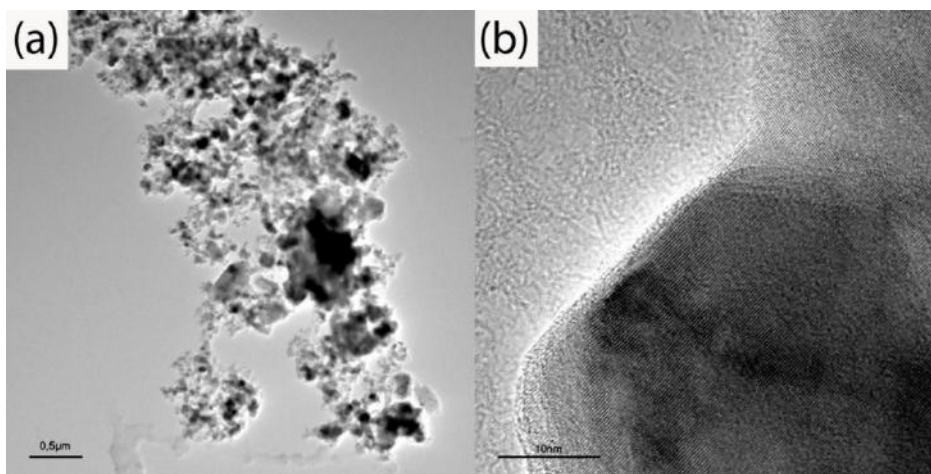


Figura 1. Imagini TEM a nanoparticulelor de GaN (a) și HRTEM de la o singură particulă de GaN pe ZnO prezentată în (b)

**Izolarea celulelor endoteliale și cultivarea lor.** Celulele endoteliale aortice porcine au fost izolate prin răzuirea celulelor din aortă în condiții sterile [8-9]. Celulele au fost cultivate în mediu de cultură celulară EGM-2 (Lonza) în cutii de cultură și incubate într-un incubator standard la 37 °C și 5% CO<sub>2</sub>. Toate experimentele au fost efectuate cu celule cu vârsta cuprinsă între pasajarea 5 și 9. În continuare a fost testată interacțiunea celulelor endoteliale (12500 celule/cm<sup>2</sup>) pe partea de sus a unei suprafețe ficționalizate cu nanoparticule de GaN. Nanoparticulele au fost fixate pe partea de sus a suprafeței substratului, în concentrația de 0,5 μg/cm<sup>2</sup>, 5 μg/cm<sup>2</sup>, 50 μg/cm<sup>2</sup> și 250 μg/cm<sup>2</sup>, utilizând aceeași cantitate de mediu de cultură.

**Funcționalizarea suprafețelor cu nanoparticule GaN.** Silicon biocompatibil neaderent pentru celule (Rema®Sil) a fost utilizat pentru procesul de fixare al nanoparticulelor. Inițial, cele două componente ale siliconului s-au amestecat într-un raport de 1:1; amestecul a fost răspândit în mod egal pe suprafața de sticlă prin centrifugare la 300g. Imediat după acoperire, nanoparticulele suspendate în apă deionizată s-au adăugat pe partea de sus a sticlei acoperite cu silicon. Apa a fost evaporată în timp de 24 ore la 60 °C, apoi probele au fost sterilizate la 180 °C timp de 4 ore. Înainte de implantarea celulelor probele au fost spălate cu apă deionizată pentru a îndepărta nanoparticulele neatașate.

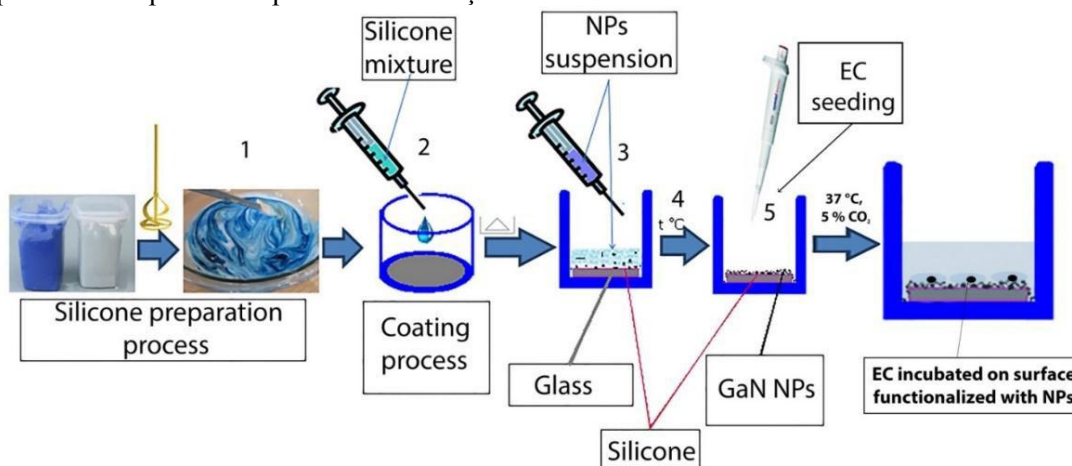


Figura 2. Schematica procesului de funcționalizare a suprafețelor cu nanoparticule semiconductoare

GaN NP ce au fost fixate pe partea de sus a siliconului biocompatibil, non-aderent pentru celulele vii. Figura 2 prezintă schematic conceptul procesului de funcționare a suprafeței de sticlă cu nanoparticule. Densitatea nanoparticulelor pe partea de sus a stratului de silicon continuu variază de la 0.5 pentru a 250  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Aceeași cantitate de celule endoteliale (12500 celule/ $\text{cm}^2$ ), pasajul 7, a fost incubate pe partea de sus a suprafeței de sticlă funcționalizată (cu diametrul de 12 mm), plasate în cutii cu 24 de godeuri și incubate într-un incubator standard. Celulele incubate pe sticle curate au fost utilizate ca control negativ, în timp ce drept control pozitiv am folosit sticlule acoperite cu Rema@Sil, un silicon biocompatibil pe care celulele nu aderă. Celulele au fost incubate timp de trei zile în mediu EGM-2. În timpul procesului de incubare, s-au luat imagini optice la fiecare 15 min timp de 24 de ore de la aceeași locație. S-a observat o bună aderență a celulelor pe suprafețele cu densitate mare de nanoparticule, migrarea activă a celulelor a fost observată pe probele cu o densitate scăzută a nanoparticulelor și nu au existat celule aderente pe suprafețele de silicon.

După ce grupul de control negativ (celule cultivate pe suprafețe de sticlă curată) a atins 100% din confluență, experimentul a fost oprit, iar celulele au fost numărate utilizând protocolul descris mai sus. În figura 3 și 4 putem vedea numărul de celule după trei zile de incubare pe suprafețe funcționalizate cu nanoparticule de GaN normalizat la numărul de celule cultivate pe sticlă curată (control negativ).

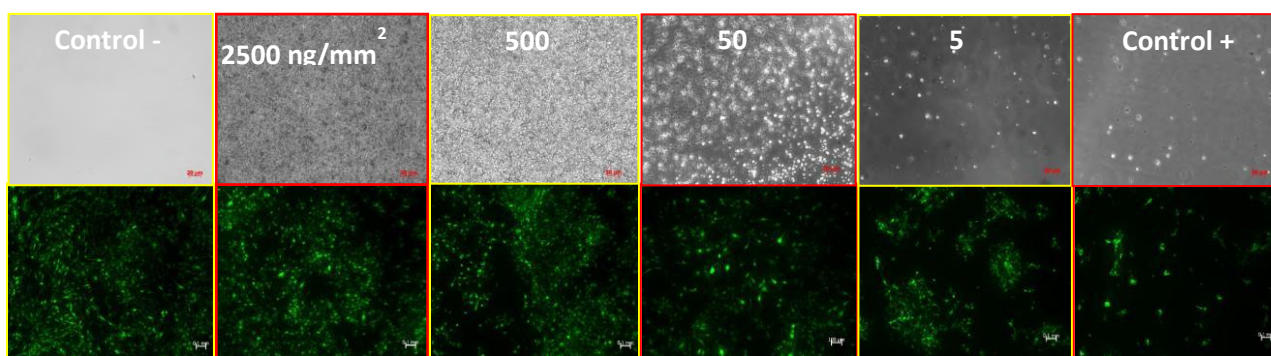


Figura 3. Imaginea celulelor endoteliale după 3 zile de cultivare pe suprafețe funcționalizate cu nanoparticule de GaN

**Numărarea celulelor.** Pentru o analiză statistică a fost necesar să se stabilească o metodă de cuantificare a celulelor după rularea experimentului. Inițial, celulele au fost fixate în 4% paraformaldehidă timp de 10 min, apoi se marchează cu DAPI (1: 7500 diluat în PBS) timp de încă 10 min. Trei imagini aleatorii au fost luate de la fiecare probă cu o cameră de înaltă rezoluție instalată pe un microscop optic (Zeiss). Utilizând software-ul DotCount v1.213 a fost calculat numărul total de celule.

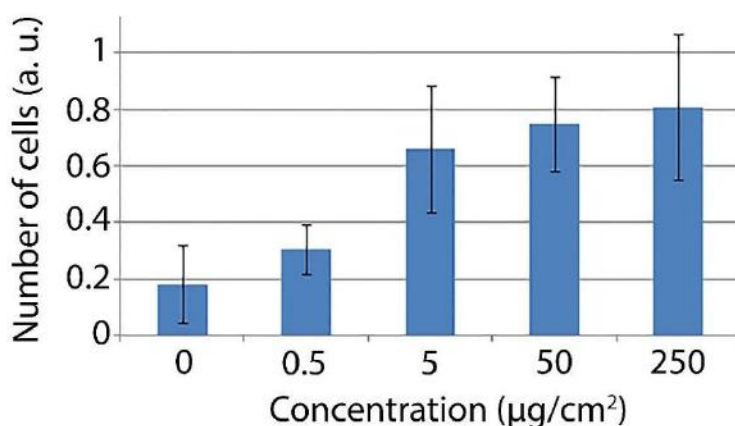


Figura 4. Numărul de celule endoteliale cultivate pe suprafețe funcționalizate cu nanoparticule de GaN

Conform măsurătorilor EDX (Energy Dispersive X-Rays analiză) de GaN NP, sa constatat că aproximativ 1% din ZnO rămâne după tratamentul termic al materialului în flux de hidrogen și nu a fost posibil să-l elimine complet chiar și la temperaturi mai ridicate pentru mai mult timp în fluxul de hidrogen. Eliberarea de Zn toxic din GaN NP poate fi exclusă. Conform analizei chimice ale mediului după celulele incubate cu nanoparticule o concentrație foarte scăzută de Zn a fost găsită în probele de nanoparticule GaN,

ce sugerează o stabilitate chimică ridicată a compusului rezultat. Cu toate acestea, activitatea celulară este influențată treptat prin creșterea concentrației de nanoparticule de GaN în mediul de cultură al celulelor vii.

### **Concluzii:**

Am observat că celulele endoteliale atașează cu ușurință pe suprafețele funcționalizate cu nanoparticule de GaN, fără a fi influențate de concentrația ridicată a nanoparticulelor pe Rema®Sil silicon, iar o cantitate foarte mică de celule au fost gasite pe suprafața de silicon curată (proba utilizată în calitate de control pozitiv) după trei zile de cultivare, în timp ce un număr tot mai mare de celule atașate s-au observat pe suprafețele funcționalizate cu nanoparticule. Numărul de celule atașate crește atunci când densitatea de nanoparticule imobilizate pe partea de sus a siliconului crește. Semne de toxicitate din partea substratului nu au fost remarcate.

**Mulțumiri:** Autorul aduce mulțumiri Serviciului de Schimb Academic German, pentru susținerea stagiului de cercetare prin bursa oferită în calitate de doctorand la Universitatea de Medicină din Hannover, Germania. O parte a lucrului a fost efectuată în cadrul proiectului instituțional 15.817.02.29A.

### **Bibliografie:**

1. Furth Mark E., Atala Anthony, Van Dyke Mark E. *Biomaterials*, vol. 28, no. 34, 5068-5073, 2007.
2. Gratton S. E. A., Ropp P. A., Pohlhaus P. D., Luft J. C., Madden V. J., Napier M. E., DeSimone J. M. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 105, 11613–11618, 2005.
3. Lisa Landgraf, Ines Müller, Peter Ernst, Miriam Schäfer, Christina Rosman, Isabel Schick, Oskar Köhler, Hartmut Oehring, Vladimir V. Breus, Thomas Basché, Carsten Sönnichsen, Wolfgang Tremel and Ingrid Hilger. Comparative evaluation of the impact on endothelial cells induced by different nanoparticle structures and functionalization. *Beilstein J. Nanotechnol*, 6, 300–312, 2015.
4. Syed K Sohaebuddin, Paul T Thevenot, David Baker, John W Eaton and Liping Tang. Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and Fibre Toxicology*, vol. 7, 22, 2010.
5. Markus Hofstetter, John Howgate, Martin Schmid, Sebastian Schoell, Matthias Sachsenhauser, Denis Adigüzel, Martin Stutzmann, Ian D. Sharp, Stefan Thalhammer. In vitro bio-functionality of gallium nitride sensors for radiation biophysics. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 424, 348–353, 2012.
6. Scott A. Jewett, Matthew S. Makowski, Benjamin Andrews, Michael J. Manfra, Albena Ivanisevic. Gallium nitride is biocompatible and non-toxic before and after functionalization with peptides. *Acta Biomaterialia*, Vol. 8, Issue 2, 728–733, 2012.
7. Dobrovolskaia, M. A.; Patri, A. K.; Zheng, J.; Clogston, J. D.; Ayub, N.; Aggarwal, P.; Neun, B. W.; Hall, J. B.; McNeil, S. E. *Nanomedicine* 2009, 5, 106–117. doi:10.1016/j.nano.2008.08.001
8. Bauer E. Sumpio, J. Timothy Riley, Alan Dardik. Cells in focus: endothelial cell. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 34 (2002) 1508–1512
9. Folkman, J.; Shing, Y. Angiogenesis. *J. Biol. Chem.* 1992, 267, 10931–10934.
10. Dorota Bartczak, Otto L. Muskens, Tilman Sanchez-Elsner, Antonios G. Kanaras and Timothy M. Millar. Manipulation of in Vitro Angiogenesis Using Peptide-Coated Gold Nanoparticles. *VOL. 7, Nr. 6* 5628–5636, 2013.