

**UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE „CAROL DAVILA”,  
BUCUREȘTI**

**ȘCOALA DOCTORALĂ**

**DOMENIUL MEDICINĂ**



**Particularitățile aplicațiilor nanotehnologice asupra protezelor fonatorii în vederea  
îmbunătățirii reabilitării vocale și a calității vieții la pacienții laringectomizați**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Conducător de doctorat:**

**PROF. UNIV. DR. ANGHEL ION**

**Student-doctorand:**

**CACIANDONE (CĂS. CACIANDONE-CRÎNGUREANU)**

**MARA**

**ANUL**

**2024**

## Cuprins

Introducere.....	1
I. Partea Generală.....	4
1. Neoplasmele laringiene.....	4
1.1. Epidemiologie.....	4
1.2. Factori de risc.....	5
1.3. Diagnostic.....	7
1.3.1. Leziunile displazice ale laringelui.....	7
1.3.2. Formele clinice ale cancerului laringian.....	8
1.4. Tratamentul neoplasmelor laringiene.....	10
1.4.1. Tratamentul non-chirurgical al cancerelor laringiene.....	11
1.4.2. Chirurgia endoscopică.....	11
1.4.3. Indicațiile laringectomiei totale.....	13
2. Protezele fonatorii.....	15
2.1. Istoricul laringectomiei și a protezelor fonatorii.....	15
2.2. Reabilitarea vocală primară și secundară.....	18
2.3. Tehnica montării protezei.....	19
2.4. Tipuri de proteze fonatorii.....	20
2.5. Avantaje și dezavantaje ale utilizării protezelor fonatorii comparative cu vocea esofagiană.....	24
2.5.1. Aspecte de avut în vedere în educarea pacientului.....	25
2.6. Gestionarea aspectelor problematice apărute în utilizarea protezelor fonatorii.....	26
3. Biofilmele. Generalități.....	29
3.1. Structura biofilmelor.....	29
3.2. Metode de evaluare a biofilmelor.....	33
3.3. Compoziția biofilmelor pe protezele fonatorii.....	35
4. Utilizarea nanotehnologiei în combaterea biofilmelor.....	38
4.1. Modificarea suprafețelor.....	39
4.2 Utilizarea nanoparticulelor (NP) .....	42
II. Partea Specială.....	46
5. Evaluarea particularităților unui lot de pacienți laringectomizați purtători de proteze fonatorii.....	46

5.1. Metodologie.....	47
5.2. Prezentarea generală a lotului.....	48
5.3. Rezultate.....	49
5.3.1. Durata de exploatare a protezelor fonatorii.....	49
5.3.2. Motivele pentru înlocuirea protezelor fonatorii.....	50
5.3.3. Analiza secrețiilor de la nivelul plăgii.....	51
5.3.4. Analiza secrețiilor de la nivelul protezelor fonatorii.....	64
5.3.5. Studiu de caz. ....	78
5.3.6. Evaluarea asocierii dintre comorbidități și frecvența de înlocuire.....	81
5.3.7. Evaluarea asocierii dintre tipurile de proteze fonatorii utilizate pentru reabilitarea fonatorie a pacienților din lotul studiat și frecvența de înlocuire.....	82
5.3.8. Evaluarea impactului asupra calității vieții pacienților.....	85
5.4. Discuții.....	87
6. Studiul 1 in vitro . Utilizarea nanoparticulelor magnetice acoperite cu polietilen-glicol și funcționalizate pentru modularea biofilmelor microbiene de pe protezele fonatorii.....	89
6.1. Introducere.....	89
6.2. Materiale și metode.....	91
6.3. Rezultate.....	96
6.4. Discuții.....	106
6.5. Concluzii.....	108
7. Studiul 2 in vitro Nanoparticule de magnetită funcționalizate cu agenți terapeutici pentru accentuarea proprietăților antimicrobiene pe protezele fonatorii.....	109
7.1. Introducere.....	109
7.2. Materiale și metode.....	111
7.3. Rezultate.....	115
7.4. Discuții.....	126
7.5. Concluzii.....	128
8. Concluzii și contribuții personale.....	130
Bibliografie.....	135
Anexe.....	151

## Introducere

Reabilitarea fonatorie a pacienților laringectomizați a reprezentat îndelung o provocare atât pentru acești pacienți, cât și pentru specialiștii din domeniul medical din toată lumea. Deși au fost dezvoltate variate metode de recuperare a funcției fonatorii, printre care utilizarea vocii esofagiene sau a laringofonului, standardul actual este reprezentat de utilizarea protezelor fonatorii. Pentru montarea acestora este necesară crearea unei comunicări între trahee și esofag, realizată printr-o manevră chirurgicală fie concomitent cu intervenția de laringectomie, fie la distanță în timp de aceasta. Protezele fonatorii sunt utilizate de peste 40 ani, interval în care au fost permanent îmbunătățite atât din punct de vedere al configurației, cât și a materialelor din care sunt compuse.

În ciuda acestor progrese, există o serie de dezavantaje asociate folosirii butoanelor fonatorii. Principala limitare este reprezentată de degradarea în timp a siliconului sau poliuretanului din care sunt compuse protezele, care devin astfel disfuncționale, fiind necesară înlocuirea frecventă a acestora.

Cea mai frecventă cauză pentru substituția protezelor fonatorii este determinată de scurgerea trans-protetică, generată de dezvoltarea biofilmului bacterian, fungic, sau mixt în special pe flanșa esofagiană a protezei, care prejudiciază buna funcționare a protezei. Structura bazată pe polimeri elastici (de obicei, silicon) a butoanelor fonatorii favorizează colonizarea rapidă a microorganismelor pe suprafața lor, care se dezvoltă în continuare la adăpostul unei matrice polimerice extracelulare autogenerată. Acest comportament le oferă protecție atât împotriva mecanismelor de apărare ale gazdei, cât și a terapiei antimicrobiene.

Obiectivele științifice ale prezentei teze sunt reprezentate de analiza frecvenței de înlocuire a protezelor fonatorii, studierea profilului microbial și polimicrobial a biofilmului care colonizează protezele înlocuite, precum și identificarea și propunerea unor metode de combatere a acestui fenomen bazate pe utilizarea nanotehnologiei. Cercetarea derulată și-a propus, de asemenea, să evalueze dacă frecvența de înlocuire a protezelor fonatorii este dependentă de factori ce țin de pacient, precum vârsta acestuia sau comorbiditățile existente, de caracteristicile protezei, cum ar fi tipul sau diametrul acesteia sau de factori ce vizează

expunerea protezelor fonatorii la un mediu biologic activ care favorizează dezvoltarea biofilmului. Specific, am testat ipoteza influenței compoziției biofilmului asupra frecvenței de schimbare a protezelor. În ceea ce privește impactul asupra calității vieții pacienților, am evaluat, prin intermediul unui chestionar cu 10 itemi, dinamica din punct de vedere emotional și funcțional a pacienților comparând răspunsurile acestora odată cu trecerea timpului.

Pentru aprofundarea studiului biofilmului cantonat la nivelul protezelor fonatorii, am analizat, utilizând tehnica microscopiei electronice de baleiaj, morfologia biofilmului de pe suprafața unei proteze fonatorii. În studiul de caz efectuat, am evidențiat caracteristicile topografice ale acumulării biofilmului pe cele patru zone principale ale protezei și anume flanșa esofagiană, corpul protezei, lumenul acesteia și flanșa traheală.

În cadrul părții generale a lucrării sunt prezentate noțiuni ce vizează patologia neoplazică laringiană și intervenția de laringectomie totală (*Capitolul 1*), istoricul metodelor de reabilitare fonatorie, cu accent pe evoluția protezelor fonatorii în acest cadru (*Capitolul 2*), structura biofilmelor, metode de evaluare și combatere a acestora (*Capitolul 3*) și nu în ultimul rând, aspecte distinctive ale progreselor din domeniul nanotehnologiei pe inhibarea colonizării biofilmelor de pe suprafața dispozitivelor medicale și, în particular, pe protezele fonatorii (*Capitolul 4*).

Pentru atingerea obiectivelor propuse, am analizat un lot de 12 pacienți care au efectuat intervenția de laringectomie totală și care au ales ca metodă de reabilitare fonatorie utilizarea protezelor fonatorii. Studiul observațional reunește parametri ce țin de momentul implantării protezei fonatorii raportat la intervenția de laringectomie, frecvența de înlocuire a protezelor, precum și analiza compoziției din punct de vedere microbiologic a secrețiilor recoltate de la nivelul protezei fonatorii și din situsul de implantare (fistula traheo-esofagiană).

Partea specială include, de asemenea, studiul unor strategii de combatere a biofilmelor de pe protezele fonatorii bazate pe aplicațiile nanotehnologiei. Deși problema ridicată este una de nișă, care explorează în profunzime această provocare asociată folosirii butoanelor fonatorii, literatura de specialitate furnizează o cantitate apreciabilă de informații pe subiect. Metodele de împiedicare a dezvoltării biofilmului cuprind trei paliere de abordare: tratamentul profilactic al siliconului de pe protezele vocale (prin administrarea de probiotice, de exemplu), înțelegerea temeinică a comportamentului adaptativ al biofilmelor la condițiile

laringofaringiene și modificarea suprafețelor din punct de vedere fizico-chimic, prin aplicarea anumitor compuși cum ar fi acoperirea cu diferite metale sau chiar nanomateriale.

Strategia de modificare a suprafețelor a reprezentat un punct de interes în elaborarea lucrării și, în acest scop, am studiat, identificat și evaluat eficiența proprietăților anti-biofilm a unor nanocompuși specifici.

Primul studiu prezintă, în cadrul capitolului 6, fabricarea unor învelișuri bazate pe nanostructuri de magnetită, polietilenglicol și o moleculă biologic activă (polimixină B), care, prin aplicarea pe suprafața protezelor vocale au generat inhibarea biofilmelor de *Staphylococcus aureus*, respectiv *Pseudomonas aeruginosa*. Nanoparticulele de magnetită au fost sintetizate și funcționalizate prin tehnica co-precipitării, urmată de depunerea acestora sub formă de învelișuri subțiri folosind tehnica MAPLE. Nanostructurile și învelișurile obținute au fost caracterizate prin tehnici precum difracția cu raze X (XRD), analiza termogravimetrică și calorimetrie cu scanare diferențială (TGA-DSC), microscopia electronică de transmisie cu arie selectată de difracție (TEM-SAED), spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), microscopia în infraroșu (IRM), microscopia electronică de scanare (SEM), dar și prin testare biologică, compusă din teste de viabilitate celulară și teste anti-biofilm. Modificarea suprafeței protezei fonatorii cu nanocompusul  $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{PEG/PM}$  a condus la reducerea numărului de UFC până la patru ordine de mărime în cazul tulpinilor de *S. aureus*, respectiv până la de cinci ori în cazul tulpinilor de *P. aeruginosa*.

Cel de-al doilea studiu, prezentat în capitolul 7, a explorat funcționalizarea unor nanostructuri magnetice cu streptomycină, respectiv neomicină și încorporarea acestora în structuri sferice pe bază de polimeri. Testele de viabilitate celulară și cele antimicrobiene au subliniat biocompatibilitatea acestor compuși cu celulele umane diploide și au evidențiat efectul lor antimicrobian pe bacterii oportuniste Gram-negative (*P. aeruginosa*) și Gram-pozitive (*S. aureus*).

Fiind situată la intersecția dintre otorinolaringologie și microbiologie tema este una de interes atât pentru practica clinică, cât și pentru cercetarea științifică fiind fundament pentru cercetări suplimentare, cu extensie către domenii conexe medicinei, precum bioingineria medicală.

## **5. Evaluarea particularităților unui lot de pacienți laringectomizați purtători de proteze fonatorii**

Scopul studiului observațional descriptiv retrospectiv derulat a reunit identificarea principalului motiv pentru înlocuirea protezelor fonatorii și evaluarea compoziției biofilmului dezvoltat la nivelul situsului de implantare a protezei, în fistula traheo-esofagiană, precum și de pe proteza fonatorie. Elementul central al acestei cercetări a fost evaluarea microbiologică a probelor recoltate de pe protezele disfuncționale, după îndepărtarea acestora, precum și din fistula traheo-esofagiană. Probele recoltate din locația din urmă vor fi denumite în continuare lucrării drept „secreție plagă”. Probele au fost testate pentru a identifica agenții patogeni, de tip bacterian sau fungic care colonizează locațiile menționate, și pentru a furniza antibiograma, respectiv antifungigrama, iar rezultatele au fost comparate cu cele din literatura de specialitate.

Criteriile de includere a pacienților în studiu au fost următoarele:

- pacienții internați în cadrul Departamentului ORL al Spitalului Universitar de Urgență Militar Central "Dr. Carol Davila", în perioada octombrie 2018- mai 2023, cu diagnosticul de neoplasm faringo-laringian operat (laringectomie totală);
- lipsa contraindicațiilor pentru intervenția chirurgicală/anestezie;
- pacienții au semnat consimțământul informat conform Declarației de la Helsinki.

În urma aplicării acestor criterii, am inclus 12 pacienți cu diagnosticul de neoplasm avansat de laringe, care au suferit intervenția de laringectomie totală. Toți pacienții din grupul selectat au optat pentru montarea protezei fonatorii ca modalitate de reabilitare vocală post-laringectomie totală. Astfel, s-au efectuat în total 54 de intervenții de montare a protezei fonatorii sau de înlocuire a protezei uzate cu un dispozitiv fonator nou, acestea fiind realizate în perioada octombrie 2018 – mai 2023. La 5 dintre acești pacienți protezele fonatorii s-au montat pentru prima dată în timpul derulării studiului (41.66%). Corespunzător, în cazul celorlalți 7 pacienți intervențiile au fost reprezentate de îndepărtarea protezelor uzate și înlocuirea acestora cu un dispozitiv fonator nou, adică reinsertie dispozitiv fonator, efectuate la intervale de timp variabile, dependente de factori subiectivi, precum complianța pacientului, cât mai ales de factori obiectivi cum ar fi degradarea funcțională a dispozitivului fonator, precum și apariția complicațiilor.

Este de menționat faptul că toate protezele fonatorii au fost montate secundar intervenției de laringectomie în planul de reabilitare fonatorie, la un interval de timp de

aproximativ un an post-intervenție (în cele mai multe cazuri fiind durată pentru completarea radioterapiei).

Parametrii studiați la lotul de pacienți selectați :

- Mijloacele terapeutice utilizate la pacienți și evaluarea impactului asupra calității vieții prin asigurarea unei funcționalități optime;
- Gradul de reabilitare fonatorie;
- Dezvoltarea infecțiilor locale sau pe proteză -fungice, bacteriene, mixte;
- Proiectarea, sinteza și evaluarea proprietăților antiaderente microbiene a nanostructurilor testate;
- Respingerea dispozitivului protetic;
- Patologie inflamatorie și infecțioasă la nivel bronho-pulmonar.

Parametrii studiați sunt completați de date generale precum vârstă, sex, mediul de proveniență, forma histopatologică, diagnosticul principal la externare și diagnostice asociate (care sporesc complexitatea cazuisticii), durata de spitalizare și decontul/pacient, precum și analize specifice.

Ipoteza nulă este că durata de utilizare a protezelor fonatorii nu este influențată de compoziția biofilmului care le colonizează, acesta fiind analizat indirect prin intermediul secrețiilor recoltate și, în cadrul unui studiu de caz, biofilmul a fost vizualizat și caracterizat în detaliu folosind tehnica microscopiei electronice de baleiaj. În acest scop, am separat intervalele de înlocuire în patru categorii: sub 4 luni, 4-6 luni, 7-11 luni, peste 12 luni și am examinat particularitățile fiecărui grup referitoare la compoziția coloniilor de microorganisme de pe proteze și din plagă, precum și alți parametri vizând vârsta, comorbiditățile, tipul protezei fonatorii folosite.

## **5.2. Prezentarea generală a lotului**

Dintre pacienți, 91.67% au fost bărbați (n=11), respectiv 8.33% femei (n=1), raportul dintre bărbați și femei fiind de 11:1.

La momentul diagnosticării cu neoplasm avansat de laringe, pacienții aveau vârste cuprinse între 46 și 67 ani, cu o vârstă medie de 59.25 ani (deviația standard 6.25; CI: [55.28; 63.22]) și o vârstă mediană de 61.50 ani. La momentul efectuării intervenției de montare/înlocuire proteză, pacienții aveau vârste cuprinse între 46 și 73 ani, cu o vârstă medie de 63.81 ani (deviația standard 7.10; CI: [61.88; 65.75]) și o vârstă mediană de 64 ani.



### **5.3. Rezultate**

#### **5.3.1. Durata de exploatare a protezelor fonatorii**

Înlocuirea protezei fonatorii s-a efectuat între 1 și 45 luni de la data montării acesteia, în medie după 8.07 luni (deviația standard 6.38; CI: [6.10; 10.04]), mediana înlocuirilor fiind la 6 luni.

În aproape jumătate din cazuri înlocuirea s-a efectuat între 4 și 6 luni, iar în mai mult de o treime din cazuri între 7 și 12 luni. Astfel, înlocuirea dispozitivului s-a realizat:

- În mai puțin de 4 luni de la montare: în 4.69% din cazuri (n=2),
- Între 4 – 6 luni: în 48.84% din cazuri (n=21),
- Între 7 – 12 luni: în 37.21% din cazuri (n=16),
- După mai mult de 12 luni: în 9.30% din cazuri (n=4).

În continuare, am evaluat dacă există o asociere semnificativă statistic între vârsta pacienților și frecvența de înlocuire separată în cele patru grupuri menționate, răspunsul fiind că nu se poate stabili o astfel de asociere (valoarea  $p=0.244$ ).

#### **5.3.2. Motivele pentru înlocuirea protezelor fonatorii**

În majoritatea cazurilor analizate, cauza care a condus la înlocuirea protezei fonatorii a fost reprezentată de scurgerea transprotetică, datorată fie acumulării de biofilm pe flanșele protezei fonatorii, fie din cauza blocării lumenului acesteia. Obstrucția lumenului protezei este principalul factor care a determinat deteriorarea funcției butonului fonator în 85% din cazuri (46 dintre protezele înlocuite). În 4 situații, cauza a fost secundară modificărilor dimensiunilor fistulei traheo-esofagiene, așadar 7,5% din cazuri, pe când în alte 4 situații scurgerile au fost peri-protetice. Nu au fost înregistrate complicații infecțioase pulmonare sau sistemice.

#### **Analiza microbiologică a secrețiilor din fistula traheo-esofagiană (plagă) și de pe protezele fonatorii**

În urma analizei microbiologice din secrețiile de la nivelul plăgii, s-a confirmat colonizarea bacteriană în 66.67% din cazurile analizate (n=24). Secrețiile au confirmat colonizarea plăgii preponderent cu o singură specie de bacterie (în 75% din cazuri, n=18), urmată de prezența simultană a două specii bacteriene (în 20.83% din cazuri, n=5), și, mai rar,

cu trei specii de bacterii (în 4.17% din cazuri, n=1). Nu s-a remarcat o asociere semnificativă statistic între intervalul de înlocuire a protezei și prezența bacteriilor ( $p=0.394$ ).

Corespunzător, analiza microbiologică a secrețiilor de la nivelul protezelor fonatorii, a confirmat prezența bacteriilor în 52.78% din cazurile analizate (n=19). Secrețiile au fost populate preponderent cu o singură specie bacteriană (în 84.21% din cazuri, n=16), cu două specii de bacterii concomitent (în 10.53% din cazuri, n=2), și, mai rar, cu trei specii de bacterii (în 5.26% din cazuri, n=1).

În ceea ce privește colonizarea fungică a plăgii, aceasta a fost descoperită în 69.44% din cazurile analizate (n=25). În majoritatea cazurilor, au fost identificate colonii dintr-o singură specie (în 76% din cazuri, n=19), însă au fost întâlnite relativ frecvent și asocieri de două specii de fungi (în 24% din cazuri, n=6). Nu s-a remarcat o asociere semnificativă statistic între vârsta pacientului și prezența fungilor în secrețiile de la nivelul plăgii ( $p=0.559$ ).

Similar, evaluarea colonizării fungice a suprafeței protezelor a identificat prezența fungilor în 77.78% din cazurile analizate (n=28). În majoritatea cazurilor secrețiile au fost populate cu o singură specie de fungi (în 78.57% din cazuri, n=22), însă au fost întâlnite relativ frecvent și asocieri de două specii de fungi (în 21.43% din cazuri, n=6). Nu s-a remarcat o asociere semnificativă statistic între intervalul de înlocuire a protezei și prezența fungilor ( $p=0.313$ ).

În secrețiile recoltate de pe protezele fonatorii au fost detectate 7 specii bacteriene și 5 specii fungice, acești agenți patogeni regăsindu-se atât sub forma unor colonii tip monospecie, cât și grupate în asocieri polimicrobiene. Corespunzător, în plagă au fost identificate 10 specii bacteriene și de asemenea 5 specii fungice, care au colonizat traiectul fistulei fie sub formă de culturi mono- sau poli-specie bacteriană, respectiv fungică, fie prin asociere în colonizare mixtă polimicrobiană.

### **5.3.3. Analiza secrețiilor recoltate din fistula traheo-esofagiană**

În funcție de tipul de cultură identificată la analiza secrețiilor recoltate de la nivelul plăgii a fost obținută următoarea distribuție în cadrul celor 4 intervale stabilite:

- Înlocuire după mai puțin de 4 luni: plăgile au prezentat în 100% din cazuri culturi bacteriene (n=2),

- Înlocuire după 4-6 luni: 31.58% din cazuri au prezentat culturi exclusiv bacteriene (n=6), 26.32% culturi exclusiv fungice (n=5), 36.84% culturi mixte bacteriene + fungice (n=7), respectiv 5.26% nu au prezentat creștere microbiană (n=1);
- Înlocuire după 7-12 luni: 15.38% din cazuri au prezentat culturi bacteriene (n=2), 46.15% culturi fungice (n=6), respectiv 38.46% culturi mixte bacteriene + fungice (n=5);
- Înlocuire după mai mult de 12 luni: toate cazurile (100%) au prezentat culturi mixte bacteriene + fungice (n=2).

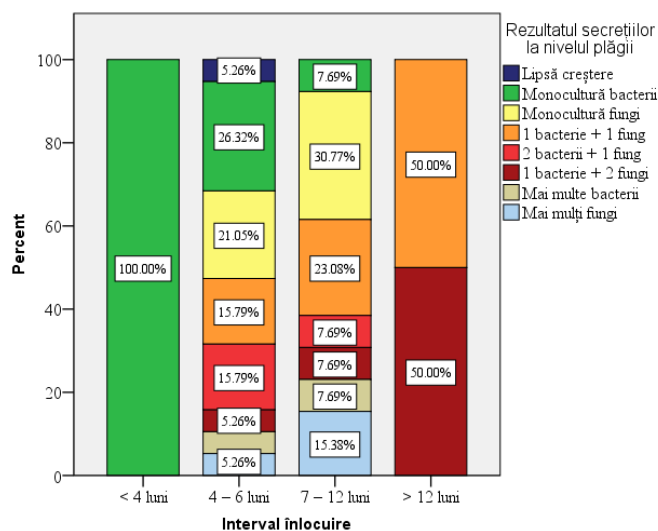
În continuare, am aprofundat modalitatea de asociere a speciilor de microorganisme în secrețiile din plagă, distribuite în funcție de intervalul de înlocuire a protezei (Fig.5.1):

- Înlocuire după mai puțin de 4 luni: toate secrețiile (100%) au prezentat monocultură bacteriană (n=2);

- Înlocuire după 4-6 luni: 26.32% din cazuri au prezentat monocultură bacteriană (n=5), 21.05% monocultură fungi (n=4), 15.79% culturi mixte, compuse dintr-o specie bacteriană și una fungică (n=3), 15.79% din două specii bacteriene și una fungică (n=3), 5.26% culturi de o specie bacteriană și două fungice (n=1), 5.26% culturi de mai multe bacterii (n=1), 5.26% culturi de mai mulți fungi (n=1), respectiv 5.26% nu au dezvoltat culturi bacteriene/fungice (n=1);

- Înlocuire după 7-12 luni: 7.69% din cazuri au prezentat monocultură bacteriană (n=1), 30.77% monocultură fungi (n=4), 23.08% culturi mixte, cu o specie bacteriană și una fungică (n=3), 7.69% cu două specii bacteriene și una fungică (n=1), 7.69% cu o specie bacteriană și două fungice (n=1), 7.69% culturi de mai mult de două specii bacteriene (n=1), respectiv 15.38% culturi de mai mult de două specii de fungi (n=2);

- Înlocuire după mai mult de 12 luni: 50% din cazuri au prezentat culturi formate dintr-o specie bacteriană și una fungică (n=1), respectiv 50% culturi dintr-o specie bacteriană și două fungice (n=1). Nu s-a remarcat o asociere semnificativă statistic între rezultatul secrețiilor la nivelul plăgii și intervalul de înlocuire a protezei. (p=0.635)



**Fig. 5.1** Distribuția cazurilor în funcție de rezultatul secrețiilor la nivelul plăgii și intervalul de înlocuire a protezei

### Culturi microbiene și polimicrobiene din plagă

Referitor la colonizarea bacteriană a plăgii, o treime dintre secrețiile analizate din punct de vedere microbiologic au confirmat prezența *Pseudomonas aeruginosa* (în mai mult de 3 din 10 cazuri), însă a fost întâlnit frecvent și *Staphylococcus aureus* (în 1 din 6 cazuri) sau *Klebsiella Pneumoniae* (în aproximativ 1 din 10 cazuri).

În ceea ce privește colonizarea fungică a plăgii, s-a confirmat prezența *Candida tropicalis* la mai mult de un sfert din cazuri (în 1 din 4 cazuri), însă au fost întâlnite frecvent și *Candida krusei* (în mai mult de 1 din 5 cazuri), *Candida albicans*, *Candida glabrata*, respectiv alte specii de *Candida non-albicans* (fiecare dintre acestea în mai mult de 1 din 10 cazuri).

Pentru a clarifica eventualitatea unei asocieri semnificative între compoziția secrețiilor de la nivelul plăgii și frecvența de înlocuire a butonului fonator, am aprofundat studiul distribuției microorganismelor identificate în intervalele de exploatare ale protezelor, fără a obține însă asocieri semnificative statistic între prezența specifică a tulpinilor de bacterii, respectiv fungi și intervalul de înlocuire al protezelor.

#### 5.3.4. Analiza secrețiilor recoltate de pe protezele fonatorii

Similar, am evaluat natura secrețiilor de pe protezele fonatorii în funcție de agentul patogen, separat pentru cele 4 intervale, precum și maniera de asociere a speciilor identificate

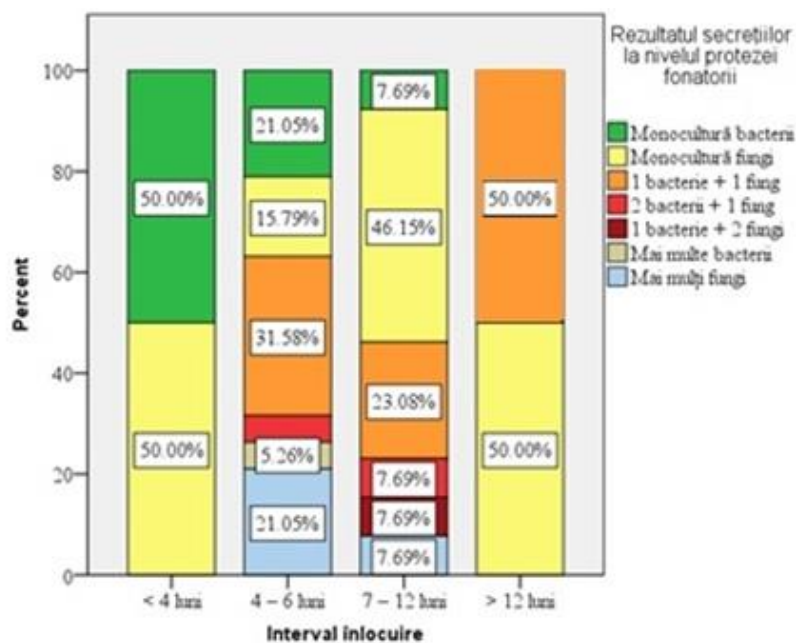
împărțită în monoculturi bacteriene, respectiv fungice sau diferite asocieri între speciile bacteriene și fungice, raportată la intervalele de înlocuire.

În ceea ce privește natura biofilmului de pe protezele fonatorii am obținut următoarele rezultate:

- Înlocuire după mai puțin de 4 luni: protezele au prezentat în 50% din cazuri culturi bacteriene (n=2), respectiv în 50% din cazuri culturi fungice (n=1);
- Înlocuire după 4-6 luni: 26.32% din cazuri au prezentat culturi exclusiv bacteriene (n=5), 36.84% culturi exclusiv fungice (n=7), respectiv 36.84% culturi mixte bacteriene +fungice (n=7);
- Înlocuire după 7-12 luni: 7.69% din cazuri au prezentat culturi bacteriene (n=1), 53.85% culturi fungice (n=7), respectiv 38.46% culturi mixte bacteriene + fungice (n=5);
- Înlocuire după mai mult de 12 luni: protezele (n=2) au prezentat o cultură exclusiv fungică, respectiv una mixtă, bacteriană și fungică

În funcție de agentul patogen identificat în culturile microbiene sau polimicrobiene, secrețiile de la nivelul protezelor fonatorii au fost identificate următoarele asocieri, raportat la intervalele de înlocuire (Fig.5.2):

- Înlocuire după mai puțin de 4 luni: 50% dintre secreții au prezentat monocultură bacteriană (n=1), respectiv 50% monocultură fungică (n=1);
- Înlocuire după 4-6 luni: 21.05% din cazuri au prezentat monocultură bacteriană (n=4), 15.79% monocultură fungică (n=3), 31.58% culturi mixte cu o specie bacteriană + o specie fungică (n=6), 5.26% culturi mixte polimicrobiene cu două specii bacteriene + o specie fungică (n=1), 5.26% culturi de mai multe bacterii (n=1), respectiv 21.05% culturi de mai mulți fungi (n=4);
- Înlocuire după 7-12 luni: 7.69% din cazuri au prezentat monocultură bacteriană (n=1), 46.15% monocultură fungică (n=6), 23.08% culturi mixte formate dintr-o specie bacteriană și una fungică (n=3), 7.69% culturi de două specii bacteriene și una fungică (n=1), 7.69% culturi de 1B+2F (n=1), respectiv 7.69% culturi de mai multe fungi (n=1);
- Înlocuire după mai mult de 12 luni: 50% din cazuri au prezentat monocultură fungi (n=1), respectiv 50% au prezentat cultură mixtă compusă dintr-o specie bacteriană și una fungică (n=1). Nu s-a remarcat o asociere semnificativă statistic între rezultatul secrețiilor la nivelul protezei și intervalul de înlocuire a acesteia. (p=0.130)



**Fig. 5.2** Distribuția cazurilor în funcție de rezultatul secrețiilor de la nivelul protezei raportat la intervalul de înlocuire a acesteia

### Culturi microbiene și polimicrobiene de pe protezele fonatorii

În ceea ce privește compoziția bacteriană a secrețiilor recoltate de la nivelul protezelor fonatorii, cele mai frecvent identificate specii bacteriene au fost *Pseudomonas aeruginosa*, urmată de *Staphylococcus aureus* și *Klebsiella pneumoniae*. În privința compoziției fungice a secrețiilor de la nivelul plăgii, s-a depistat *Candida tropicalis* la aproape o treime din cazuri, însă au fost întâlnite frecvent și *Candida krusei* (în mai mult de 1 din 4 cazuri), *Candida albicans*, *Candida glabrata*, respectiv alte specii de *Candida non-albicans* (fiecare dintre acestea în mai mult de 1 din 10 cazuri).

### Profiluri microbiene și polimicrobiene ale secrețiilor recoltate

Studiul rezultatelor obținute a fost aprofundat prin evaluarea modului de organizare a celor mai frecvent identificate microorganisme sub formă de monoculturi sau în asocieri cu alte tulpini (polimicrobiene) sau clase de microorganisme (mixte), atât pentru secrețiile din fistulă, cât mai ales pentru cele de pe protezele fonatorii.

A fost aplicat un test Chi-pătrat pentru a testa corelarea dintre natura biofilmului de la nivelul protezei și intervalul de înlocuire a acesteia. Există o asociere semnificativă statistic

între natura biofilmului și frecvența înlocuirii protezei,  $\chi^2=21.773$ ,  $p=0.010$ , iar coeficienții Phi (0.778) și V al lui Cramer (0.449) relevă că legătura dintre cele două variabile este una de intensitate puternică ( $p=0.010$ ).

Acest test statistic, împreună cu reprezentarea grafică, ne indică faptul că există o puternică tendință de asociere între colonizarea microbiană și intervalele mai scurte de înlocuire a protezelor fonatorii. Se remarcă de asemenea faptul că natura biofilmului este particulară fiecărui interval, cu predominanța fungică pe măsură ce intervalul crește.

### **5.3.7. Asocierea dintre tipul protezei fonatorii și durata de exploatare**

Un alt aspect pe care l-am evaluat este reprezentat de asocierea dintre tipul protezei fonatorii și durata de exploatare. A fost aplicat un test Chi-pătrat pentru a testa corelarea dintre tipul de proteză folosită și intervalul de înlocuire a acesteia. Există o asociere semnificativă statistic între tipul de proteză și frecvența înlocuirii protezei,  $\chi^2=17.775$ ,  $p=0.007$ , iar coeficienții Phi (0.684) și V al lui Cramer (0.484) relevă că legătura dintre cele două variabile este una de intensitate puternică ( $p=0.007$ ).

Durata medie de folosire a protezelor Provox Vega a fost de 6.08 luni, cu o mediană a înlocuirilor la 6 luni, pe când, în cazul protezelor Blom Singer Classic, durata de exploatare a fost de 12.50 luni, cu o mediană a înlocuirilor la 9.50 luni. În ce privește protezele Provox 2, durata medie de utilizare a fost de 10.40 luni, cu o mediană a înlocuirilor la 10 luni.

### **5.3.8. Evaluarea impactului asupra calității vieții pacienților**

În vederea aprecierii influenței utilizării protezei fonatorii asupra calității vieții pacienților laringectomizați, 9 din cei 12 pacienți au răspuns itemilor chestionarului specific VR-QOL (*Voice Related-Quality of Life*). Chestionarul a inclus 10 întrebări referitoare la dificultățile cu care s-au confruntat pacienții, punând accent pe schimbările din sfera psihosocială. Itemii 1, 2, 3, 6, 7 și 9 corespund domeniului fizic-funcțional, pe când itemii 4, 5, 8 și 10 explorează zona socio-emoțională. Răspunsurile au fost măsurate pe o scală Likert în 5 puncte, unde 1 a însemnat că pacientului nu i se aplică deloc situația expusă în întrebare, iar 5 că i se aplică foarte mult. Chestionarul a fost aplicat la prima și la ultima intervenție de când au fost înrolați în studiu, momente denumite în continuare  $T_0$  și  $T_1$ .

S-a remarcat o reducere semnificativă a scorului obținut între cele două momente ale aplicării chestionarului, impactul asupra calității vieții pacienților fiind mult mai mare imediat

după montarea protezei decât ulterior, când aceștia și-au adaptat stilul de viață integrând noul statut, cel de purtător de proteză fonatorie în activitățile cotidiene

Aplicarea testului Wilcoxon signed-rank a indicat că pacienții au înregistrat o scădere semnificativă statistic a scorului obținut la finalul studiului (momentul  $T_1$ ) comparativ cu scorul obținut la început (momentul  $T_0$ ) ( $Z = -2.552$ ,  $p = 0.011$ ). Scăderea scorului indică faptul că, odată cu trecerea timpului, pacienții nu se mai consideră atât de afectați (de dificultățile expuse în chestionar) precum erau la început. De asemenea, calcularea unui coeficient de corelare Spearman a indicat că există o puternică tendință ca această scădere a scorului să fie tot mai mare pe măsură ce trece mai mult timp ( $r_s = 0.714$ ,  $p = 0.031$ ).



## **6. Studiul 1 *in vitro* Utilizarea nanoparticulelor magnetice acoperite cu polietilen-glicol și funcționalizate pentru modularea biofilmelor microbiene de pe protezele fonatorii**

### **6.1. Introducere**

În contextul dezvoltării rezistenței microorganismelor la agenții antimicrobieni convenționali se conturează necesitatea de a crea alternative îmbunătățite pentru combaterea biofilmelor recalcitrante la tratament. O opțiune de interes se bazează pe exploatarea avantajelor marcate de progresele nanotehnologiei și folosirea acestora pentru dezvoltarea unor suprafețe bioactive inovatoare cu proprietăți antibiofilm. Mai exact, acoperirea dispozitivelor medicale și a implantelor cu un strat compus dintr-o nanostructură cu proprietăți antimicrobiene reprezintă o variantă terapeutică avantajoasă.

Un număr substanțial de studii derulate cu punctul de plecare de la aceste considerente au condus către nanoparticulele magnetice, în general și la cele de magnetită, în particular. Aceste nanoparticule magnetice de oxid de fier prezintă o serie de proprietăți favorabile, printre care: disponibilitate, versatilitate, costuri scăzute, superparamagnetism, câmp de saturație ridicat, rezistență electrică și termică ridicate, biocompatibilitate, sunt ecologice și biodegradabile, fără toxicitate pentru organismul uman, cu potențial antimicrobian intrinsec, și, nu în ultimul rând, posibilitatea de funcționalizare.

Totuși, nanoparticulele de magnetită au un dezavantaj dat de instabilitatea în aer, după o expunere prelungită prezentând tendința de oxidare la maghemită. Mai mult, nanoparticulele de magnetită netratate nu pot forma fluide stabile și au predispoziția de aglomerare după producere. Pentru depășirea acestui dezavantaj, nanoparticulele de magnetită necesare în aplicațiile biomedicale sunt în general protejate de învelișuri compuse din diferite materiale biocompatibile, cum ar fi polizaharide naturale, materiale sintetice inerte și acizi organici cu structuri variate.

Cu scopul identificării unor compuși cu proprietăți combative pe biofilmele bacteriene de pe protezele fonatorii, am derulat un studiu în urma căruia prezentăm obținerea unui material compus din magnetită, polietilen-glicol (PEG) și polimixină B ce are aplicații terapeutice antimicrobiene. În mod particular, redăm sinteza și caracterizarea nanoparticulelor de magnetită funcționalizată și fabricarea învelișurilor subțiri bazate pe magnetită. Aceste învelișuri inovatoare de nanostructuri au fost caracterizate din punct de vedere compozițional,

morfologic și biologic folosind diferite tehnici fizico-chimice precum difracția cu raze X (XRD), analiza termogravimetrică și calorimetrie cu scanare diferențială (TGA-DSC), microscopia electronică de transmisie cu arie selectată de difracție (TEM-SAED), spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), microscopia în infraroșu (IRM), microscopia electronică de scanare (SEM), dar și biologice, prin aplicarea testelor de viabilitate celulară și a testelor anti-biofilm.

## **6.2. Material și metode**

### **6.2.1. Prepararea nanoparticulelor funcționalizate și a învelișurilor pe bază de polimeri**

Nanoparticulele de magnetită funcționalizate prin acoperire cu PEG au fost sintetizate printr-o metodă de co-precipitare, care a implicat prepararea prealabilă a două soluții, una pe bază de precursori de fier și cea de-a doua conținând polietilen glicol, hidroxid de amoniu și apă deionizată. În urma procesului de sinteză a rezultat o cantitate de 0.9 g de magnetită, care a fost apoi separată în două părți: una asupra căreia nu s-a intervenit, pe când ce-a de-a doua a fost amestecată mecanic cu 0,05 g polimixină într-un mL de cloroform.

Învelișurile formate la o fluență laser de  $400 \text{ mJ/cm}^2$  au fost depuse folosind tehnica MAPLE pe probe cu dimensiunea de  $1 \times 1 \text{ cm}$  de sticlă, pe o secțiune printr-o proteză fonatorie și substrat de siliciu (1 0 0) dublu polișat. Acestea au fost curățate conform unei proceduri interne a laboratorului

### **6.2.5. Evaluarea antibiofilm la 24 h și 48 h**

Proprietățile antibiofilm au fost testate prin expunerea structurilor sintetizate la tulpinile bacteriene de *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa*.

Pentru a testa efectul suprafețelor acoperite de nanostructuri pe dezvoltarea de biofilm, probele au fost sterilizate prin expunerea timp de 20 min pe fiecare parte la radiații UV. În continuare, fiecare fragment de material astfel sterilizat a fost plasat, individual, pe o placă de cultură cu 6 godeuri, urmată de adăugarea a 2 mL de substrat nutritiv și, consecutiv, de inocularea a 50  $\mu\text{L}$  de suspensie bacteriană corespunzătoare unei densități McFarland de 0,5 (aproximativ  $1,5 \times 10^8$  (unități formatoare de colonii)/mL). Plăcile preparate în maniera descrisă au fost lăsate la incubat timp de 24 h la temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . Ulterior, materialele au fost spălate cu soluție tampon fosfat salin (TFS), iar mediul de cultură a fost înlocuit cu unul proaspăt pentru a asigura dezvoltarea biofilmului. Plăcile au fost incubate pentru 24 h,

respectiv 48 h, după care speciemenle au fost din nou spălate cu soluție TFS și plasate în eprubete conținând 1 mL de TFS. Eprubetele au fost viguros amestecate timp de 30 de secunde pentru a detașa celulele de biofilm. Suspensiile celulare obținute au fost diluate și însămânțate pe plăci cu mediu de cultură solid pentru a obține și cuantifica numărul de unități formatoare de colonii/ mL (UFC/mL).

#### **6.2.6. Evaluarea biocompatibilității**

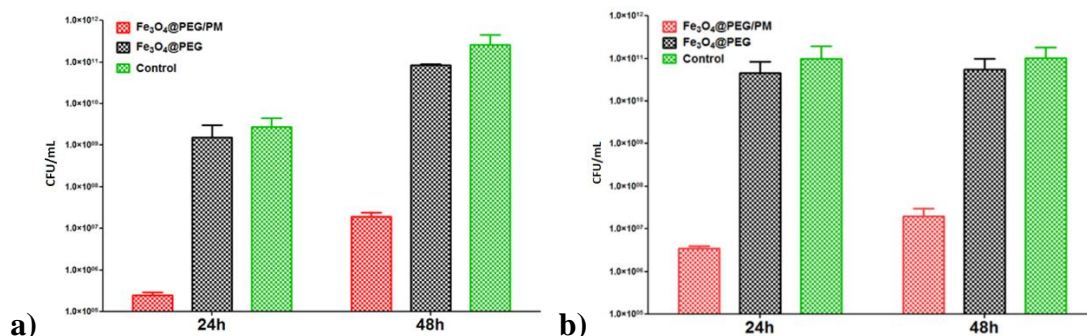
Proprietatea de biocompatibilitate a materialelor sintetizate a fost studiată prin testare pe osteoblaști murinici. Probele au fost sterilizate prin expunere UV timp de 20 de minute pe fiecare parte și plasate în plăci de cultură cu 6 godeuri, urmată de adăugarea celulelor la o densitate de  $4 \times 10^4$  celule/cm<sup>2</sup>. Pentru vizualizarea celulelor, după 24 de ore de incubație, s-a utilizat un microscop inversat cu fază de contrast tip Olympus.

Testul MTT a fost aplicat pentru evaluarea viabilității celulare în prezența materialelor testate. Cercetarea biocompatibilității se bazează pe principiul reducerii sării (MTT) de culoare galbenă de către celulele metabolic active, la culoarea albastru închis, specifică pentru cristalele de formazan. Coeficientul de reducere este proporțional cu numărul celulelor viabile, fiind, din acest motiv, un indicator pentru integritatea celulară. Măsurătorile de spectrofotometrie ale absorbției au fost făcute la o lungime de undă de 595 nm, folosind un cititor de plăci Appliskan Thermo Scientific.

Concentrația de oxid nitric (NO) eliberat de către celule în mediul de cultură a fost determinat prin metoda Griess.

### **6.3. Rezultate**

Examinarea proprietăților anti-aderente ale protezelor fonatorii modificate prin folosirea nanoparticulelor împotriva biofilmului de *Staphylococcus aureus* a condus la rezultate favorabile. După un interval de 24 h, respectiv 48h, probele de control de culturi celulare prezintă un grad ridicat de UFC/mL și anume  $1.3 \times 10^9$  UFC/mL, respectiv  $1.4 \times 10^{11}$  UFC/mL. Comparativ, modificarea utilizând nanostructuri a suprafețelor protezelor fonatorii a condus la o reducere a numărului de UFC/mL până la patru ordine de mărime. Concret, în cazul învelișurilor de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEG/PM s-a înregistrat o valoare de  $1.4 \times 10^5$  UFC/mL în cazul biofilmelor la 24 h de incubație și, corespunzător, de  $1.1 \times 10^7$  UFC/mL pentru biofilmele după 48 h. Rezultatele sunt prezentate sintetic în Fig. 6.a). Aceste rezultate susțin caracterul anti-aderent pronunțat pe dezvoltarea biofilmelor de *Staphylococcus aureus*.



**Fig. 6.** Evaluarea dezvoltării biofilmului de a) *Staphylococcus aureus*, respectiv b) *Pseudomonas aeruginosa* la 24 h și 48 h de incubație, în prezența, respectiv absența învelișurilor subțiri bazate pe PEG și funcționalizate cu antibiotic.

În cazul testelor pe biofilmele de *P. aeruginosa* valorile control ale UFC/mL au fost similare la 24 h, respectiv 48 h, situându-se în jurul valorii de aproximativ  $10^{11}$  UFC/mL. Aceste rezultate reflectă afinitatea crescută a tulpinilor de *P. aeruginosa* pentru colonizarea suprafețelor dispozitivelor medicale, motiv pentru care acest patogen oportunist se asociază cu numeroase infecții nosocomiale, ce ridică dificultăți în ceea ce privește tratamentul. Mai mult, comparativ cu analizele derulate pe tulpinile de *Staphylococcus aureus*, se remarcă un efect inhibitor mai scăzut al ambilor nanocompuși. Concret, în cazul Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEG, valorile UFC/mL au fost reduse cu un ordin de mărime după 24 h, cuantificând  $1.7 \times 10^{10}$  UFC/mL, respectiv  $1.8 \times 10^{10}$  UFC/mL după 48 h. Pe de altă parte, în ceea ce privește învelișurile de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEG/IPM s-a remarcat un efect inhibitor mai pronunțat, acest nanocompus reușind să reducă numărul de UFC de *P. aeruginosa* cu până la cinci ordine de mărime, ajungând la valoarea de  $1.5 \times 10^6$  UFC/mL după 24 h de incubare a biofilmului și la  $1.2 \times 10^7$  UFC/mL, la 48 h. Rezultatele acestei evaluări sunt prezentate sintetic în Fig. 6.b).

La nivelul probei conținând Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEG nu s-au determinat modificări semnificative ale numărului de celule viabile și ale nivelului de oxid nitric comparativ cu probele control, ceea ce confirmă biocompatibilitatea compusului. Similar, proba pe bază de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@PEG/IPM a manifestat o biocompatibilitate satisfăcătoare. Poate fi apreciat că toxicitatea polimixinei a fost redusă în prezența polimerului PEG folosit pentru funcționalizarea nanoparticulelor de magnetită.

## **Capitolul 7 Nanoparticule de magnetită funcționalizate cu agenți terapeutici (streptomicină/neomicină) pentru accentuarea proprietăților antimicrobiene pe protezele fonatorii**

### **7.1. Introducere**

Antibioticele din clasa aminoglicozidelor au eficiență recunoscută împotriva germenilor Gram-pozitivi, Gram-negativi și Mycoplasma, având variate aplicații în tratamentul patologiilor infecțioase. Totuși, activitatea antimicrobiană intensă a acestora este umbrită de apariția efectelor adverse de însoțire, ceea ce le situează ca antibiotice de ultimă linie. Așadar, este oportună identificarea unor terapii alternative combinate pentru a depăși aceste limitări.

Structurile magnetită ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), acidul poli-lactic co-glicolic (PLGA), și de chitosan (CS) au exprimat rezultate încurajatoare în diferite terapii sinergice, cum ar fi tratamentul controlat și țintit al infecțiilor (de exemplu *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*), al hipertermiei și livrarea țintită a medicamentelor antineoplazice. Studiul *in vitro* prezentat în Capitolul 7 descrie fabricarea unor materiale bazate pe magnetită pentru a distribui antibioticele streptomicină și neomicină încapsulate în biosferele polimerice de PLGA-CS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @NEO și PLGA-CS- $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @STR, cu scopul utilizării lor în îndepărtarea biofilmelor ce colonizează dispozitivele protetice.

După sinteză, materialele obținute au fost examinate atât din punct de vedere biologic, cât și compozițional și morfologic prin următoarele metode: difracție cu raze X (XRD), analiza termogravimetrică cu calorimetrie cu scanare diferențială (TGA-DSC), microscopie electronică cu baleiaj (SEM), microscopie electronică de transmisie cu difracție de electroni pe arie selectată (TEM-SAED), spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FT-IR), viabilitate celulară și teste antimicrobiene.

### **7.2. Materiale și metode**

#### **7.2.1. Sinteza nanoparticulelor de $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @STR și $\text{Fe}_3\text{O}_4$ @NEO și a sferelor acoperite de polimeri**

Nanoparticulele de magnetită funcționalizate cu antibiotic au fost obținute prin metoda co-precipitării, folosind  $\text{Fe}^{2+}$  și  $\text{Fe}^{3+}$  într-o proporție de 1:2 M, conform referințelor din

literatura de specialitate, iar microsferile de PLGA/CS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@STR și PLGA/CS/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@NEO au fost preparate folosind metoda de evaporare a solventului.

### **7.2.3. Caracterizarea biologică**

#### **7.2.3.1 Culturile celulare**

Culturile de celule pulmonare umane au fost folosite pentru derularea testelor *in vitro*. Aceste culturi celulare au fost păstrate la o temperatură de 37°C, într-o atmosferă umedă cu 5% CO<sub>2</sub>, asigurată de folosirea mediului Eagle Minim Esențial (EMEM) suplimentat cu ser fetal bovin 10%. Vizualizarea celulelor și monitorizarea diferitelor etape de creștere a fost posibilă prin folosirea unui microscop inversat cu fază de contrast tip Olympus IX71.

#### **7.2.3.2 Viabilitatea celulară și teste de toxicitate**

Viabilitatea celulară după expunerea la nanoparticulele și microsferile conținând magnetită a fost evaluată prin testul MTT [bromură de (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil) tetrazoliu]. Celulele au fost incubate timp de 24 h într-un mediu de cultură în absența compușilor de sinteză pe bază de magnetită (proba-control), precum și în prezența acestora. După înlăturarea mediului de cultură, celulele au fost spălate cu o soluție tampon de fosfat salin. Ulterior a fost adăugată soluția de MTT (1 mg/mL), iar celulele au fost în continuare incubate la 37°C timp de două ore, în condiții de întuneric. Consecutiv îndepărtării acestuia, un volum egal de isopropanol a fost adăugat, prin pipetare, pentru a solubiliza cristalele de formazan. Măsurătorile spectrofotometrice de absorbție au fost efectuate la o lungime de undă de 595 nm, cu un cititor de microplăci.

Viabilitatea liniei de culturi celulare MRC-5 a fost de asemenea vizualizată folosind un microscop inversat cu fluorescență tip Olympus și kit-ul de evaluare a viabilității celulare LIVE/DEAD®. Sintetic, după o perioadă de incubație de 24 h cu nanoparticulele, celulele au fost spălate folosind soluție încălzită de tampon fosfat salin și incubate cu amestecul de ethidium-calceină, timp de 30 de minute, la 37 °C. După un nou proces de spălare cu soluție tampon fosfat salin, celulele au fost pregătite pentru a fi explorate imagistic.

Stabilirea concentrației de oxid nitric (NO) din mediul de cultură colectat după expunerea timp de 24 ore la nanoparticule s-a realizat prin utilizarea unui reactiv Griess și a unei curbe standard de nitrat de sodiu (NaNO<sub>2</sub>). Aceasta a fost folosită ca referință pentru

evaluarea creșterii NO ca o consecință a efectului citotoxic care declanșează inflamația și moartea celulară.

Nivelul de lactat-dehidrogenază (LDH) eliberat în mediile de cultură a fost cuantificat prin aplicarea unui kit specific de evaluare a toxicității *in vitro*, TOX7, centrat pe LDH. Mediul de cultură a fost colectat după 24 h de creștere celulară în prezența probelor testate. Absorbția a fost consemnată cu un cititor de microplăci, în lungimea de undă a fasciculului de 490 nm. Analiza statistică a fost elaborată pe trei replicat ale fiecărei probe prin testul Student (t) nepereche, iar diferențele au fost considerate semnificative statistic la valori ale lui  $p < 0.05$ .

### **7.2.3.3. Evaluarea antimicrobiană**

Evaluarea proprietăților antibacteriene ale nanocompușilor a fost derulată prin expunerea la speciile bacteriene de *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa*.

Stabilirea concentrației minime inhibitorii (CMI) a sferelor și nanoparticulelor sintetizate s-a realizat printr-o metodă cantitativă bazată pe o serie de microdiluții binare în mediu lichid, distribuite în 96 godeuri ale plăcii de cultură. În primul godeu al fiecărui rând a fost adăugată o cantitate corespunzătoare concentrației 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Cu ajutorul unei micropipete, au fost realizate diluții binare până la o concentrație finală de 0.05  $\mu\text{g/mL}$ . După finalizarea microdiluțiilor, 15  $\mu\text{L}$  de suspensie de densitate 0.5 McFarland au fost adăugate în fiecare godeu. Plăcile însămânțate au fost incubate timp de 24 h la 37 °C și, după incubare, a fost determinată, prin examinare vizuală, valoarea CMI pentru fiecare probă ca cea mai scăzută concentrație la care s-a observat absența creșterii microbiene (tradusă prin lipsa turbidității). Valoarea a fost confirmată prin consemnarea absorbției specifice culturilor microbiene într-un fascicul de 600 nm folosind un spectrofotometru.

## **7.3. Rezultate**

### **7.3.3. Rezultatele evaluării biologice**

#### **7.3.3.1. Viabilitatea celulară**

În ceea ce privește caracterizarea din punct de vedere biologic a materialelor sintetizate, procentul de celule metabolice active a fost evaluat după 24 h prin testul MTT efectuat pe fibroblaști pulmonari umani. Nu au fost depistate modificări semnificative pentru

nanoparticulele de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@STR și Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@NEO în comparație cu proba control, cuantumul celulelor viabile expuse la aceste nanostructuri fiind de 96% din valoarea celor netratate.

O creștere de 11% a viabilității celulare a fost observată însă pentru microsfelele de PLGA/CS/PVA-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@NEO, comparativ cu cele control, netratate. Rezultatele au fost calculate ca medie±deviație standard a trei replicare și exprimate raportat la celulele-control (rezultatul p<0.05 comparativ cu proba-control). Efectul rezultat este semnificativ statistic și poate fi corelat cu biocompatibilitatea accentuată a polimerului folosit, precum și cu potențialul de a stimula proliferarea celulară.

În continuare, biocompatibilitatea acestor probe a fost confirmată prin măsurarea nivelurilor de NO și LDH eliberat. Rezultatele obținute pe creșterea celulară la expunerea timp de 24 h la nanoparticulele funcționalizate au fost similare celor obținute pentru proba control, netratată. Această explorare demonstrează faptul că microsfelele și nanoparticulele sintetizate nu au avut efect inflamator sau toxic asupra integrității membranei celulare.

În urma utilizării microscopiei de fluorescență s-a evidențiat, prin colorarea specifică a celulelor viabile și a celor moarte, faptul că microsfelele de PLGA/CS/PVA-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-STR generează modificări minime asupra numărului de celule viabile comparativ cu probele control.

### **7.3.3.2. Rezultatele testării antimicrobiene**

Efectul antimicrobian a fost studiat printr-un test standardizat, cu scopul de a stabili concentrația minimă inhibitorie (CMI) a nanostructurilor funcționalizate cu antibiotic împotriva patogenilor testați. Rezultatele au relevat diferențe ale valorilor CMI ale compușilor obținuți, în funcție de antibioticul încorporat și de specia microbiană evaluată. Microsfelele conținând Streptomicină (STR) au prezentat valori CMI inferioare pe tulpinile de *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas aeruginosa* testate. Potențialul antimicrobian accentuat se datorează unei bune absorbții și eliberări de către microsistemul de nanodimensiuni obținut.



## 8. Concluzii și contribuții personale

În cadrul părții speciale a lucrării am urmărit, pe de o parte, caracterizarea unui lot de pacienți laringenctomizați la care s-a efectuat reabilitarea fonatorie prin montarea și schimbarea periodică a protezelor vocale și, pe de altă parte, am efectuat două studii centrate pe identificarea unor nano-structuri cu proprietăți de combatere a biofilmelor prin aplicarea acestora pe protezele fonatorii.

Punctual, în cadrul studiului observațional descriptiv am evaluat variabile generale precum vârsta pacientului, sexul, tipul histopatologic de neoplasm pentru care s-a efectuat intervenția de laringectomie, precum și aspecte particulare fiecărui caz referitoare la tipul de proteză fonatorie montat, intervalul de înlocuire a butoanelor fonatorii pentru fiecare pacient, și, mai ales, colonizarea bacteriană sau fungică atât local, la nivelul fistulei traheo-esofagiene, cât și la nivelul protezei vocale. Atât pentru secrețiile recoltate de la nivelul situsului de inserție al protezelor fonatorii, cât și pentru cele recoltate de pe suprafețele protezelor recuperate, am studiat compoziția culturilor microbiene și polimicrobiene, dar și profilurile microbiene, respectiv polimicrobiene. Mai exact, am studiat frecvența cu care au fost identificați germenii în secrețiile menționate, precum și modalitățile de asociere ale acestora, și distribuția patogenilor în funcție de intervalele de înlocuire ale protezelor fonatorii. Am analizat aceste date cu scopul de a depista potențialii factori care ar influența durata de exploatare a protezelor fonatorii. Am explorat, de asemenea, apariția complicațiilor legate de montarea protezelor și eventualitatea instalării patologiei inflamatorii, respectiv infecțioase la nivel bronho-pulmonar.

Cele două studii care completează partea specială au vizat evidențierea particularităților aplicațiilor nano-tehnologiei în combaterea biofilmelor, cu scopul particular de a prelungi durata de exploatare a protezelor fonatorii.

Astfel, primul studiu s-a concentrat pe sinteza unor nanoparticule de magnetită acoperite cu polietilen glicol și funcționalizate cu polimixină. Acestea au fost obținute prin metoda co-precipitării și caracterizate prin diferite metode. Eficiența acestor structuri în combaterea biofilmelor se sprijină pe dimensiunile de ordin nano, din intervalul 5 - 9 nm, proprietatea de cristalinitate bine exprimată, biocompatibilitatea accentuată, toxicitatea redusă, și mai ales pe efectul inhibitor pe dezvoltarea biofilmului. Evaluarea din punct de vedere biologic a marcat de asemenea un impact favorabil ce încurajează folosirea materialelor

sintetizate în cadrul acestui studiu pentru elaborarea unor structuri cu proprietăți combative anti-biofilm.

Cel de-al doilea studiu are ca punct de plecare proiectarea unui sistem inovator, bazat pe magnetită, pentru distribuirea antibioticelor de streptomycină și neomicină, încapsulate în biosferele polimerice de acid poli-lactic co-glicolic și chitosan funcționalizate cu antibioticele menționate, ce a condus la sinteza structurilor PLGA-CS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@NEO și PLGA-CS-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@STR.

Patru nanocompuși pe bază de magnetită au fost sintetizați prin tehnicile de coprecipitare și ultrasonicare. Atât nanomaterialele obținute, cât și nanoparticulele de magnetită funcționalizate au aspect sferic și dimensiuni din gama nano, ce le sporește versatilitatea în aplicațiile anti-biofilm. Lipsa de toxicitate pe celulele umane și valorile reduse ale CMI pe speciile bacteriene regăsite frecvent în compoziția biofilmelor ce colonizează butoanele fonatorii reprezintă avantaje valoroase ale acestor structuri. Mai mult, încorporarea nanoparticulelor în microsfele de polimeri le-a accentuat acestora biocompatibilitatea, cu menținerea efectului antimicrobian optim împotriva speciilor de *Staphylococcus aureus* și *Pseudomonas Aeruginosa*. Specific, acoperirea straturilor de streptomycină, respectiv neomicină cu aceste structuri polimerice conduce la depășirea efectelor toxice determinate de utilizarea acestor aminoglicozide. Eficiente în livrarea țintită și controlată a medicamentelor transportate, materialele obținute se disting drept candidați performanți pentru profilaxia și tratamentul infecțiilor din sfera otorinolaringologiei, și în special pentru combaterea biofilmelor pe protezele fonatorii.

## Concluzii

1. Reabilitarea fonatorie prin montarea unei proteze vocale este metoda de elecție pentru substituția funcției pierdute după efectuarea laringectomiei totale. Deși există și alte metode de reabilitare, precum laringofonul sau utilizarea vocii esofagiene, reabilitarea vocală prin montarea unei proteze fonatorii reprezintă standardul și este cea mai utilizată tehnică.

2. Contrastând cu avantajele indiscutabile ale montării unei proteze fonatorii, există o serie de dezavantaje semnificative pentru impactul pe termen lung asupra calității vieții pacientului.

3. Durata medie de utilizare a protezei fonatorii în cadrul grupului studiat a fost de 8 luni, rezultate comparabile cu datele din literatura de specialitate.

4. Principalul dezavantaj este necesitatea înlocuirii frecvente a dispozitivului. Cauza principală este reprezentată de scurgerile transprotetice cauzate de acumularea de biofilm pe flanșele și în interiorul butonului fonator, care conduce la deteriorarea fizică a materialului dispozitivului și, în consecință, la funcționalitatea acestuia.

5. Există o asociere semnificativă statistic între prezența colonizării microbiene și durata de exploatare a protezelor, fără a exista însă o influență semnificativă între tipurile specifice de tulpini din compoziția acestor secreții și frecvența de înlocuire.

6. Principalele specii bacteriene identificate în secrețiile recoltate de pe protezele fonatorii sunt, în această ordine: *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* și *Klebsiella pneumoniae*. Corespunzător, speciile fungice predominante sunt: *Candida tropicalis*, *Candida krusei* și *Candida albicans*.

7. Profilul microbiologic al secrețiilor recoltate de la nivelul protezelor fonatorii a fost reprezentat de monoculturi fungice în proporție de aproximativ 1/3 dintre culturi, urmată de culturi mixte dintre o specie bacteriană și una fungică, în 1/4 din cazuri, și de monoculturi bacteriene în 1/5 din cazuri.

8. Există o asociere semnificativă statistic între tipul protezei fonatorii utilizat în planul de reabilitare vocală și durata de exploatare a protezei.

9. Dezvoltarea biofilmului pe dispozitivele fonatorii apare independent de factori precum vârsta pacientului, comorbidități, tipul dispozitivului utilizat. Colonizarea protezelor fonatorii cu biofilm, indiferent de natura acestuia (bacterian/fungic/mixt) este favorizată de structura bazată pe polimeri elastici a butoanelor fonatorii, precum și de condiții de mediu

optime asigurate de expunerea la microflora esofagiană, la diferite fluide, salivă, resturi alimentare, umiditate crescută, temperatură potrivită.

10. Morfologia biofilmului este particulară fiecărui interval analizat, cu creșterea ponderii de colonizare fungică pe măsura trecerii timpului.

11. Inhibarea dezvoltării biofilmului bacterian pe protezele fonatorii este posibilă prin modificarea suprafețelor acestor dispozitive utilizând nanotehnologia. Specific, rezultatele sunt promițătoare în ceea ce privește impactul pe durata de folosire a butoanelor fonatorii, care poate fi prelungită prin acoperirea dispozitivelor cu nanoparticule de magnetită funcționalizate cu diferiți agenți terapeutici (antibiotic).

## Bibliografie selectivă

1. Anghel I, Grumezescu V, Andronescu E, Anghel GA, Grumezescu A, Mihaiescu D, et al. Protective effect of magnetite nanoparticle/*Salvia officinalis* essential oil hybrid nanobiosystem against fungal colonization on the Provox. *DIGEST JOURNAL OF NANOMATERIALS AND BIOSTRUCTURES*. 2012;7:1205-12.
2. Spalek J, Deptuła P, Cieśluk M, Strzelecka A, Łysik D, Mystkowska J, et al. Biofilm Growth Causes Damage to Silicone Voice Prostheses in Patients after Surgical Treatment of Locally Advanced Laryngeal Cancer. *Pathogens (Basel, Switzerland)*. 2020;9(10).
3. Leonhard M, Schneider-Stickler B. Voice prostheses, microbial colonization and biofilm formation. *Advances in experimental medicine and biology*. 2015;830:123-36.
4. Pawar PV, Sayed SI, Kazi R, Jagade MV. Current status and future prospects in prosthetic voice rehabilitation following laryngectomy. *Journal of cancer research and therapeutics*. 2008;4(4):186-91.
5. Krishnamurthy A, Khwajamohiuddin S. Analysis of Factors Affecting the Longevity of Voice Prosthesis Following Total Laryngectomy with a Review of Literature. *Indian journal of surgical oncology*. 2018;9(1):39-45.
6. Zhang Y, Niu Y, Huo H, Wang J, Jin X, Yang H. Inhibition and Removal of Mature Mixed-Bacteria Biofilms on Voice Prostheses by Sodium Selenite. *Infection and drug resistance*. 2022;15:7799-810.
7. Wi YM, Patel R. Understanding Biofilms and Novel Approaches to the Diagnosis, Prevention, and Treatment of Medical Device-Associated Infections. *Infectious disease clinics of North America*. 2018;32(4):915-29.
8. Gheorghe DC, Ilie A, Niculescu AG, Grumezescu AM. Preventing Biofilm Formation and Development on Ear, Nose and Throat Medical Devices. *Biomedicines*. 2021;9(8)
9. Tan Y, Ma S, Leonhard M, Moser D, Ludwig R, Schneider-Stickler B. Co-immobilization of cellobiose dehydrogenase and deoxyribonuclease I on chitosan nanoparticles against fungal/bacterial polymicrobial biofilms targeting both biofilm matrix and microorganisms. *Materials science & engineering C, Materials for biological applications*. 2020;108:110499.
10. Bertl K, Zatorska B, Leonhard M, Rechenmacher-Strauss J, Roesner I, Schneider-Stickler B. Oral microbial colonization in laryngectomized patients as a possible cofactor of biofilm formation on their voice prostheses. *Journal of clinical periodontology*. 2013;40(9):833-40.
11. Caciandone M, Niculescu A-G, Roșu AR, Grumezescu V, Negut I, Holban AM, et al. PEG-Functionalized Magnetite Nanoparticles for Modulation of Microbial Biofilms on Voice Prosthesis. 2022;11(1):39.
12. Anghel I, Holban A, Andronescu E, Grumezescu A, Chifiriuc M. Efficient surface functionalization of wound dressings by a phytoactive nanocoating refractory to *Candida albicans* biofilm development. *Biointerphases*. 2013;8.
13. Anghel I, Grumezescu A, Holban A, Ficai A, Anghel A, Chifiriuc M. Biohybrid Nanostructured Iron Oxide Nanoparticles and *Satureja hortensis* to Prevent Fungal Biofilm Development. *International journal of molecular sciences*. 2013;14:18110-23

14. Flint P. CUMMINGS OTOLARYNGOLOGY–HEAD AND NECK SURGERY. sixth ed: Elsevier Saunders; 2015.
15. Kramp B, Dommerich S. Tracheostomy cannulas and voice prosthesis. *GMS current topics in otorhinolaryngology, head and neck surgery*. 2009;8:Doc05.
16. Caciandone M, Niculescu A-G, Grumezescu V, Bîrcă AC, Ghica IC, Vasile BŞ, et al. Magnetite Nanoparticles Functionalized with Therapeutic Agents for Enhanced ENT Antimicrobial Properties. 2022;11(5):623.
17. Zenga J, Goldsmith T, Bunting G, Deschler DG. State of the art: Rehabilitation of speech and swallowing after total laryngectomy. *Oral Oncology*. 2018;86:38-47.
18. Talpaert MJ, Balfour A, Stevens S, Baker M, Muhlschlegel FA, Gourlay CW. Candida biofilm formation on voice prostheses. 2015;64(3):199-208.
19. Neu TR, De Boer CE, Verkerke GJ, Schutte HK, Rakhorst G, Van Der Meil HC, et al. Biofilm Development in Time on a Silicone Voice Prosthesis—A Case Study. *Microbial Ecology in Health and Disease*. 1994;7(1):27-33
20. Bertl K, Zijng V, Zatorska B, Leonhard M, Schneider–Stickler B, Harmsen HJM. Oral cavity anaerobic pathogens in biofilm formation on voice prostheses. 2015;37(4):524-9.

## Lista lucrărilor științifice publicate

1. PEG-Functionalized Magnetite Nanoparticles for Modulation of Microbial Biofilms on Voice Prosthesis - publicat în *Antibiotics* 2022, 11(1), 39; <https://doi.org/10.3390/antibiotics11010039> Indexat PubMed, Factor de impact 4,63
2. Magnetite Nanoparticles Functionalized with Therapeutic Agents for Enhanced ENT Antimicrobial Properties - publicat în *Antibiotics* 2022, 11(5), 623; <https://doi.org/10.3390/antibiotics11050623>, Indexat PubMed Factor de impact 4,63
3. Biofilm assessment on voice prosthesis used for vocal rehabilitation in laryngectomized patients - publicat în *Romanian Journal of Medical Practice*, 2022, Vol. 17, No. 1 (86); [DOI: 10.37897/RJMP.2022.1.6](https://doi.org/10.37897/RJMP.2022.1.6) Indexat Scopus
4. *Biofilms on Voice Prosthesis – Challenges and Therapeutic Insights*" publicat în revista *Maedica - a Journal of Clinical Medicine*, 2023, Vol 18 (21), No. 3, DOI: <https://doi.org/10.26574/maedica.2023.18.3.498> Indexat PubMed