

Universitatea Tehnică "Gh.Asachi" din Iași, România
Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului

în cotutelă cu

Institutul Național de Științe Aplicate din Lyon, Franța
Școala Doctorală MEGA

MATERIALE POLIMERICE CU HIDROFILIE CONTROLATĂ CU APLICAȚII ÎN INGINERIA TISULARĂ A CARTILAJULUI ARTICULAR

Conducători științifici:

Prof.Dr.Ing. Marcel Ionel POPA

DR.Prof. Yves BERTHIER

Bioinginer:

Luciana Elena BOSTAN

-2011-

"Singuri realizăm foarte puține lucruri; dar împreună putem realiza foarte multe."

*Helen Keller
(1880-1968)*

*"Individual suntem doar o picătură.
Împreună suntem un ocean"*

*Ryunosuke Satoro
(1892-1962)*

Mulțumesc,

Vreau să mulțumesc în primul rând conducătorilor tezei mele de doctorat: **Marcel Ionel POPA** și **Yves BERTHIER**. Ei m-au introdus într-un domeniu foarte interesant, mi-au dat sfaturi utile de fiecare dată, au răspuns cu răbdare întrebărilor și cerințelor mele. De asemenea, au avut întotdeauna grijă să mă încurajeze. Mi-au împărtășit și mie pasiunea pe care o au în domeniul lor de știință. Ei au fost întotdeauna alături de mine, atât în perioade dificile cât și în momente de mare bucurie. Ei au continuat să-mi ofere sprijin în toți acești ani, și și-au adus un mare aport pe tot parcursul acestei teze. Pot afirma că, această teză a fost rodul unei colaborări depline.

Vreau să mulțumesc și raportorilor **Viorel MELNIG** și **Jacques DESBRIERES** pentru acceptul lor de a raporta teza de doctorat, și, de asemenea, interesul lor pentru munca depusă pe tot parcursul acestor ani și rapiditatea cu care au citit manuscrisul. Mulțumesc și celorlalți membri: **Dan CASCAVAL**, **Ana-Maria TRUNFIO-SFARGHIU** pentru acceptul lor să facă parte din juriu.

Aș dori să mulțumesc de asemenea, celor care au jucat un rol fundamental în formarea mea. În primul rând pentru cei care au trezit în mine o pasiune pentru cercetare: **Florin MUNTEANU**, oferindu-mi un stagiu Erasmus la INSA.

Liliana VERESTIUC care m-a introdus în universul mare și complex al biomaterialelor, și **Ana-Maria TRUNFIO-SFARGHIU** care mi-a împărtășit vasta sa experiență în biomecanica, și nu numai. În calitate de co-coordonatori ai tezei mele de doctorat, m-au sprijinit pe tot parcursul tezei mele, și, de asemenea, au analizat cu atenție acest manuscris. Vă mulțumesc pentru timpul acordat corectării acestui manuscris, ori de câte ori, "pixul" meu, tindea să derapeze.

Îi mulțumesc foarte călduros laboratorului LaMCoS (INSA Lyon) care mi-a oferit un mediu de lucru excelent în timpul pregătirii acestei teze: **Marie-Hélène MEURISSE**, **Michel QUERY**, **Claude GODEAU**, **Silvie**

DESCARTES, Anne-Marie Colin, Alexandra PODGOURSKAIA. Ei m-au ajutat foarte mult în munca mea de cercetare, dar și în problemele mele administrative. Apreciez prietenia și sinceritatea lor.

Am avut, de asemenea, plăcerea de a colabora cu alte laboratoare: LPMCN (Lyon), platforma MATMIP (Universitatea "Gh.Asachi" (Iași)). Mulțumiri în special lui **Jean-Paul RIEU** și **Gabi LISA** pentru colaborare.

Mulțumesc, de asemenea tuturor colegilor mei, prietenilor de birou, atât din România cât și din Franța, care sunt foarte drăguți și prietenoși: **Ovidiu NOVAC, Vera BALAN, Edi TANASE, Simona POTORAC (BETIANU), Gina DODI, Ionut MATEI, Livia CUERU, CRISAN Nicoleta, CORNECI Magdalena, Na WANG.**

În cele din urmă, aș vreau să mulțumesc **părinților mei**, logodnicului meu, **Ionut** și întregii sale familii, pentru dragostea și suportul lor constant.

CUPRINS

INTRODUCERE

CAPITOLUL I

MATERIALE POLIMERICE CU APLICAȚII ÎN INGINERIA TISULARĂ A CARTILAJULUI ARTICULAR _____ 1

I.1. STRUCTURA ȘI PROPRIETĂȚILE CARTILAJULUI ARTICULAR _____ 1

I.1.1. Structura cartilajului articular _____ 2

I.1.2. Compoziția cartilajului articular _____ 2

I.1.2.1. Condrocitele _____ 3

I.1.2.2. Matricea extracelulară _____ 4

I.1.2.2.1. Componenta lichidă _____ 4

I.1.2.2.2. Macromoleculele de structură _____ 4

I.1.3. Zonele structurale ale cartilajului articular _____ 9

I.1.4. Proprietățile cartilajului articular _____ 10

I.1.4.1. Proprietățile biologice _____ 11

I.1.4.1.1. Mecanismul de compensare al uzurii _____ 11

I.1.4.1.2. Mecanismul remodelării osoase _____ 11

I.1.4.2. Proprietățile fizico-chimice _____ 12

I.1.4.3. Proprietățile biomecanice _____ 12

I.1.4.3.1 Rezistența la compresiune _____ 12

I.1.4.3.2. Rezistența la forfecare _____ 16

I.1.4.3.3. Rezistența la tracțiune _____ 16

I.1.4.3.4. Rezistența la fisurare _____ 17

I.1.4.4. Lubrifierea cartilajului articular _____ 17

I.1.4.5. Nutriția condrocitelor _____ 18

I.2. PATOLOGIA CARTILAJULUI ARTICULAR: METODE CURENTE DE TRATAMENT _____ 20

I.2.1. Răspunsul cartilajului articular la agresiune _____ 20

I.2.1.1. Microleziunea _____ 21

I.2.1.2. Fractura condrală _____ 21

I.2.1.3. Fractura osteocondrală _____ 22

I.2.2. Tratamentul leziunilor cartilajului articular _____ 22

I.2.2.1. Tratamentul medicamentos al leziunilor cartilajului articular _____ 22

I.2.2.1.1. Glucozamina și condroitin sulfatul _____ 22

I.2.2.1.2. Acidul hialuronic _____ 23

I.2.2.1.3. Glucocorticoizii _____ 23

I.2.2.1.4. Antiinflamatoare nesteroidiene _____ 23

I.2.2.2. Tratamentul chirurgical al leziunilor cartilajului articular _____ 23

I.2.2.2.1. Transplantul osteocondral autolog _____ 24

I.2.2.2.2. Implantarea de condrocite autologe _____ 25

I.3. BIOMATERIALE UTILIZATE ÎN INGINERIA TISULARĂ A CARTILAJULUI ARTICULAR	26
I.3.1. Materiale polimerice sintetice utilizate ca biomateriale în ortopedie	28
I.3.1.1. Polietilenele	30
I.3.1.2. Poli(clorura de vinil)	32
I.3.1.3. Poli(tetrafluoretilena)	33
I.3.1.4. Poli(alcoolul vinilic)	35
I.3.1.5. Polimeri acrilici	37
I.3.1.5. 1. Poli(metacrilatul de metil)	37
I.3.1.6. Poliamide	39
I.3.1.7. Poliuretani	41
I.3.2. Polimeri utilizați pentru înlocuirea cartilajului articular	43
I.3.3. Hidrogeluri pe bază de p(HEMA)	49
I.3.3.1. Structura p(HEMA)	50
I.3.3.2. Caracteristici fizico-chimice și mecanice	52
I.3.4. Proprietățile de volum ale hidrogelurilor	53
I.3.5. Proprietățile mecanice ale hidrogelurilor	53
I.3.5.1. Extensiometria	54
I.3.5.2. Rezistența la compresiune	55
I.3.5.3. Testul de indentare	55
I.4. CONCLUZII	56
 CAPITOLUL II	
STRATEGIA EXPERIMENTALĂ	59
II.1. CONCEPT EXPERIMENTAL	59
II.1.1. Materiale folosite	61
II.1.1.1. Reactivi	61
II.2. METODE DE ANALIZĂ	65
II.2.1. Analiza prin spectroscopie în infraroșu (FTIR)	65
II.2.2. Metode de analiză termică	69
II.2.3. Determinarea tensiunii superficiale	71
II.2.3.1. Teoriile tensiunii superficiale	72
II.2.3.1.1. Teoria lui Young	72
II.2.3.1.2. Teoria lui Fowkes	73
II.2.3.1.3. Teoria acid-bază	73
II.2.4. Studii de umflare	75
II.2.4. 1. Cinetica umflării	76
II.2.5. Microscopie electronică de baleiaj (SEM, ESEM)	77
II.2.6. Teste mecanice și tribologice la scară macro și nano (reometrie, microscopie de forță atomică)	78
II.2.6.1. Teste de reometrie	78
II.2.6.1.1. Teste de compresiune	79
II.2.6.1.2. Teste de forfecare	80
II.2.6.2. Microscopia de forță atomică	81

II.2.6.2.1. Tipuri de măsurători AFM	83
II.2.7. Teste <i>in vitro</i> de încărcare și eliberare de principii active în/din hidrogeluri	86
II.2.7.1. Modele matematice care descriu eliberarea controlată de principii biologice active	88

CAPITOLUL III

SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA HIDROGELURILOR	93
III.1. SINTEZA HIDROGELURILOR PE BAZĂ DE HEMA ȘI COMONOMERI CU CARACTER HIDROFIL SAU HIDROFOB	95
III.2. CARACTERIZAREA HIDROGELURILOR	98
III.2.1. Analiza prin spectroscopie FTIR	98
III.2.2. Analize termice	101
III.2.2.1. Analiza termogravimetrică (TG)	101
III.2.2.2. Analiza de calorimetrie diferențială (DSC)	104
III.3. ANALIZA MORFOLOGICĂ A HIDROGELURILOR: ESEM, SEM	106
III.3.1. Analiza hidrogelurilor prin ESEM	106
III.3.2. Analiza hidrogelurilor prin SEM	107
III.4. TESTE DE UMFLARE	108
III.5. DETERMINAREA ENERGIEI DE SUPRAFAȚĂ	111
III.6. CONCLUZII	114

CAPITOLUL IV

STUDII PRIVIND EVALUAREA BIOMECHANICĂ A HIDROGELURILOR	116
IV.1. DETERMINAREA CARACTERISTICILOR MECANICE LA COMPRESIUNE	116
IV.1.1. Stabilirea parametrilor experimentali	117
IV.1.2. Rezultate și discuții	119
IV.2. DETERMINAREA CARACTERISTICILOR DE VÂSCOELASTICITATE	123
IV.2.1. Stabilirea parametrilor experimentali	124
IV.2.2. Rezultate și discuții	124
IV.3. ANALIZA CRITICĂ A MATERIALELOR ȘI SELECȚIA SISTEMELOR CU POTENȚIALE APLICAȚII BIOMEDICALE	128
IV.4. ANALIZA NANOMECHANICĂ A HIDROGELURILOR P(HEMA-CO-AA)	129
IV.4.1. Teste de nanoidentare	129
IV.4.1.1 Stabilirea parametrilor experimentali	130
IV.4.1.2. Rezultate și discuții	131
IV.5. CONCLUZII	135

CAPITOLUL V

ANALIZA TRIBOLOGICĂ A HIDROGELURILOR	137
V.1. STUDII DE FRECARĂ LA SCARA MACROSCOPICĂ	138
V.1.1. Stabilirea parametrilor experimentali	139
V.1.2. Rezultate și discuții	140
V.2. TESTE DE FRECARĂ LA SCARĂ NANOCOPICĂ	141

V.2.1. Stabilirea parametrilor experimentali	143
V.2.2. Rezultate și discuții	143
V.3. STUDII DE TOPOGRAFIE	145
V.3.1. Stabilirea parametrilor experimentali	145
V.3.2. Rezultate și discuții	145
V.4. CONCLUZII	146

CAPITOLUL VI

STUDII CINETICE DE ÎNCĂRCARE ȘI ELIBERARE DE PRINCIPII ACTIVE ÎN/DIN HIDROGELURI P(HEMA-CO-AA)	147
VI.1. ELIBERAREA CONTROLATĂ DE PRINCIPII ACTIVE: GENERALITĂȚI	148
VI.1.1. Alegerea principiului activ	151
VI.1.1.1. Ibuprofenul	153
VI.1.1.2. Ketoprofen	155
VI.2. STUDII CINETICE PRIVIND DIFUZIA UNOR SUBSTANȚE BIOLOGIC ACTIVE ÎN HIDROGELURI	159
VI.2.1. Caracterizarea hidrogelurilor încărcate cu principii active	159
VI.2.1.1. Încărcarea medicamentului în hidrogelurile pe bază de p(HEMA)	160
VI.3. STUDII CINETICE PRIVIND DIFUZIA UNOR SUBSTANȚE BIOLOGIC ACTIVE DIN HIDROGELURILE SINTETIZATE. MODEL TEORETIC DE DIFUZIE	161
VI.3.1. Modelul teoretic de difuzie	163
VI.4. CONCLUZII	165
CONCLUZII GENERALE	167
BIBLIOGRAFIE	169

INTRODUCERE

În prezent, materialele polimerice ocupă un loc foarte important în toate domeniile activității umane, fiind parte din ce în ce mai mult din viața de zi cu zi. Dintre acestea, biomaterialele polimerice constituie un subiect foarte actual și cu o dinamică deosebită, dată fiind diversitatea utilizării în domeniul medical și farmaceutic. Principala preocupare o reprezintă ameliorarea calității implanturilor și a dispozitivelor de analiză minim-invazivă ale organismului, creșterea biocompatibilității și a rezistenței mecanice a materialelor care urmează să intre în contact direct cu țesuturile biologice, punerea la punct a unor sisteme de eliberare controlată, care să ducă la organul-țintă diferite principii biologice active.

Deși se află la dispoziție un număr mare de materiale, biocompatibilitatea și proprietățile mecanice, au restrâns sever numărul actual de polimeri care pot fi folosiți în domeniul medical. Candidatele la biomateriale trebuie să îndeplinească câteva cerințe, legate de proprietățile fizice și mecanice ale polimerilor. Acestea includ: geometria dispozitivului sau implantului, gradul de umflare la echilibru, omogenitatea, proprietățile elastice, răspunsul la tensiune, comportarea vâscoelastică în timp, și posibilitatea eliberării controlate de principii active.

De asemenea, biomaterialele trebuie să poată fi sterilizate, fără alterarea formei sau proprietăților și fără absorbția permanentă a agenților de sterilizare. Ele nu trebuie să prezinte reacții inflamatoare când vin în contact cu țesuturile naturale și acestea nu trebuie să fie degradate în prezența enzimelor naturale din fluidele biologice.

Până în prezent, o varietate de materiale (naturale sau sintetice) au fost studiate ca potențiale produse ale ingineriei tisulare a cartilajului articular. Materialele naturale pot adesea interacționa cu celulele, dar, au, în același timp o serie de dezavantaje legate de răspunsul imun și proprietățile mecanice necorespunzătoare cu cele ale cartilajului articular.

Astfel că, materialele sintetice au fost propuse ca și candidate pentru ingineria tisulară a cartilajului articular, pentru că structura lor poate fi controlată astfel încât să putem anticipa anumite proprietăți chimice și fizice specifice, pentru a putea obține anumite caracteristici mecanice.

Aceste biomateriale pot fi sintetizate într-o varietate de matrici (bureți, rețele și hidrogeluri). Rețelele și bureții sintetici sunt matrici 2D care au o porozitate foarte mare (>90%), și nu pot asigura funcțiile mecanice, însă pot servi ca o modalitate de transport ai celulelor sau diferitelor principii active.

În cazul cartilajului articular, cel mai important aspect constă în abilitatea de a rezista forțelor de forfecare și compresii de la nivelul articulației. Din punct de vedere a proprietăților mecanice, cei mai indicați sunt copolimerii metacrilici care se pretează la astfel de cerințe. Dintre aceștia, un loc important ca și component al hidrogelurilor de uz biomedical îl ocupă p(hidroxietil metacrilatul) (p(HEMA)) datorită proprietăților sale remarcabile: lipsa de toxicitate și biocompatibilitatea, fiind folosit ca produs comercial (lentile de contact). În plus, sinteza acestor hidrogeluri pe bază de p(HEMA) se face într-un timp scurt, fără a necesita o aparatură complicată, precum și un cost redus. Hidrofilia lor poate fi ușor modificată utilizând diferiți co-monomeri.

Hidrogelurile pe bază p(HEMA) au fost folosite pentru protezarea țesuturilor moi, datorită caracteristicilor de biocompatibilitate, permeabilitate mare față de moleculele mici, hidrofilicitate mare, consistență moale, și în plus, p(HEMA) are un conținut de apă similar cartilajului articular. Prezintă rezistență la degradare, nu este absorbit de organism, suportă sterilizarea prin încălzire fără afectarea structurii și se poate obține într-o varietate mare de forme.

Mergând după aceste principii, teza de față își propune sinteza și caracterizarea unor materiale polimerice de tip hidrogel, care să aibă atât structura cât și proprietățile mecanice, similare cu cele ale cartilajului articular.

Teza este alcătuită din două părți, una teoretică și cealaltă experimentală, structurate în șase capitole, în care: primul capitol reprezintă partea teoretică, iar celelalte, partea originală, experimentală.

În **capitolul I** sunt prezentate structura și proprietățile cartilajului articular, precum și patologia întâlnită la acest nivel de țesut. Stadiul actual al metodelor de tratament actuale sunt subliniate împreună cu limitările lor, pentru a evidenția problematica de la care s-a plecat în cadrul acestui studiu. Astfel o alternativă este prezentată prin prisma ingineriei tisulare a cartilajului articular.

Odată stabilită clasa de materiale polimerice cu care se va lucra, în **capitolul II** sunt prezentate metodele și analizele experimentale.

Capitolul III, constă în sinteza și caracterizarea hidrogelurilor. La realizarea protocolul experimental s-a încercat realizarea testelor în aceleași condiții ca cele fiziologice ale cartilajului articular (parametrii de testare și mediul de hidratare tampon pH 7).

În **capitolul IV** se face selecția critică a hidrogelurilor sintetizate, în funcție de rezultatele obținute în urma testelor de compresiune și forfecare. Astfel, au fost alese doar hidrogelurile cu un comportament mecanic la compresiune și forfecare, asemănător cu cel al cartilajului articular (HEMA 5%AA, HEMA 25%AA). În continuare au fost realizate teste de comprimare la scară nano, pentru a verifica dacă proprietățile sunt aceleași cu cele de la scară macro.

Datorită aplicației ca substituent de cartilaj articular, în **capitolul V** hidrogelurile au fost testate pentru a le caracteriza din punct de vedere tribologic. Testele au fost realizate atât la scară macro cât și nano.

În **capitolul VI** a fost realizat un studiu de eliberare controlată de principii active în/din hidrogeluri, pentru a se preveni, în cazul implantării, reacția de inflamare care apare în urma acestei intervenții.

CAPITOLUL I

MATERIALE POLIMERICE CU APLICAȚII ÎN INGINERIA TISULARĂ A CARTILAJULUI ARTICULAR

I.3. Biomateriale utilizate în ingineria tisulară a cartilajului articular

Ingineria tisulară a fost definită, dintr-o perspectivă foarte generală, ca fiind „aplicarea principiilor și metodelor ingineriei și științelor vieții, pentru înțelegerea fundamentală a relațiilor dintre structură și funcție la țesuturile normale sau patologice, și să dezvolte substituenți biologici pentru a reintegra, menține, sau să îmbunătățească funcționalitatea lor” [1]. Langer și Vacanti [2] au subliniat rolul ingineriei tisulare în medicina regenerativă. Ei au scos în evidență faptul că ingineria tisulară este un domeniu care ne permite să avem o nouă viziune asupra medicinei regenerative. Folosind această tehnologie, devine posibil să înlocuim sau să regenerăm țesuturile lezate.

Conceptul comun reprezentativ al ingineriei tisulare este de a combina sau a folosi individual, matrici/rețele și celule vii și/sau substanțe biologice active, pentru a forma produse care vor fi implantate *in vivo*, și care vor contribui la repararea și regenerarea țesuturilor (Figura 22).

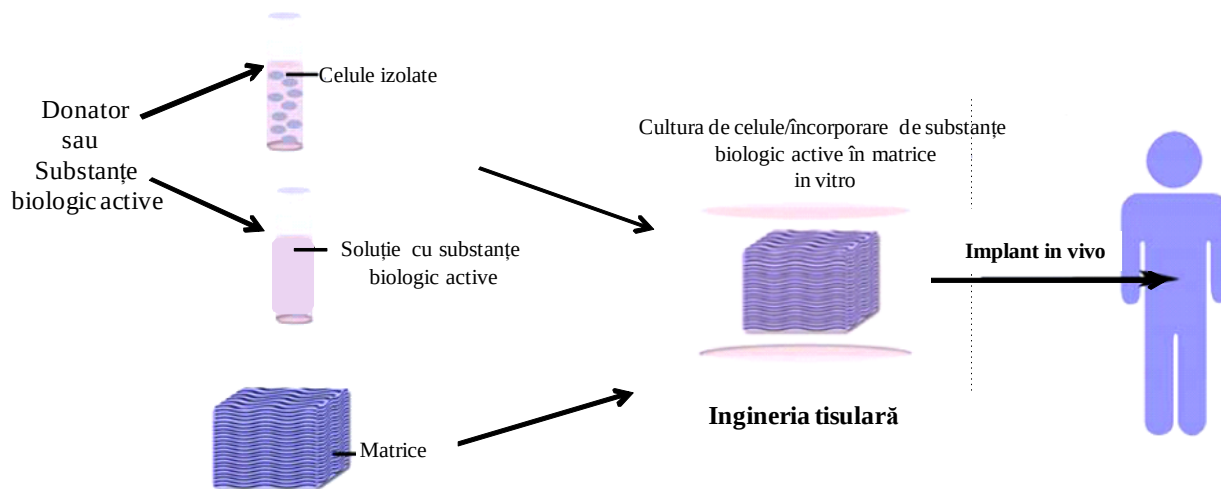


Figura 22. Schema reprezentativă a ingineriei tisulare

Matricea trebuie să permită colonizarea, migrarea, diferențierea și creșterea celulelor, și să inducă și ghideze dezvoltarea țesutului respectiv, sau să permită eliberarea controlată de medicamente. Scopul ingineriei tisulare este de a realiza o matrice dintr-un material biocompatibil, biodegradabil sau nu, în funcție dacă se dorește sau nu realizarea de culturi celulare.

În cazul matricilor pentru culturi celulare, ele trebuie să permită creșterea, proliferarea și integrarea celulelor. Pentru astfel de aplicații, alegerea unui astfel de material s-a realizat

astfel încât materialul respectiv să aibă aceleași proprietăți cu cele ale matricei cartilajului articular.

Privite dintr-o viziune biologică, este clar faptul că majoritatea țesuturilor au două tipuri de componente: una structurală și una biochimică. Ingineria tisulară ia în considerare amândouă componentele, pentru realizarea implanturilor pentru regenerare tisulară și facilitarea integrării acestora.

Sinteza matricei suport determină, în mare parte, funcționalitatea sa. Deși cerințele finale depind de scopul specific al caracteristicilor matricilor, mai multe cerințe generale trebuie să fie luate în considerare pentru toate matricile [3, 4, 5]. Matricile suport ar trebui să fie/aibă:

- biocompatibile; matricea trebuie să determine un răspuns biologic corespunzător aplicației și să prevină orice răspuns nefavorabil al țesutului înconjurător [6,7];
- biodegradabile; matricea trebuie să se degradeze în acelaș timp cu regenerarea și remodelarea matricei extracelulare, în substanțe netoxice fără să intervină în funcționarea țesutului înconjurător [8];
- să faciliteze atașarea celulară, dispersarea și proliferarea [9];
- proprietăți mecanice corespunzătoare aplicației pentru care sunt destinate - rezistența matricilor trebuie să fie comparabilă cu cea a țesutului *in vivo* [10];
- proprietăți de transport al nutrienților și de eliminare a produșilor de uzură - matricea trebuie să aibă o anumită porozitate, dar în acelaș timp, să își păstreze proprietățile mecanice specifice [11, 12, 13, 14];
- să permită vascularizarea dintre substitut la țesutul gazdă [49, 15];
- proprietăți de suprafață corespunzătoare aplicației; în afara proprietăților fizico-chimice, cercetările sugerează că topografia de suprafață joacă un rol important în organizarea tisulară, îmbunătățind funcția substitutului [16, 17, 18, 19];

În acest context, în ingineria tisulară a cartilajului articular se aplică cultura de celule (de obicei condrocite) sau încorporarea de substanțe biologic active (principii active ale unor medicamente folosite în tratarea unor boli osteoarticulare) sunt combinate cu o matrice, astfel încât să rezulte un substitut 3D, care să asigure regenerarea cartilajului articular.

Având în vedere structura cartilajului articular (Capitolul I.1) cel mai important aspect care trebuie luat în considerare sunt proprietățile mecanice. De aceea, produsele rezultate prin inginerie tisulară pentru cartilajul articular sunt proiectate pentru a putea adopta comportamentul de funcționare mecanică *in vivo* a cartilajului articular și analizate prin aplicarea unor solicitări fizice (ideal, similare celor din mediul fiziologic). Precondiționarea mecanică a construcțiilor ingineriei tisulare *in vitro* pot de asemenea să îmbunătățească viabilitatea lor și performanțele post-transplantare.

I.4. CONCLUZII

1. Proprietățile mecanice unice ale cartilajului ca suprafață portantă rezultă atât din proprietățile sale structurale cât și compoziția chimică a matricei extracelulare. Țesutul cartilaginos este considerat în general ca un sistem bifazic. Prima faza este solida: sunt componentele macromoleculare ale matricei care formează un material poros și permeabil.

Acesta este compus din fibre de collagen, legate împreună de proteine ne-colagenice și proteoglicani legați necovalent. A doua fază este lichida: este compusa din lichid interstițial și ioni. Se consideră că componentele solide rezista forțelor de întindere, forfecare și deformare, în timp ce lichidul rezistă presiunilor hidrostatice ridicate. Principali parametri care caracterizează comportamentul mecanic global al cartilajului articular sunt:

- **Modulul de elasticitate global** (0,5-1 MPa) măsurat în urma experimentelor de compresiune după stabilizarea migrației de apă și ioni în matricea cartilaginoasă,
- **Coeficientul de frecare.** Cartilajul este un material compus dintr-o fază solidă și o fază fluidă. Cele două faze, studiate separat, sunt considerate a fi incompresibile ceea ce implică coeficienți de frecare apropiați de valoarea 0,05. În plus, migrația fazei fluide în afara cartilajului în urma solicitărilor mecanice reduc coeficientul de frecare la 0,02, dar, această valoare depinde de permeabilitatea cartilajului care poate fi modificată de către ansamblurile moleculare ale sinoviei.
- **Permeabilitatea.** Valorile permeabilității sunt cuprinse între 10-16 m⁴/N.s și 10-15 m⁴/N.s, pentru o grosime de 1mm de cartilaj supus la o diferență de presiune hidrostatică de 2MPa și este dată de efectele fizico-chimice (osmotice și electrice) și nu efectele mecanice (poro-elasticitate). Atâta timp cât metodele de tratament actuale nu pot asigura repararea cartilajului articular pe termen lung, cercetătorii au găsit ca soluție ingineria tisulară. Scopul ingineriei tisulare a cartilajului articular este să se folosească celule, matrici, factori de semnal, singure sau în combinație unele cu altele, pentru a sintetiza *in vitro* un material care să fie echivalent cu cartilajul articular sănătos, atât din punct de vedere structural cât și funcțional.

2. Până în prezent, o varietate de materiale (naturale sau sintetice) au fost studiate ca potențiale produse ale ingineriei tisulare a cartilajului articular. Materialele naturale pot adesea interacționa cu celulele, dar, au, în același timp o serie de dezavantaje legate de răspunsul imun și proprietățile mecanice necorespunzătoare cu cele ale cartilajului articular. Astfel că, materialele sintetice au fost propuse ca și candidate pentru ingineria tisulară a cartilajului articular, pentru că structura lor poate fi controlată astfel încât să putem anticipa anumite anumite proprietăți chimice și fizice specifice, pentru a putea obține anumite caracteristici mecanice. Aceste biomateriale pot fi sintetizate într-o varietate de matrici (bureți, rețele și hidrogeluri). Rețelele și bureții sintetici sunt matrici 2D care au o porozitate foarte mare (>90%), și nu pot asigura funcțiile mecanice, însă pot servi ca o modalitate de transport ai celulelor sau diferiților factori [20].

3. Din punct de vedere istoric, implanturile de biomateriale au fost desemnate să înlocuiască o funcție specifică, de obicei mecanică, și a fost considerat ca fiind ideal dacă se reușește să se obțină un răspuns favorabil *in vivo*. Din toate biomaterialele polimerice, hidrogelurile au un interes special datorită favorabilei lor biocompatibilități precum o mulțime de alte avantaje. Hidrogelurile sunt materiale care se umflă atunci când sunt într-un mediu apos, dar își mențin forma totală. Hidrogelurile pot fi sintetizate prin reticularea oricărui polimer solubil în apă.

4. Structura complexă a cartilajului articular a dus la căutarea printre materialele artificiale a unui substituent, care să respecte cât mai mult posibil proprietățile sale mecanice cât și fizico-chimice. Atenția a fost îndreptată spre materialele polimerice foarte hidrofile de

tip hidrogel datorită volumului mare de apă a cartilajului articular. Aceste materiale sunt cele care permit repararea leziunilor cartilajului articular. Cele mai des folosite sunt PAV și p(HEMA).

5. PVA este un material non-imunogenic și non-toxic. Grupările hidroxil din PVA îi conferă caracterul hidrofil cu o structură semicristalină dată de legăturile de hidrogen. Cu toate acestea, PVA nu are rezistența și reziliența necesară pentru un material de substituție a cartilajului articular.

6. În cazul cartilajului articular, cea mai important aspect constă în abilitatea de a rezista forțelor de forfecare și compresii de la nivelul articulației. Din punct de vedere a proprietăților mecanice, cei mai indicați sunt copolimerii metacrilati care se pretează la astfel de cerințe. Dintre aceștia, un loc important ca și component al hidrogelurilor de uz biomedical îl ocupă p(HEMA) datorită proprietăților sale remarcabile: lipsa de toxicitate și biocompatibilitate fiind folosit ca produs comercial (lentile de contact). În plus, sinteza acestor hidrogeluri pe bază de p(HEMA) se face într-un timp scurt, fără a necesita o aparatură complicată, precum și un cost redus. Hidrofilia lor poate fi ușor modificată utilizând diferiți co-monomeri.

7. Hidrogelurile pe bază p(HEMA) au fost folosite pentru protezarea țesuturilor moi, datorită caracteristicilor de biocompatibilitate, permeabilitate mare față de moleculele mici, hidrofilicitate mare și consistență moale. În plus, p(HEMA) are un conținut de apă similar cartilajului articular, prezintă rezistență la degradare, nu este absorbit de organism, suportă sterilizarea prin încălzire fără afectarea structurii și se poate obține într-o varietate mare de forme.

8. În cadrul tezei de doctorat alegerea s-a făcut pentru hidrogelurile pe bază de p(HEMA), a căror hidrofilie a fost modificată cu diferiți co-monomeri pentru a obține un comportament fizico-chimic și mecanic asemănător cu cel al cartilajului articular. Pentru a evita necroza celulară după implantare, așa cum se întâmplă în cazul grefelor autologe și alogrefelor, precum și în cazul unor polimeri naturali [21], în cadrul acestei teze de doctorat alegerea s-a făcut pentru hidrogelurile fără culturi de celule.

CAPITOLUL II

STRATEGIA EXPERIMENTALĂ

II.1. CONCEPT EXPERIMENTAL

O mare varietate de biomateriale sunt utilizate astăzi în chirurgia plastică și reconstructivă, stomatologie și refacerea mușchilor, oaselor și cartilajului articular.

Polimerii candidați pentru utilizări biomedicale trebuie să prezinte o serie de caracteristici legate de structura lor fizico-chimică și mecanică (proprietăți chimice și mecanice) și de interacțiunea cu mediului fiziologic unde vor fi utilizați (condiții fiziologice). Deși se află la dispoziție un număr mare de materiale polimerice, biocompatibilitatea și proprietățile mecanice au restrâns sever numărul actual de polimeri ce pot fi folosiți în

domeniul medical. Evaluarea performanțelor acestor polimeri este imperios necesar a se realiza în condiții de testare care să imite condițiile fiziologice, astfel încât rezultatele evaluării să descrie cât mai fidel comportarea *in vivo* a materialului.

Biomaterialele trebuie să fie aibă un grad mare de puritate și de aceea precursorii și materiile prime folosite trebuie să aibă un grad mare de puritate, și de asemenea, folosirea unor aditivi nu este recomandată. Pentru o perioadă mai scurtă sau mai lungă de timp, migrarea acestor componente la țesuturile adiacente și fluidele biologice este nedorită, de aceea compușii nereacționați trebuie eliminați înainte de utilizare.

O serie de proprietăți favorabile ale polimerilor pot fi obținute nu prin utilizarea de aditivi ci prin varierea structurii chimice, de exemplu prin alegerea utilizării de copolimeri și polimeri reticulați adecvați, în locul homopolimerilor.

Odată sintetizate, biomaterialele trebuie să îndeplinească numeroase cerințe, descrise ca fiind proprietățile chimice și mecanice ale polimerilor. Parametrii de interes includ: geometria dispozitivului implantului, gradul de umflare la echilibru, proprietățile elastice, răspunsul la solicitări de forfecare, comportarea vâsco-elastică în timp, posibilitatea de a îngloba și transporta principii active.

Analizând rezultatele științifice din domeniul dispozitivelor medicale utilizate pentru substituția cartilajului s-a optat pentru lucrarea de față la o strategie de cercetare care a avut ca obiectiv central:

STUDIUL MODIFICĂRII HIDROFILIEI HIDROGELURILOR PE BAZĂ DE P(HEMA) ASUPRA PROPRIETĂȚILOR FIZICO-CHIMICE, MECANICE ȘI DE UTILIZARE CA SUBSTITUENT DE CARTILAJ ARTICULAR

Mergând după aceste principii, s-a ales ca îmbunătățirea proprietăților hidrogelurilor pe bază de p(HEMA) să se realizeze prin introducerea în matricea tridimensională atât a unor comonomeri cu caracter puternic hidrofil (acid acrilic-AA, acrilamidă-AAm) sau hidrofob (acrilat de etil - AE, acrilat de butil - AB). Atât monomerii hidrofilii cât și cei hidrofobi au o rezistență mare la agenți de oxidare și de reducere. De asemenea acești monomeri au o rezistență mare la degradare sub acțiunea radiației laser și UV, precum și la degradarea termică.

Având în vedere caracterul foarte hidratat al cartilajului articular, s-a optat pentru realizarea de rețele tridimensionale prin copolimerizarea monomerilor HEMA cu unul dintre monomerii AA, AAm, AE sau AB cu un monomer bifuncțional cu rol de reticulant, tetraetilenglicol diacrilat (TEGDA). Ca sistem de inițiere pentru reacția de copolimerizare s-a utilizat un sistem redox format din persulfat de amoniu (APS) și N,N,N',N'-tetraemtileten diamină (TEMED).

Caracterul hidrofil-hidrofob a fost controlat prin modificarea cantității de comonomer luată în experimentare, în timp ce cantitatea de agent de reticulare (TEGDA) s-a păstrat constantă. Sistemul de inițiere s-a utilizat la o concentrație de 1 moli% față de amestecul total de monomer.

Caracterizarea hidrogelurilor a avut drept scop analiza compozițională și structurală a materialelor sintetizate (spectroscopie în infraroșu, degradare termică, precum și determinarea tensiunii superficiale), analiza morfologică (microscopie electronică de baleiaj-SEM), evaluarea proprietăților de interacțiune cu apa și fluide de interes biologic.

Pentru selecția hidrogelurilor cu caracteristici mecanice similare cu a cartilajului articular au fost realizate teste la solicitare de compresiune și forfecare. Însă pentru verificarea omogenității hidrogelurilor obținute, testele mecanice realizate la scară macro s-au verificat și la scară nano, astfel încât să se selecteze hidrogeluri cu o structură omogenă și cu aceleași proprietăți mecanice și în volum precum și la suprafață.

Una dintre cele mai importante caracteristici mecanice ale cartilajului articular o reprezintă coeficientul de frecare foarte mic dar și uzura mică, ceea ce îl face un material performant din punct de vedere tribologic. În biomecanica articulară, tribologia se ocupă cu studiul forțelor care permit ca două corpuri solide alăturate să se deplaseze unul pe celălalt, deplasare ce se realizează prin intermediul forțelor tangențiale.

Prin urmare, hidrogelurile sintetizate au fost evaluate din punct de vedere al proprietăților tribologice, s-a analizat coeficientul de frecare obținut și s-au comparat valorile obținute cu cele specifice cartilajului articular. Studiile au fost realizate prin metode de evaluare la scară macro, cât și prin teste nanotribologice.

În hidrogelurile sintetizate s-au încorporat principii active utilizate în tratarea inflamațiilor cartilajului articular, mecanismul de încorporare a fost unul prin difuzie, pentru a nu modifica proprietățile mecanice ale hidrogelurilor. Astfel, hidrogelurile s-au încărcat cu ibuprofen și ketoprofen, gradul de încărcare fiind dependent de hidrofilia hidrogelului, morfologia materialului și solubilitatea medicamentului în mediu de încărcare. Ulterior s-a analizat posibilitatea eliberării principiilor active din hidrogelurile sintetizate și s-a analizat mecanismul de difuzie a compusului terapeutic pentru materialele cu proprietăți mecanice apropiate de cele ale cartilajului articular.

Toate testele s-au efectuat în condiții care simulează pe cele fiziologice sau patologice ale cartilajului articular. Astfel testele au fost realizate în soluție tampon 7 sau, datorită faptului că hidrogelurile sunt pH-senzitive, s-a urmărit și comportamentul lor la diferite valori de pH (pH 3 și 9).

CAPITOLUL III

SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA HIDROGELURILOR

III.1. SINTEZA HIDROGELURILOR PE BAZĂ DE HEMA ȘI COMONOMERI CU CARACTER HIDROFIL SAU HIDROFOB

Hidrogelurile au fost sintetizate prin metoda de polimerizare radicalică, procedeul adoptat fiind de polimerizare în masă. Polimerizarea radicalică între monomeri și reticulant duce la formarea de zone reticulate mai mult sau mai puțin dense, în rețeaua de hidrogel; aceste tipuri diferite de reticulare poate să introducă neomogenități spațiale în rețeaua hidrogelurilor.

În reticularea chimică, lanțurile de polimer sunt reticulate la diferite segmente, cu diferite lungimi. Sub acțiunea de comprimare, deformarea este localizată cel mai adesea pe cele mai scurte lanțuri de polimer, și, ca urmare, rețeaua reticulată este distrusă. Acest

comportament mecanic la nivel molecular este de asemenea, susținut la nivel macro; astfel, hidrogelurile convenționale sunt fragile din punct de vedere mecanic. Pentru îmbunătățirea proprietăților fizico-chimice și mecanice ale hidrogelurilor p(HEMA), ele au fost copolimerizate printr-o reacție de polimerizare radicalică cu monomeri având caracter hidrofil (AA, AAm), sau hidrofob (AE, AB). Pentru a obține structura reticulată, ca agent de reticulare s-a folosit TEGDA.

Sistemul de inițiere redox utilizat pentru fabricarea gelurilor chimice prin polimerizare radicalică este constituit din APS și TEMED [22,23]. Un sistem ideal de inițiere trebuie să declanșeze reacția de polimerizare ușor, într-un timp scurt, și fără să inițieze producerea de produși citotoxici. Duan și colaboratorii [24] au studiat mecanismul de inițiere APS/TEMED, și au arătat că acest sistem are o toxicitate mică. Viteza de polimerizare este mărită, prin urmare scade durata procesului de sinteză a hidrogelului.

Gradul de umflare în soluții de interes biologic a fost controlat prin modificarea cantității de comonomer luată în experimente, variindu-se concentrația între 5 și 25% (molar/molar). Cantitatea de reticulant TEGDA a fost de 5 % (molar/molar) față de amestecul total de monomeri (HEMA+comonomer), iar inițiatorul a reprezentat 1 % (molar/molar) față de amestecul total de monomeri (incluzând agentul de reticulare). Soluțiile de inițiatori au fost preparate în concentrații de 5% (procente masice, în apă distilată). Componentele s-au amestecat în ordinea prezentată în tabelul 5 în fiolă de cântărire și s-a amestecat ușor cu o spatulă pentru omogenizarea amestecului.

Tabelul 5. Exemplu de cantități calculate pentru sinteza de hidrogelurilor HEMA 5%AA

Substanța	Cantitatea (ml)
HEMA	8,85
AA	0,48
TEGDA	0,05
APS	3,65
TEMED	1,85

După omogenizare, amestecul s-a turnat într-o matriță din ceramică emailată (Figura 62) pentru obținerea de suprafețe cât mai puțin rugoase. Amestecurile turnate în matriță au fost menținute timp de 24h la temperatura camerei, pentru definitivarea formării hidrogelurilor.

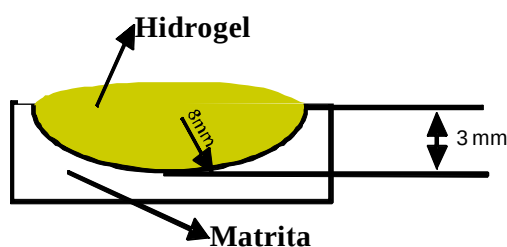
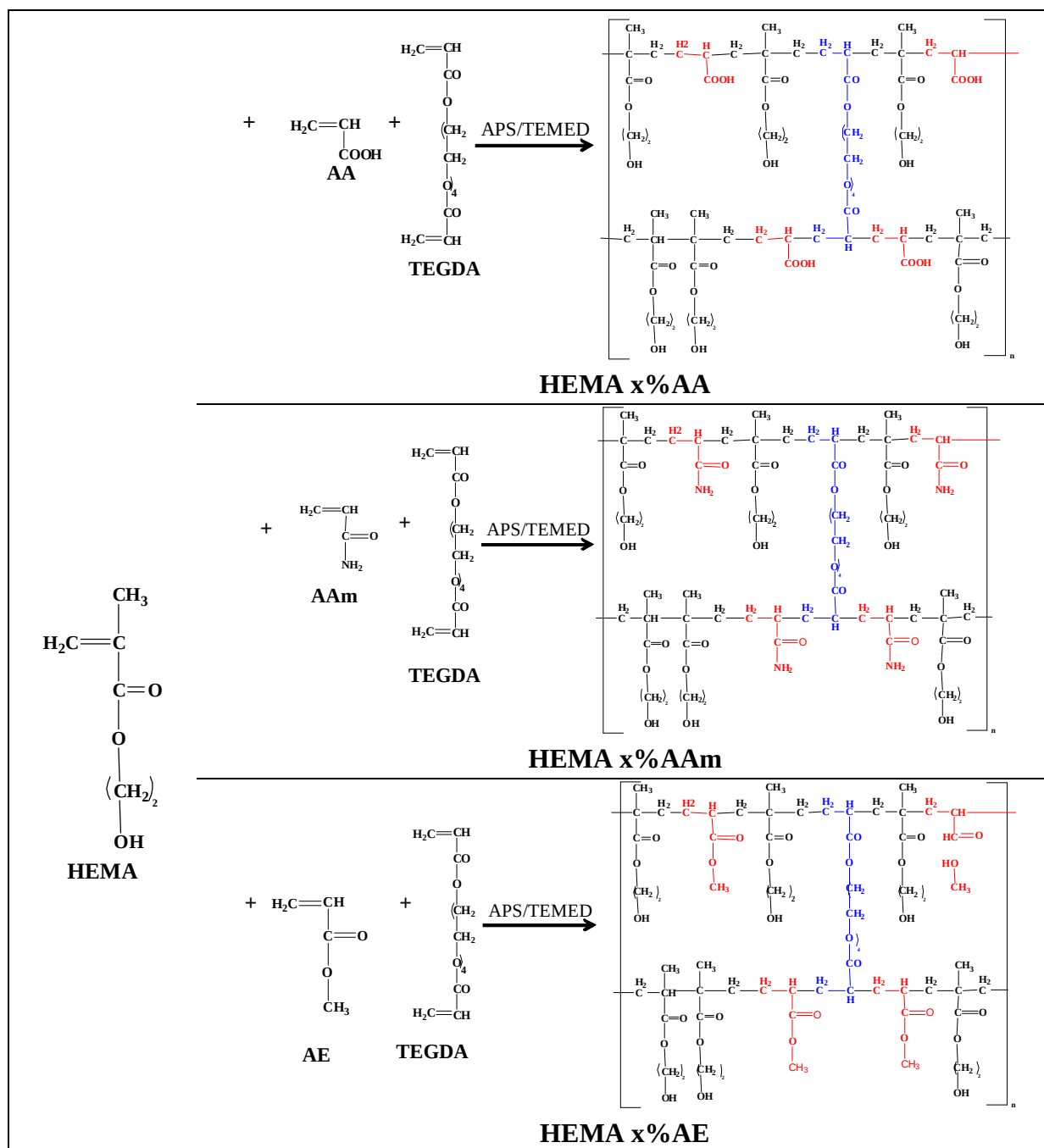


Figura 62. Reprezentarea schematică a matriței de sinteză a hidrogelurilor

Pentru a controla cât mai bine parametrii de reacție (aparitia de bule în structură, datorită unei viteze mari de reacție care nu lasă să iasă tot aerul din hidrogel), polimerizarea a avut loc în condiții anaerobe. Substanțele au fost degazeificate înainte de a fi folosite, iar polimerizarea a avut loc sub vid, pentru a evita formarea bulelor de aer în hidrogeluri.

Hidrogelurile obținute au fost purificate prin spălare cu apă distilată, timp de 5 zile, pentru a se îndepărta restul de produși nereacționați, schimbând zilnic apa. Acest lucru a fost evidențiat prin măsurarea valorii pH-ului, iar apa distilată a fost schimbată până când valoarea pH-ului soluției de spălare nu a fost diferită de a apei distilate.

Schema reacțiilor de polimerizare radicalică este prezentată în figura 63.



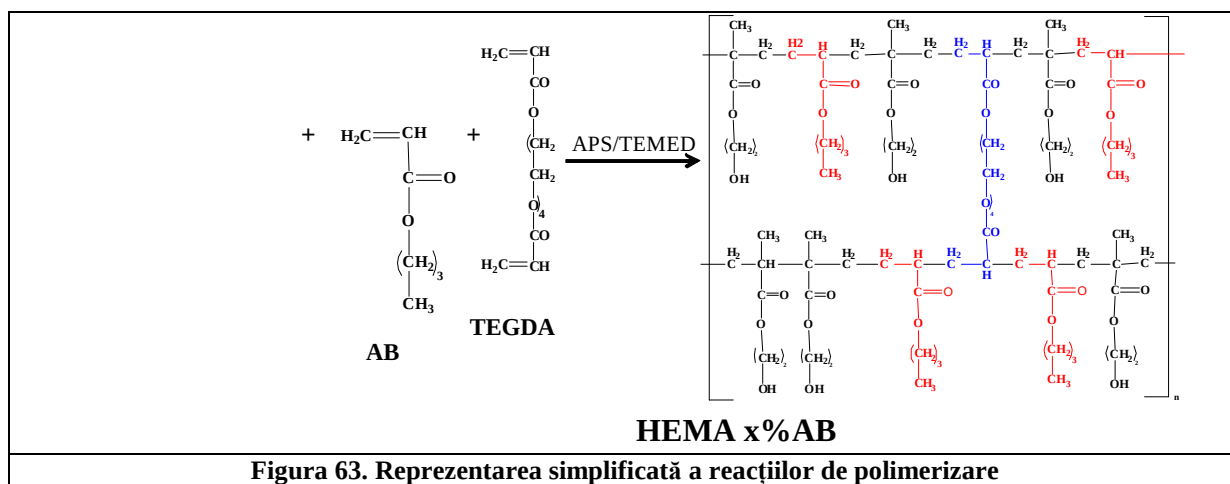


Figura 63. Reprezentarea simplificată a reacțiilor de polimerizare

Prin copolimerizarea HEMA cu AA sau AAm, în prezență de reticulant TEGDA se obțin hidrogeluri cu hidrofilie crescută, prin introducerea în structura materialului a grupelor –COOH sau –NH₂, materialele obținute fiind sensibile la variația pH-ului mediului.

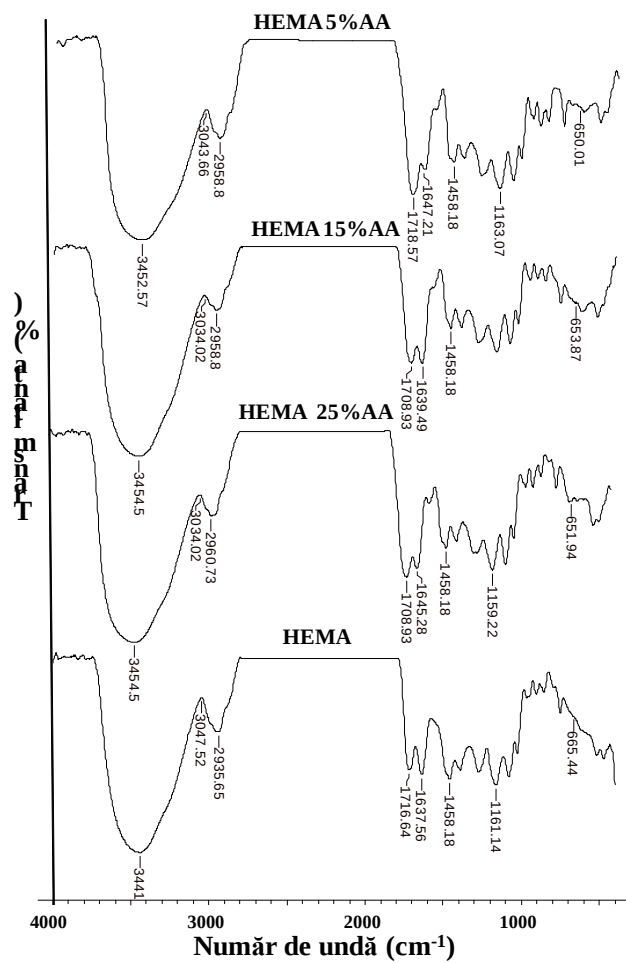
Prin copolimerizarea HEMA cu AE sau AB, în prezență de reticulant TEGDA se obțin hidrogeluri cu hidrofilie redusă față de a hidrogelurilor p(HEMA); caracteristicile de umflare, în acest caz, sunt controlate atât de interacțiuni prin legături de hidrogen, cât și ca urmare a organizării componentului hidrofob în matricea polimerică hidrofilă.

III.2. CARACTERIZAREA HIDROGELURILOR

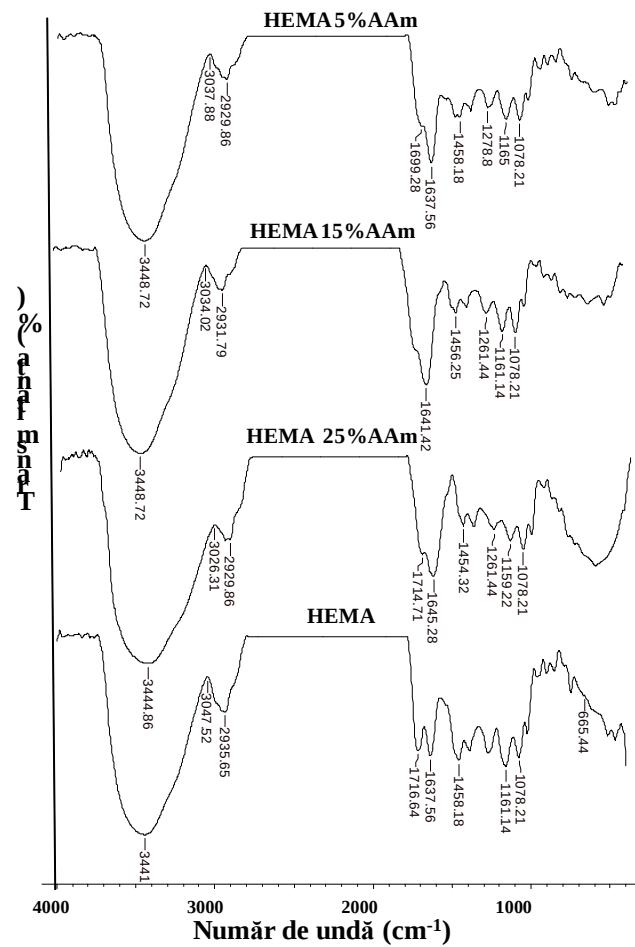
III.2.1. Analiza prin spectroscopie FTIR

Analiza spectrală FTIR s-a bazat pe identificarea benzilor de absorbție care corespund vibrațiilor grupelor funcționale din molecule, în domeniul 400-4000 cm⁻¹. În urma reacției de polimerizare se produce o scindare a legăturii duble C=C, care are un pic de absorbție în FTIR la 1636 cm⁻¹. Acest pic nu apare în nici unul din spectrele hidrogelurilor sintetizate, ca rezultat că polimerizarea a avut loc.

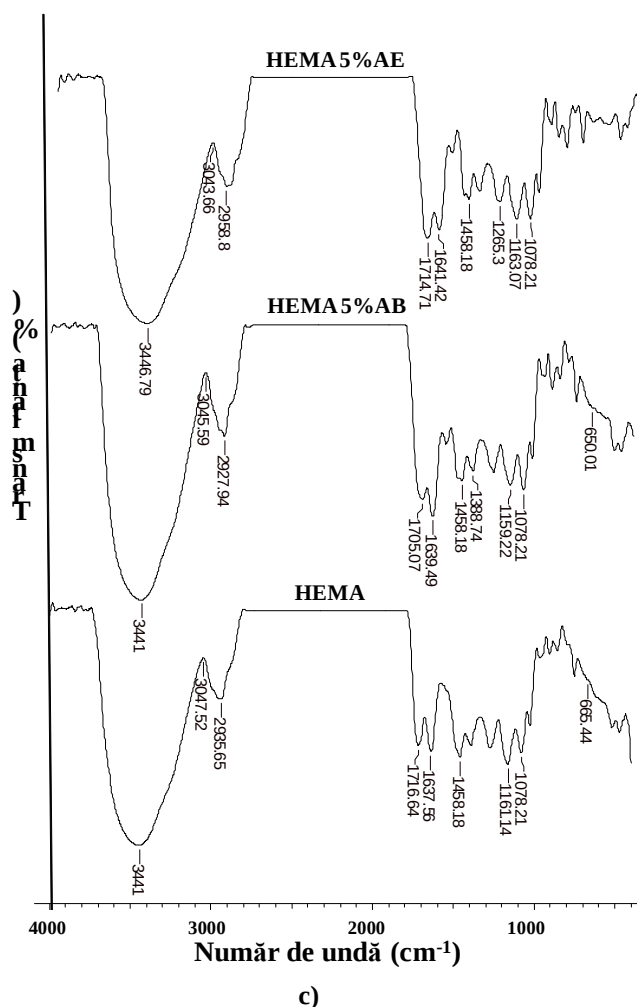
Spectrele de absorbție ale hidrogelurilor sintetizate sunt prezentate în figura 64.



a)



b)



c) **Figura 64. Spectrele FTIR pentru hidrogelurile sintetizate:**

- a) hidrogeluri pe bază de HEMA și AA
- b) hidrogeluri pe bază de HEMA și AAm
- c) hidrogeluri pe bază de HEMA și AE, AB

Pentru toate hidrogelurile sintetizate, apar benzi de absorbție specifice pentru HEMA și comonomerii folosiți: picul caracteristic la $\sim 1730 \text{ cm}^{-1}$ este datorat prezenței vibrației de întindere C-O din TEGDA, iar picul de cel de la $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ corespunde legăturii C=O.

Grupărilor OH ale HEMA sunt reprezentate de picul $\sim 3440 \text{ cm}^{-1}$ iar cele CH_3 corespund picului 1458 cm^{-1} . Gruparea metil și metilen au pic caracteristic la $\sim 2960 \text{ cm}^{-1}$. La 1458 cm^{-1} este reprezentată formarea legăturii C-C dintre monomeri.

Picul caracteristic observat la 650 cm^{-1} este datorat vibrației în plan a legăturii -OH a grupărilor carboxilice ale AA. În cazul hidrogelurilor cu acrilamidă, pe lângă picurile caracteristice HEMA apare banda de absorbție de la 1261 cm^{-1} care aparține legăturii C-N.

Odată cu creșterea procentului de comonomer, se poate observa o creștere a intensității benzii -OH ($\sim 3440 \text{ cm}^{-1}$), benzii corespunzătoare legăturii C=O ($\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$) și a benzii caracteristice grupării metil, ceea ce confirmă faptul că copolimerul este prezent în structura hidrogelurilor sintetizate.

Din spectrele FTIR rezultă faptul că reacția de polimerizare a avut loc cu succes.

III.2.2. Analize termice

III.2.2.1. Analiza termogravimetrică

Pentru caracterizarea stabilității termice se determină temperatura la care începe degradarea termică a polimerului. Practic, odată cu inițierea degradării termice se modifică masa moleculară a acestuia [3]. Se consideră valori maxime ale temperaturilor pentru stabilitatea polimerului respectiv, temperatura la care masa probei a pierdut 1% din masa inițială. Se poate observa cu ușurință (Figura 62) că procesul de degradare termică a hidrogelurilor se manifestă cu intensitate maximă atunci când panta este maximă, deci derivata pierderii de masă are un maxim.

Flexibilitatea sistemelor polimerice este legată de morfologia, geometria și activitatea chimică. Termogramele înregistrate în condițiile menționate în capitolul 2, cuprind curbele TG ale hidrogelurilor sintetizate (Figura 66) și indică existența a două sau trei etape de degradare termică. Descompunerea termică are loc în două sau trei domenii distincte. În prima etapă pierderile procentuale de masă sunt mai mici de 10%. Principalele caracteristici termogravimetrice sunt prezentate în tabelul 6.

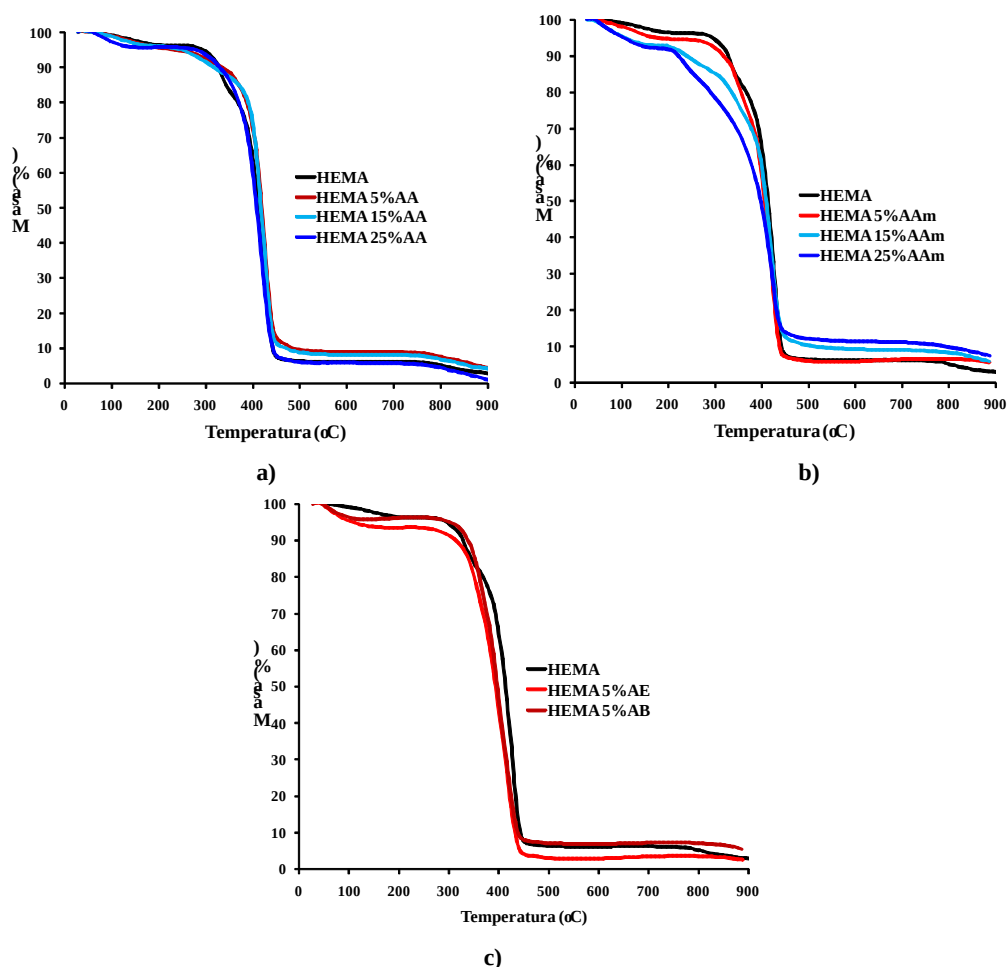


Figura 65. Termogramele hidrogelurilor sintetizate:

- a) hidrogeluri pe bază de HEMA și AA
- b) hidrogeluri pe bază de HEMA și AAm
- c) hidrogeluri pe bază de HEMA și AE, AB

Tabelul 6. Principalele caracteristici termogravimetrice

PROBA	ETAPA	Tonset	Tpeak	Tendset	W%	Reziduu
H MA	I	71	89	188	4	2,6
	II	294	335	381	18,2	
	III	381	426	445	75,2	
HEMA 5%AA	I	54	72	138	5	0
	II	331	419	450	95	
HEMA 15%AA	I	91	195	195	5,5	3,5
	II	362	425	449	91	
HEMA 25%AA	I	62	123	164	4,4	3,3
	II	251	285	392	11	
	III	392	423	443	81,3	
HEMA 5%AAm	I	64	163	316	5,75	5.37
	II	316	353	388	25,32	
	III	388	421	440	63,56	
HEMA 15%AAm	I	50	55	147	6,92	5,48
	II	325	337	380	26,60	
	III	380	421	445	61	
HEMA 25%AAm	I	46	57	141	8	6
	II	209	229	360	60	
	III	360	421	439	26	
HEMA 5%AE	I	44	62	120	7	2
	II	322	414	440	91	
HEMA 5%AB	I	43	60	104	5	6

Tonset – temperatura la care începe degradarea termică în fiecare etapă,

Tpeak – temperatura la care viteza de degradare din fiecare etapă este maximă,

Tendset – temperatura la care se termină degradarea termică în fiecare etapă,

W% pierderea procentuală de masă din fiecare etapă, reziduu – cantitatea de probă degradată ce rămâne la temperatură mai mare de 700°.

Din rezultatele obținute se poate observa că hidrogelurile sintetizate au o stabilitate termică mai mare decât ale hidrogelului HEMA, iar această stabilitate crește, în general, odată cu creșterea procentului de comonomer folosit la sinteză. Aceste rezultate sunt în concordanță cu rezultatele obținute din spectrele FTIR.

O evaluare corectă se poate face abordând procesul de degradare termică din punctul de vedere al cineticii sale care, fiind în speță un proces cinetic, poate fi modelat cu ajutorul ecuației lui Arhenius. Utilizând acest model se pot determina parametrii specifici ai procesului de degradare termică precum ordinul de reacție n (pe baza căruia se pot obține informații privind mecanismul de degradare) și energia de activare a procesului de descompunere termică (E_a) (Tabelul 7).

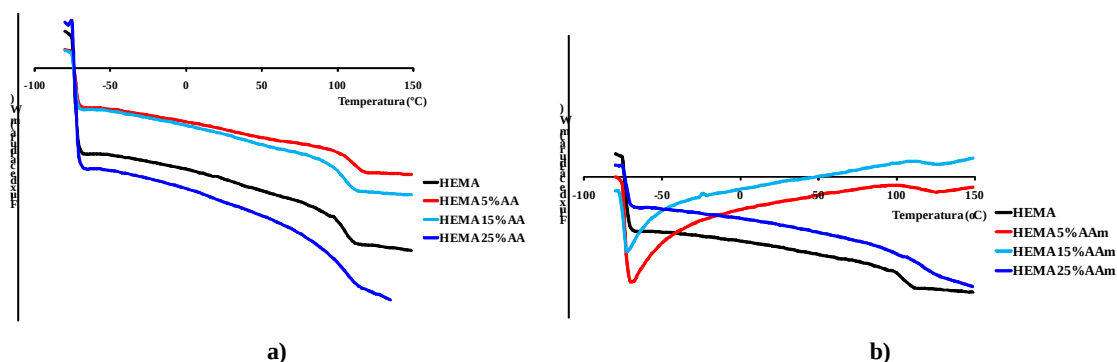
Tabelul 7. Valorile energiei de activare

PROBA	Ea (kJ/mol)	n
HEMA	144±0,77	0,44±4,41e-03
HEMA 5%AA	137±1,72	0,60±24,70e-03
HEMA 15%AA	252±1,19	1,06±1,09e-03
HEMA 25%AA	304±2,69	1,24±15,33e-03
HEMA 5%AAm	134±2,05	0,47±12,66e-03
HEMA 15%AAm	113±2,30	1,06±7,5e-03
HEMA 25%AAm	240±1,42	0,36±13,16e-03
HEMA 5%AE	70±1,36	0,34±19,56e-03
HEMA 5%AB	88±22,6	0,55±22,6e-03

Energia de activare crește, în general, odată cu creșterea procentului de comonomer adăugat, sugerând o îmbunătățire a stabilității termice a hidrogelurilor. Valoarea mică a ordinului de reacție sugerează faptul că la descompunerea termică a hidrogelurilor, procesele fizice de transport sunt mai importante decât cele chimice.

III.2.2.2. Analize de calorimetrie diferențială-DSC

Stările de tranziție relevă condițiile în care se modifică structura fizică și chimică a polimerului, cu consecințe asupra proprietăților fizico-mecanice și a performanțelor acestuia [25]. Din măsurătorile DSC au fost determinate temperaturile de tranziție sticloasă (T_g). T_g reprezintă temperatura la care matricea polimerului trece de la starea vitroasă la cea elastică asemănătoare cu cea din cauciuc. Pentru a putea obține valoarea T_g , proba trebuie încălzită, de aceea T_g -ul apare în termogramele DSC ca o etapă de tranziție și nu ca un pic (Figura 66). Hidrogelurile cu valoarea T_g mare au și o stabilitate termică în timp și la temperaturi ridicate (Tabelul 8).



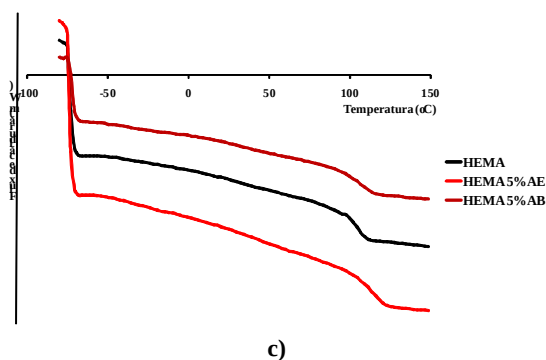


Figura 66. Curbele DSC pentru:
a) hidrogeluri pe bază de HEMA și AA
b) hidrogeluri pe bază de HEMA și AAm
c) hidrogeluri pe bază de HEMA și AE, AB

Tabelul 8. Valorile temperaturilor de tranziție

PROBA	Tg (°C)
HEMA	96
HEMA 5%AA	111
HEMA 15%AA	107
HEMA 25%AA	104
HEMA 5%AAm	120
HEMA 15%AAm	121
HEMA 25%AAm	106
HEMA 5%AE	113
HEMA 5%AB	110

Valoarea Tg a crescut cu adăugarea de comonomer, ceea ce ne confirmă îmbunătățirea proprietăților termice odată cu creșterea cantității de monomer hidrofil sau hidrofob.

III.3. ANALIZA MORFOLOGICĂ A HIDROGELURILOR: ESEM, SEM

III.3.1. Analiza hidrogelurilor prin ESEM

ESEM este o tehnică avansată a SEM-ului pentru caracterizarea hidrogelurilor. În timp ce tehnica SEM utilizează un vid înaintat pentru prevenirea interferenței aerului cu electronii secundari, ESEM-ul poate fi realizat într-un vid înaintat (până la o presiune de 10 Torr). Avantajul major al acestei tehnici constă în faptul că probele nu suferă alte tipuri de tratamente (acoperiri, deshidratare), iar atmosfera controlată va menține structura stabilă hidratată a hidrogelurilor. Pentru a asigura o rezoluție adecvată a micrografiilor, presiunea a

variat între 3-6 Torr, la o tensiune de accelerare de 30kV. Hidrogelurile au fost menținute la o temperatură de 5°C folosind un platan de răcire: această procedură a asigurat un mediu hidratat, prevenind astfel deshidratarea hidrogelurilor.

Cu ajutorul ESEM s-a putut examina suprafața și secțiunea transversală a hidrogelurilor sintetizate. Un exemplu tipic de micrografie ESEM în suprafață și în secțiune transversală pentru hidrogelul HEMA și cele sintetizate cu AA este prezentat în figura 67.

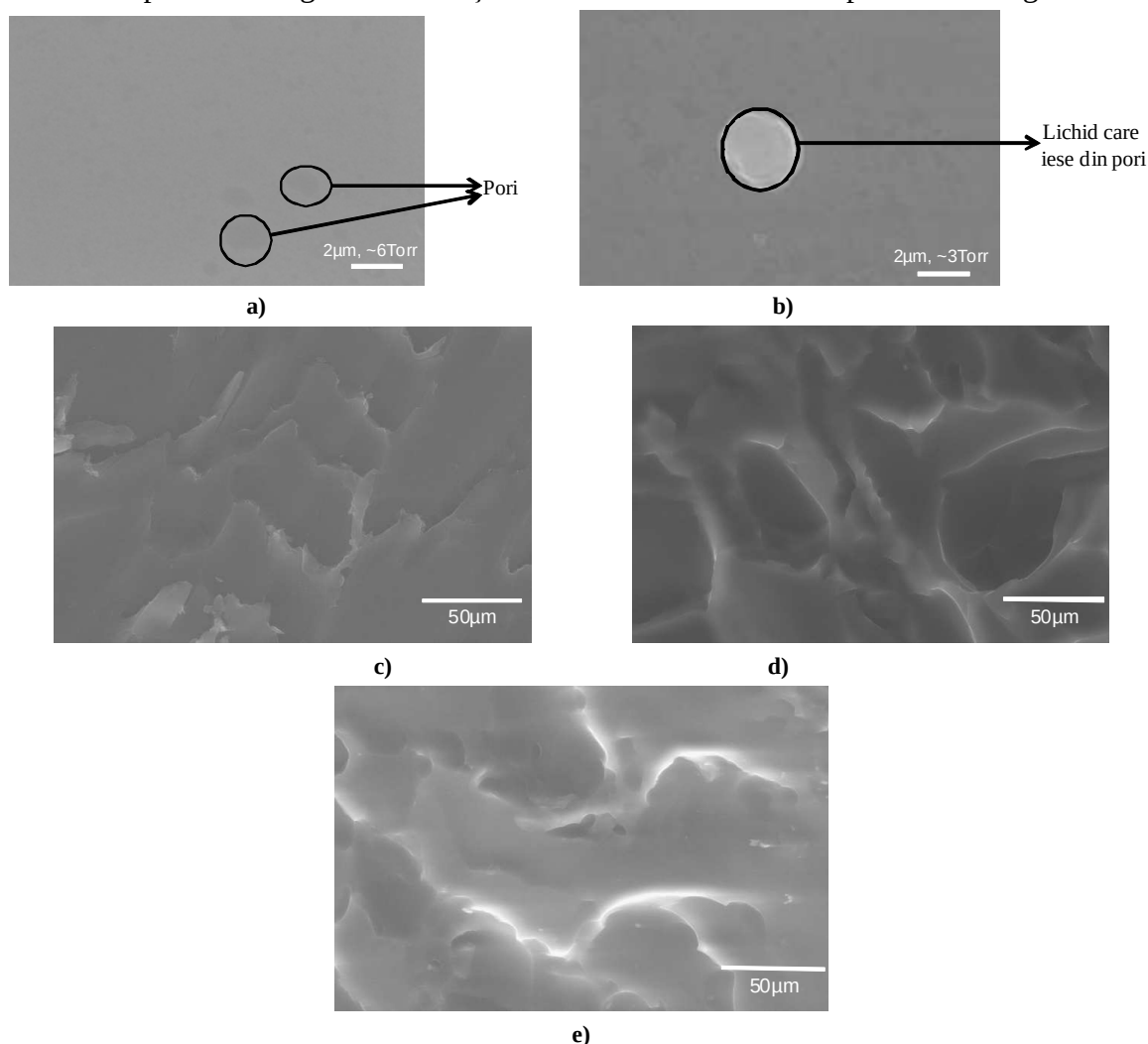


Figura 67. Micrografii ESEM ale suprafețelor și secțiunilor transversale ale hidrogelurilor:

- a) suprafața hidrogel la ~6Torr**
- b) suprafața hidrogel la ~3Torr**
- c) secțiune transversală hidrogel HEMA (~3Torr)**
- d) secțiune transversală hidrogeluri HEMA 5%AA (~3Torr)**
- e) secțiune transversală hidrogel HEMA 25%AA (~3Torr)**

Din micrografiile de suprafață ESEM se poate observa o structură microporoasă, cu pori de diametrul $\sim 2\mu\text{m}$. Cu toate că rezoluția nu este foarte bună la o presiune de ~ 3 Torr, atunci când presiunea crește (~ 6 Torr) se poate observa cum lichidul iese din acești pori, putând astfel concluziona, ca avem de-a face cu o structură microporoasă. Acest fapt se datorează matriței în care a fost realizată polimerizarea, și va ușura interpretarea testelor mecanice (capitolul V.2).

Din micrografiile ESEM în secțiune transversală se poate observa că prin copolimerizare se obține o structură poroasă mai bine definită față de hidrogelul HEMA. Prezența comonomerului determină formarea unei structuri mai laxe, cu pori sferici, fără zone compacte. Distribuția porilor este relativ omogenă în secțiune, porii având dimensiuni situate în jurul valorii de 50μm.

III.3.2. Analiza hidrogelurilor prin SEM

Cu ajutorul SEM s-a putut evidenția morfologia suprafeței hidrogelurilor în stare uscată. În figura 68 este prezentată microfotografia hidrogelurilor sintetizate cu conținut diferit de AA. Se poate observa o structură în care porii sunt închiși.

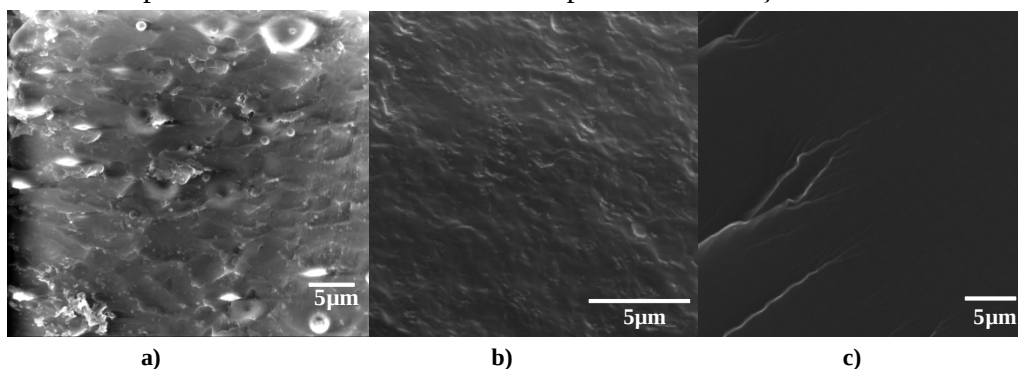


Figura 68. Micrografie SEM a suprafeței hidrogelurilor

a) HEMA

b) HEMA 5%AA

c) HEMA 25%AA

Hidrogelurile sunt sensibile la bombardarea cu electroni, de aceea, imaginea hidrogelului HEMA are artefacte cauzate de fasciculul de electroni. Însă cu toate acestea se poate observa că, prin adăugarea de comonomer AA morfologia structurii hidrogelurilor a devenit mai netedă.

III.4. TESTE DE UMFLARE

Proprietatea cea mai importantă a hidrogelurilor este aceea ca se umflă în prezența apei sau a lichidelor similare cu cele din organism, și se contractă în lipsa acestora. Gradul de umflare este determinat de natura lanțului polimeric și de densitatea de reticulare.

Conținutul ridicat în apă determină proprietățile mecanice, de difuzie și adsorbție ale hidrogelurilor, conferindu-le capacitatea de a simula țesuturile vii, în special endoteliul vaselor sanguine. În plus, permite mărirea fracțiunii de biomolecule legate la suprafață, controlând interacțiunile hidrogel - biopolimeri.

Datorită prezenței grupării carboxil, hidrogelurile pe bază de p(HEMA) manifestă o sensibilitate crescută la variații de pH.

Pentru a caracteriza gradul de umflare al hidrogelurilor, testele de umflare au fost realizate la diferite valori de pH de la 3 la 9. Soluțiile tampon cu diferite valori de pH au fost preparate prin amestecul de diferitelor cantități de TRIS cu acid clorhidric și apă pură. Clorura

de sodiu a fost adăugată pentru a stabili o tărie ionică de 0,5M, care este tăria ionică în condiții fiziologice.

Hidrogelurile au fost uscate și imersate în soluțiile tampon și termostătate în baie de apă, la temperatura de 37°C. Hidrogelurile au fost scoase la timpi diferiți, prestabiliți, iar excesul de soluție a fost îndepărtat ușor cu ajutorul unei hârtii de filtru, și cântărite.

Comportamentul la umflare al hidrogelurilor în diferite pH-uri este prezentat în figurile 70-72.

Hidrogelurile se umflă în toate condițiile de pH testate datorită absorbției apei în structura poroasă. Disocierea legăturilor de hidrogen, combinată cu forțele de repulsie electrostatice fac ca rețeaua de hidrogel să se umfle. p(HEMA) este un hidrogel neutru, cu puține grupări ionizabile pe catenele secundare, de aceea gradul de umflare este foarte mic indiferent de pH.

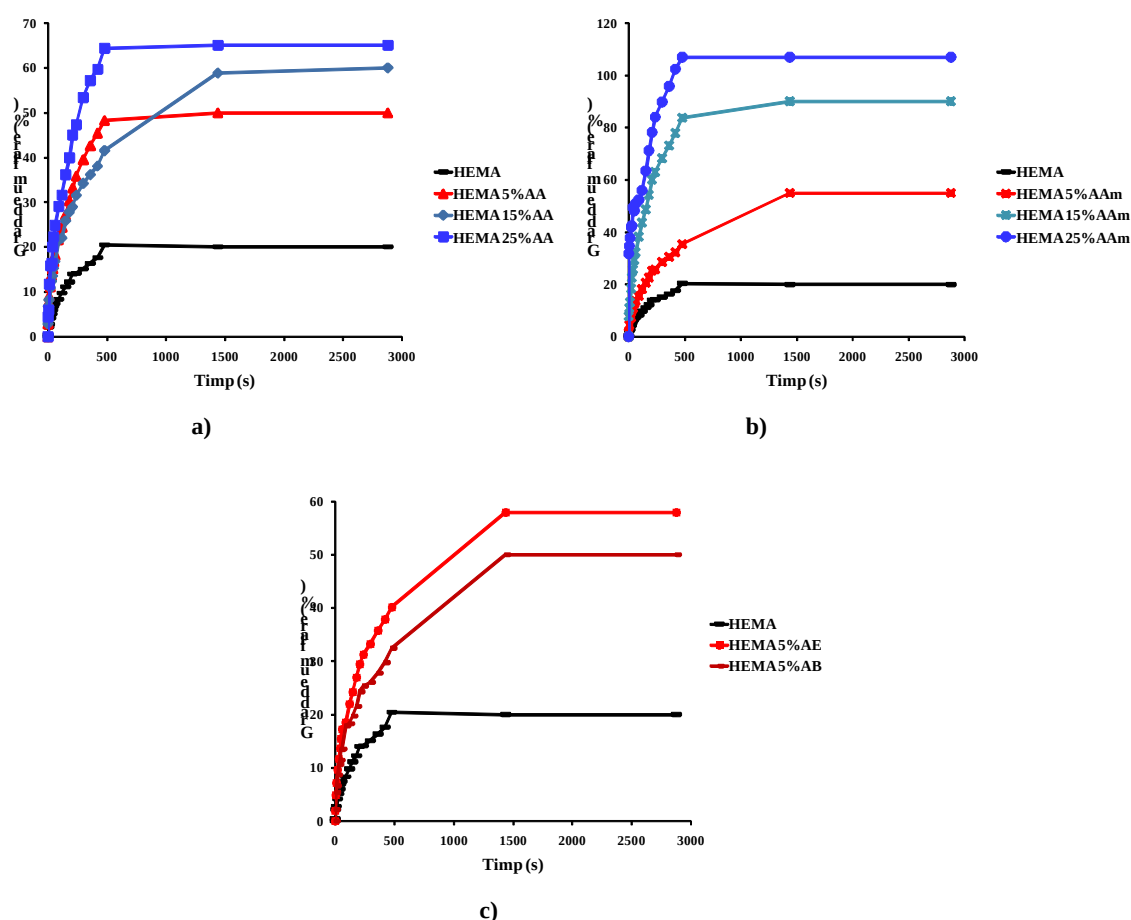


Figura 70. Cinetica de umflare a hidrogelurilor sintetizate, în mediu de pH 3:

a) hidrogeluri pe bază de HEMA și AA

b) hidrogeluri pe bază de HEMA și AAm

c) hidrogeluri pe bază de HEMA și AE, AB

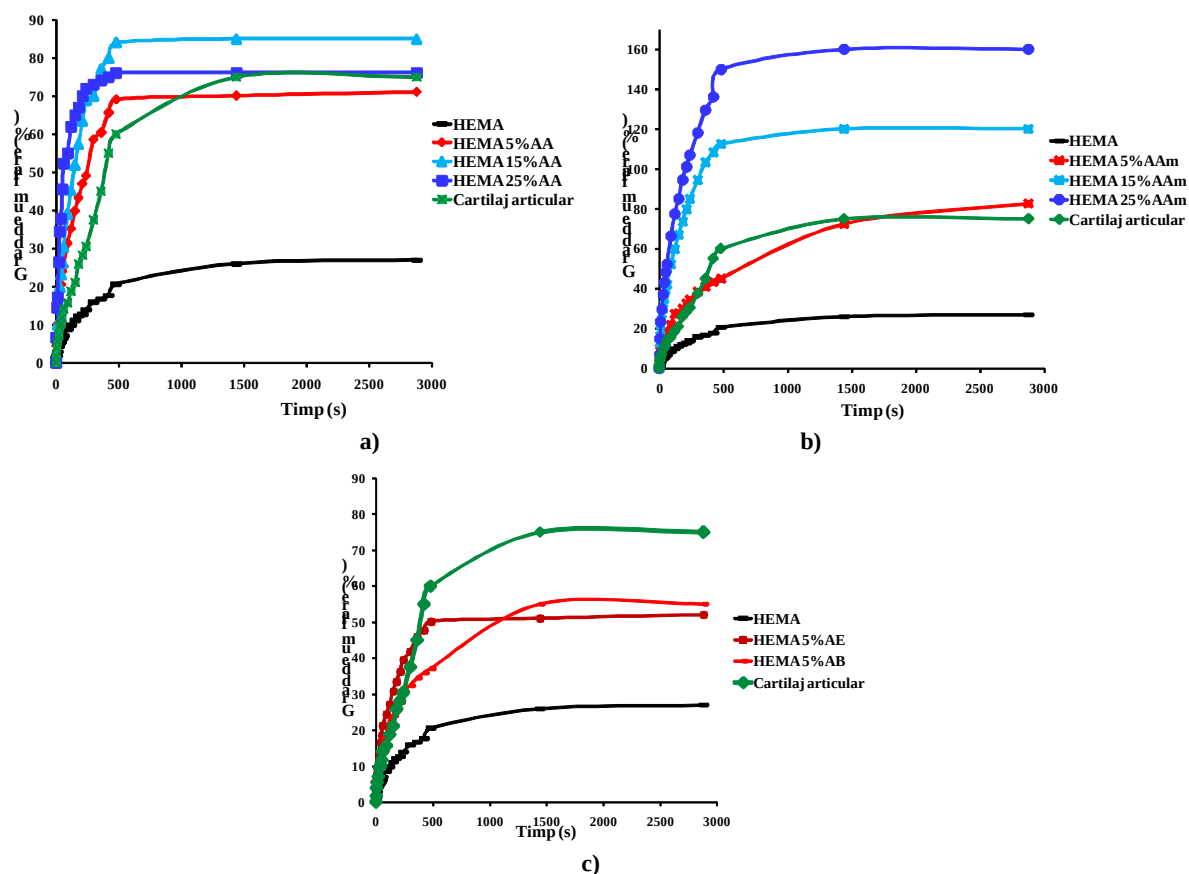
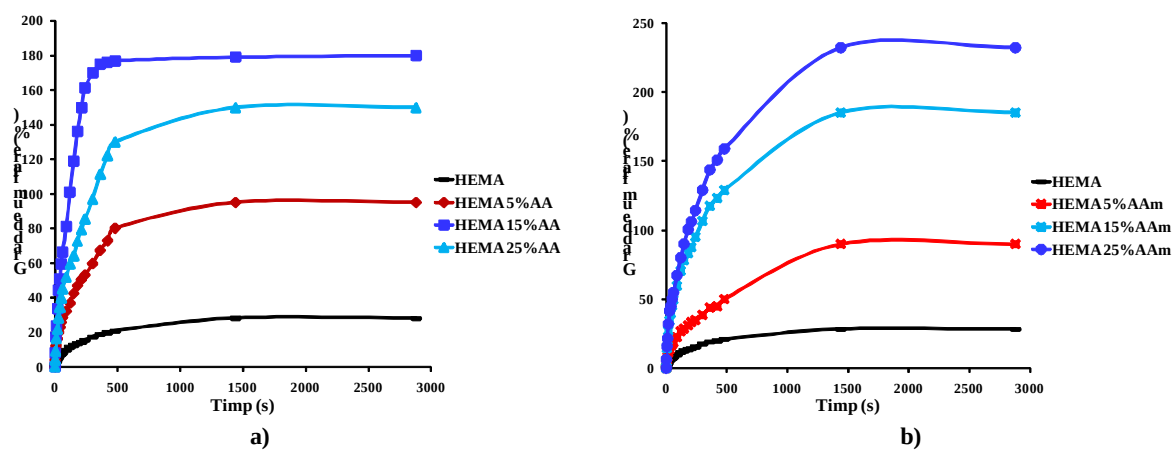


Figura 71. Cinetica de umflare a hidrogelurilor sintetizate în mediu de pH7:

a) hidrogeluri pe bază de HEMA și AA

b) hidrogeluri pe bază de HEMA și AAm

c) hidrogeluri pe bază de HEMA și AE, AB



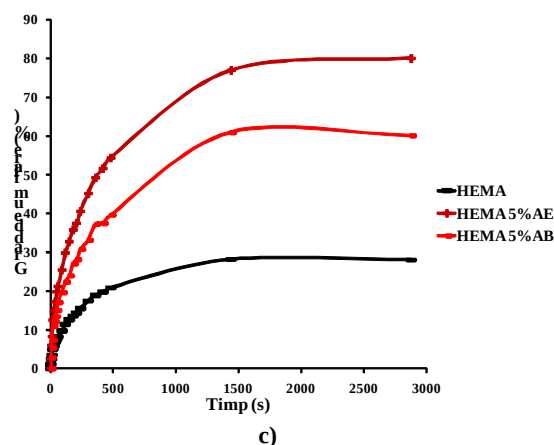


Figura 72. Cinetica de umflare a hidrogelurilor sintetizate în mediu de pH9:

a) hidrogeluri pe bază de HEMA și AA

b) hidrogeluri pe bază de HEMA și AAm

c) hidrogeluri pe bază de HEMA și AE, AB

În cazul conținutului de grupe carboxilice din copolimeri, gradul de umflare al hidrogelurilor crește cu creșterea pH-ului mediului, datorită repulsiilor electrostatice dintre formele ionizate ale grupelor carboxilice.

Diferențele în gradul de umflare pot fi explicate pe seama pH-ului: în mediu acid grupările $-\text{COOH}$ ale copolimerilor sunt nedisociate iar în mediu bazic sunt disociate. [26].

În stare disociată, au loc repulsiile electrostatice între grupele carboxilice anionice, determinând distanțarea acestora și creșterea volumului ocupat de moleculele de apă, fenomenul conduce la un grad de umflare mai mare.

În cazul aplicațiilor lor ca substitut de cartilaj articular, pH-ul este 7. Se observă o creștere a gradului de umflare odată cu creșterea procentului de comonomer.

În cazul monomerilor hidrofobi AE și AB, datorită hidrofobicității lor, se poate observa o scădere a gradului de umflare.

Se observă, de asemenea, că hidrogelurile HEMA 5%AA, HEMA 15%AA și HEMA 5%AAm au un comportament asemănător cu cel al cartilajului articular, în procesul de umflare.

În concluzie, protocolul experimental folosit ne-a permis îmbunătățirea și controlarea hidrofiliei hidrogelurilor HEMA astfel încât ele să aibă un comportament hidrofilic asemănător cu cel al cartilajului articular.

III.5. DETERMINAREA TENSIUNII SUPERFICIALE

Capacitatea de umezire/hidrofilia poate fi evaluată atunci când o picătură de lichid vine în contact cu o suprafață solidă. Gradul de umezire este determinat de forțele de coeziune dintre moleculele de lichid și forțele de adeziune care rezultă din interacțiunile moleculare dintre lichid și solid. Gradul de umezire este măsurat cu ajutorul unghiului de contact.

Cu scăderea unghiului de contact, gradul de umezire crește. Astfel, atunci când unghiul de contact atinge valori de 180° , gradul de umezire este minim. Gradul de umezire poate

fi explicat prin forțele de coeziune și cele de adeziune. O forță de adeziune mare în care coeziunea e mică va da unghiuri de contact foarte mici. Din momentul în care interacțiunile dintre solid și lichid se diminuează, iar forța de coeziune crește, gradul de umectare scade iar unghiul de contact crește.

Lucrul mecanic de adeziune (W_a) se poate calcula cu ajutorul relației Young-Dupree (relația 25):

$$W_a = \gamma(1 + \cos\theta) \quad (25)$$

unde: γ este tensiunea superficială;

θ este unghiul de contact.

Valorile lucrului mecanic de adeziune obținut în diferite medii pentru hidrogelurile de compoziție diferită, sunt prezentate în figura 74.

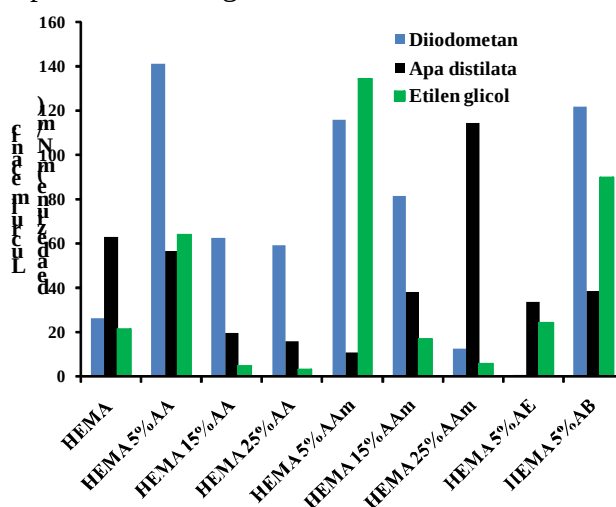


Figura 74. Valorile lucrului mecanic de adeziune

Lucrul mecanic de coeziune este definit ca forța necesară pentru a separa lichidul în mai multe părți, iar pentru calcul se folosește formula 26:

$$W_c = 2\gamma \quad (26)$$

Valorile obținute pentru hidrogelurile sintetizate sunt trecute în tabelul 9.

Tabelul 9. Valorile lucrului mecanic de coeziune pentru hidrogelurile sintetizate

Proba	Lucrul mecanic de coeziune (mN/m)
HEMA	70
HEMA 5%AA	144
HEMA 15%AA	86
HEMA 25%AA	78
HEMA 5%AAm	138
HEMA 15%AAm	130
HEMA 25%AAm	46
HEMA 5%AE	34
HEMA 5%AB	132

Deci unghiul de contact este invers proporțional cu gradul de umectare (Figura 75).

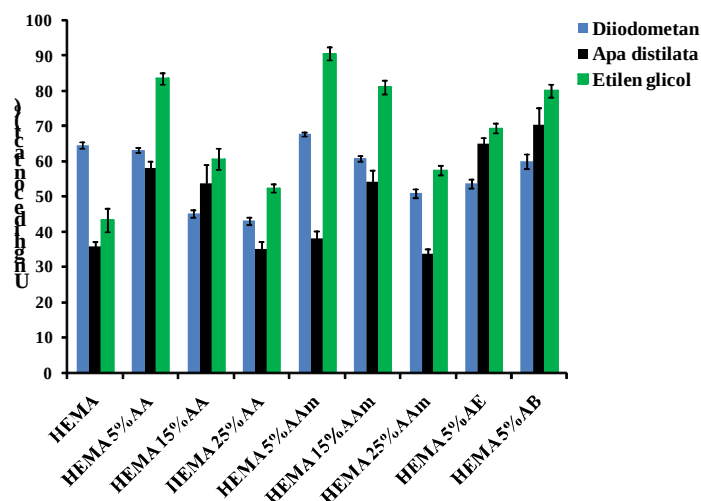


Figura 75. Valorile unghiului de contact pentru diferite lichide utilizate

Din valorile de unghi de contact s-a calculat tensiunea superficială pentru hidrogelurile sintetizate, prezentate în tabelul 10.

Tabelul 10. Valorile tensiunii superficiale

Proba	Tensiunea superficială (mN/m)
HEMA	35
HEMA 5%AA	72
HEMA 15%AA	43
HEMA 25%AA	39
HEMA 5%AAm	69
HEMA 15%AAm	65
HEMA 25%AAm	23
HEMA 5%AE	17
HEMA 5%AB	66

Tensiunea superficială este determinată de prezența legăturilor de hidrogen [27]. Astfel, adăugarea de comonomer duce la creșterea valorii tensiunii superficiale, deci este necesară o energie din ce în ce mai mare pentru a rupe legăturile din hidrogel.

Valorile unghiului dinamic, ne dă relații cu privire la textura suprafeței testate, dacă este omogenă sau neomogenă. O suprafață omogenă este atunci când lichidul va umple toate rugozitățile de suprafață, deci va avea un histerezis mare [28]. Valorile obținute pentru hidrogelurile testate sunt prezentate în figura 76.

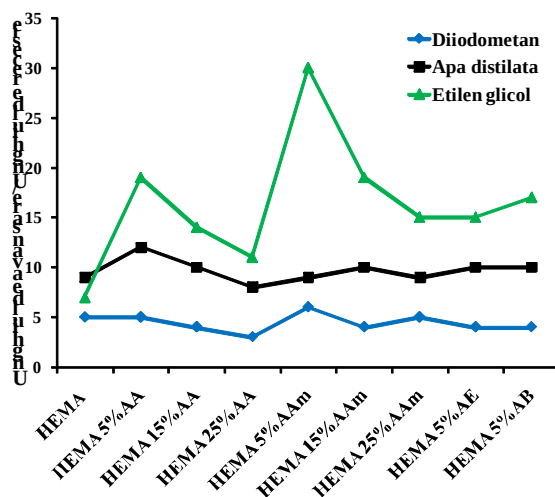


Figura 76. Valorile histerezisului obținut la măsurarea unghiului dinamic

Putem observa că valorile histerezisului scad cu adăugarea de comonomer, deci, va crește omogenitatea de suprafață a hidrogelurilor sintetizate.

CAPITOLUL IV

STUDII PRIVIND EVALUAREA BIOMECHANICĂ A HIDROGELURILOR

IV.1. DETERMINAREA CARACTERISTICILOR MECANICE LA COMPRESIUNE

IV.1.1. Stabilirea parametrilor experimentali

PROTOCOLUL EXPERIMENTAL

PROBELE: Hidrogeluri cu formă cilindrică, cu diametrul de 50mm, și o grosime de ~2mm, în stare hidratată în soluție tampon pH este 7. Pentru testarea cartilajului articular de pui au fost folosite eșantioane cu o grosime de 2mm și un diametru a părții bombate de 3 mm.

În cadrul experimentelor de compresie pot apărea două situații [29]:

- Hidrogelul are o frecare considerabilă, care nu poate fi neglijabilă la peretele platanului. În acest caz, pentru a putea evalua răspunsul mecanic din volumul hidrogelului, se va încerca să se mărească această frecare și să se imobilizeze hidrogelul la peretele platanului (Figura 77a).
- Hidrogelul are o frecare neglijabilă (~ 0). În acest caz, răspunsul mecanic al hidrogelului are două componente: o parte de alunecare, și una de compresie. Problemele care apar în acest caz, sunt legate de deformările

mari favorizate de o alunecare maximă, care poate induce fisuri în zona externă a hidrogelului (Figura 77b).

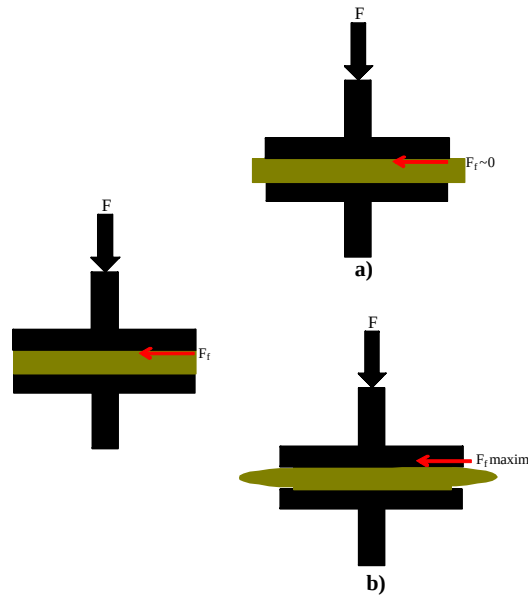


Figura 77. Condițiile limită la peretele platanelor reometrului:

a) alunecare maximă

b) aderență maximă

Pentru a preveni aceste probleme care apar la compresiunea unui hidrogel, s-a ales folosirea de hârtie abrazivă (cu granulație de $\sim 180\mu\text{m}$) lipite pe cele două platane ale reometrului, obținându-se astfel o aderență maximă la perete. Pentru a preveni fisurarea hidrogelului, au fost realizate comprimări de 20% din grosimea probei, într-un singur pas sau 4 comprimări de câte 5%.

Fiecare compresiune a fost urmată de o perioadă de relaxare de 600s, timp necesar pentru relaxarea completă a hidrogelului.

HIDRATAREA ȘI PRE-ÎNCĂRCAREA: Pentru a fi în aceleași condiții fiziologice ca și cartilajul articular, toate testele de compresiune au fost realizate în mediu hidratat, folosindu-se ca mediu de hidratare soluție tampon pH 7. Cu toate că platanele nu sunt propice pentru a realiza teste în mediu hidratat, a fost improvizat un platan astfel încât să permită efectuarea testelor în mediu hidratat, prin lipirea unui 'manșon' din plastic (Figura 78a).

Pentru uniformizarea rugozităților de suprafață, pentru fiecare test de compresiune, o pre-încărcare de 0,02N a fost exercitată asupra fiecărui hidrogel înainte de măsurători (ceea ce corespunde lui h_i , față de h_0 care reprezintă grosimea inițială (Figura 78b)).

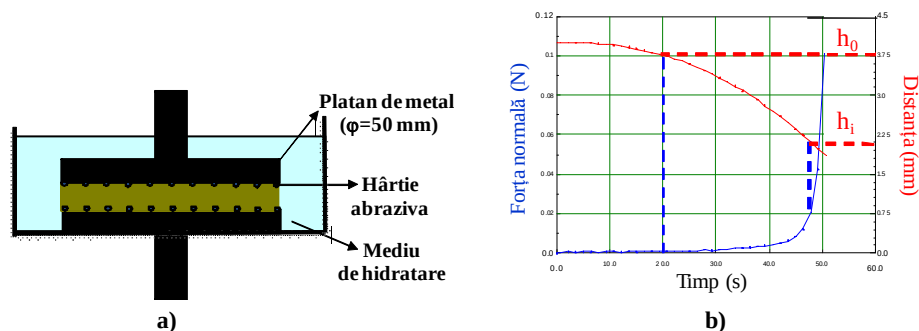


Figura 78. a) Dispozitivul final de testare în compresiune
b) Pre-încărcarea înainte de compresiune

CALCULUL SUPRAFEȚEI DE CONTACT (S): Aria de contact în cazul hidrogelurilor a fost considerată constantă, hidrogelurile având un diametru egal cu cel al platanelor, iar cu ajutorul hârtiei abrazive au aderat puternic la peretele platanelor. În cazul cartilajului articular, măsurarea suprafeței de contact a fost realizată prin comprimarea suprafeței cartilajului cu o lamă de sticlă (care asigură o pre-încărcare de 0,02N), iar cu ajutorul unui microscop optic s-a putut calcula aria de contact.

PROTOCOLUL DE COMPRESIUNE/RELAXARE: După pre-încărcare, au fost aplicate deformări într-un singur pas (~20%), sau în 4 pași, compresiune de 5% fiecare. Compresiunea a fost urmată de o perioadă de relaxare până la echilibru (600 s). Viteza de compresiune a fost aleasă constantă de 0,02 mm/s; această viteză este aleasă conform datelor bibliografice astfel încât să fie încadrată în intervalul de valori fiziologice ale solicitărilor cartilajului articular [30]. Acest protocol a fost ales pentru a determina caracteristicile de elasticitate ale hidrogelurilor sintetizate, în comparație cu cel al cartilajului articular.

IV.1.2. Rezultate și discuții

Testele reologice au fost realizate pe hidrogelurile sintetizate și pe cartilajul articular de pui. Graficul forței normale în funcție de timp ne permite să comparăm testele de comprimare realizate într-un singur pas de 20% sau în 4 pași de 5% fiecare (Figura 79).

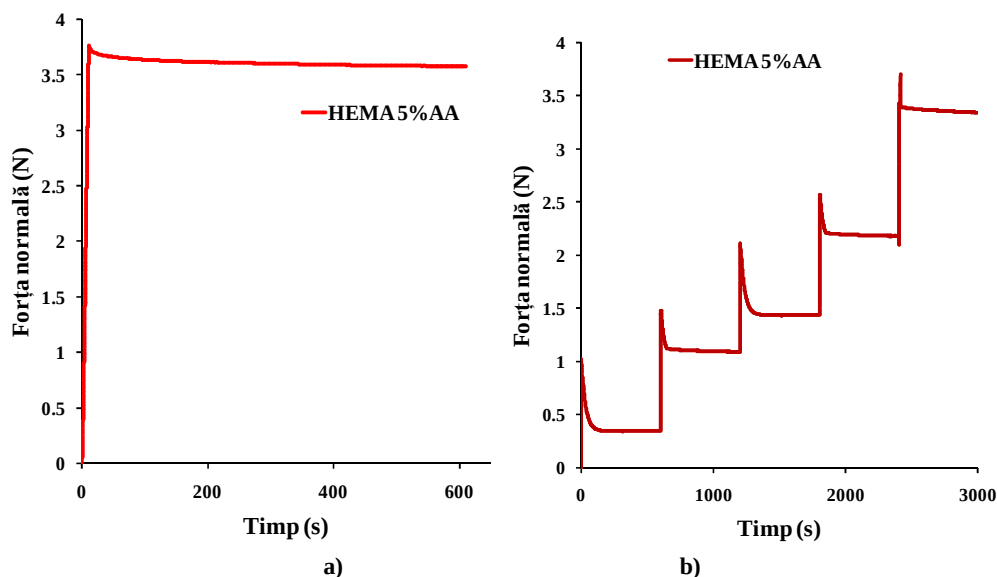
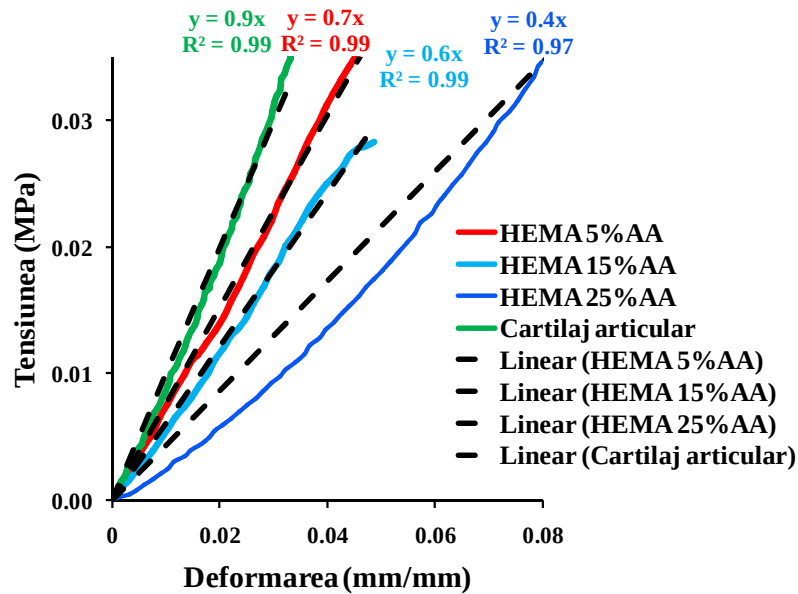


Figura 79. Curbe de compresiune de 20% față de grosimea hidrogelului:
a) compresiune în 5 pași de 4% fiecare din grosimea hidrogelului;
b) compresiune într-un singur pas de 20% din grosimea hidrogelului.

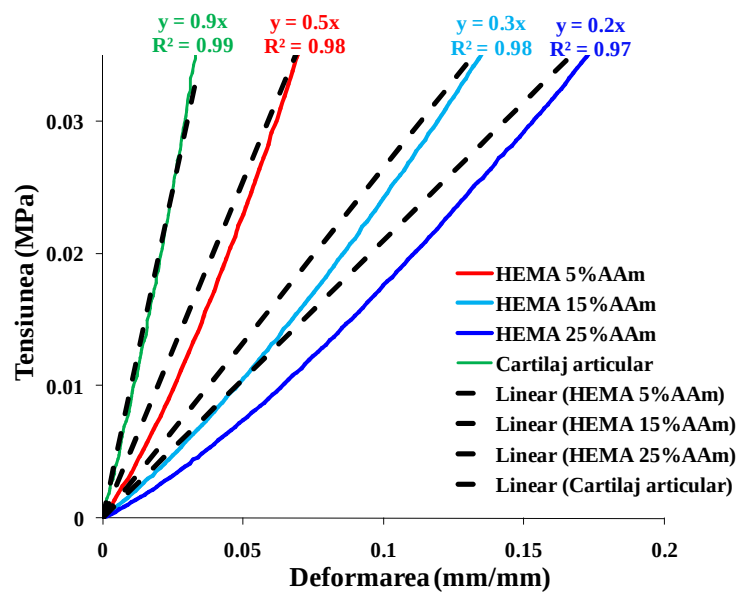
Din figura 77 se poate observa că avem același răspuns la comprimare fie că este în 5 pași sau un singur pas. Acest rezultat confirmă faptul că avem o reproductibilitate a rezultatelor referitoare la proprietățile de material, obținându-se același răspuns, indiferent de modul de aplicare a solicitării.

Pentru a cuantifica comportamentul la compresiune a hidrogelurilor în comparație cu cel al cartilajului articular, a fost calculat modulul elastic aparent, E^* . Conform legii lui

Hooke, E^* este calculat din panta părții liniare a curbei tensiune (σ este F/S) în funcție de deformare (ϵ). În cazul compresiunilor în 5 pași, s-a luat în considerare cele 5 picuri maxime de compresiune, în timp ce pentru compresiunea într-un singur pas, s-au luat în considerare toate valorile presiunilor corespunzătoare părții de compresiune a curbei (Figura 80).



a)



b)

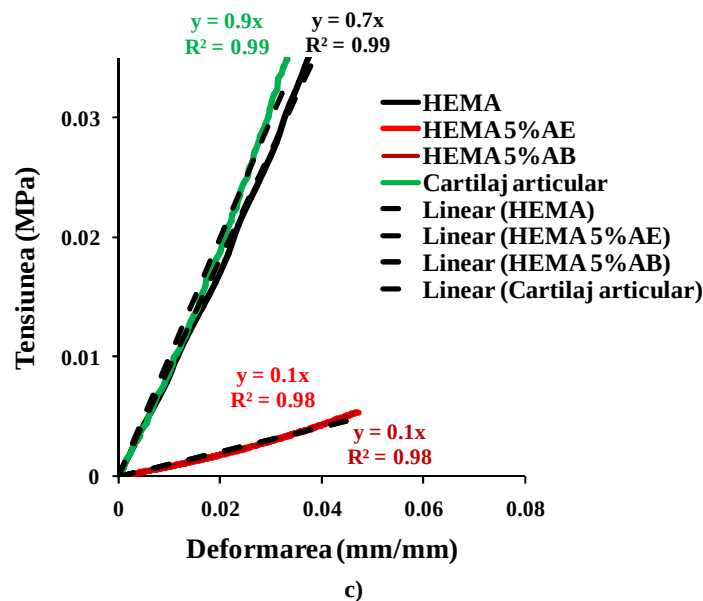


Figura 80. Curbele de compresiune pentru hidrogelurile sintetizate în comparație cu cartilajul articular, cu linia de regresie corespunzătoare:

- a) hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AA
b) hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AAm
c) hidrogel HEMA, hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomeri AE, AB

Se poate observa că răspunsul fiecărui hidrogel la compresiune este diferit în funcție de comonomerul folosit. Amplitudinea picurilor de compresiune, deci răspunsul imediat la compresiune, al hidrogelurilor cu HEMA, HEMA 5%AA este asemănător cu cel al cartilajului articular. Odată cu creșterea conținutului de comonomer, flexibilitatea lanțurilor polimerice crește, astfel încât, elasticitatea hidrogelurilor va crește cu creșterea procentului de comonomer adăugat. Astfel, modulul de elasticitate va scădea cu adăugarea de comonomer.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 11.

Tabelul 11. Valorile modulului de elasticitate aparent, E^* pentru hidrogelurile sintetizate și cartilajul articular

Proba	E^* (MPa)
HEMA	0,7±0,02
HEMA 5%AA	0,7±0,03
HEMA 15%AA	0,6±0,01
HEMA 25%AA	0,4±0,03
HEMA 5%AAm	0,5±0,02
HEMA 15%AAm	0,3±0,01
HEMA 25%AAm	0,2±0,03
HEMA 5%AE	0,1±0,01
HEMA 5%AB	0,1±0,04
Cartilaj articular	0,9±0,05

Se poate observa că hidrogelurile HEMA și cele cu comonomerul AA au un comportament asemănător cu cel al cartilajului articular.

IV.2. DETERMINAREA CARACTERISTICILOR DE VÂSCOELASTICITATE

PRINCIPIU: Aparatul folosit în acest caz a fost tot reometrul, folosit în aceeași configurație ca în testele de compresiune (Figura 78a). Însă, în cazul testelor de baleiaj de frecvență (FS) se păstrează constantă amplitudinea și se urmărește variația modulelor de forfecare și a tangentei unghiului de pierdere pe un domeniu larg de frecvențe. Baleiajul de frecvență oferă informații utile legate de structura internă a hidrogelului.

Condițiile de bază pentru efectuarea corectă a unei astfel de analize sunt:

- Proba aderă la ambele plăci și nu apar alunecări sau deplasări locale;
- Proba este deformată omogen în întreg spațiul de forfecare.

V.2. TESTE DE FRECARĂ LA SCARĂ NANOSCOPICĂ

IV.2.1. Stabilirea parametrilor experimentali

PROTOCOL EXPERIMENTAL

PROBELE: Hidrogeluri cu formă cilindrică, cu diametrul de 50mm, și o grosime de ~2mm în stare hidratată, în soluție tampon pH 7. Pentru testarea cartilajului articular de pui au fost folosite eșantioane cu o grosime de 2mm și un diametru a părții bombate de 3 mm.

IV.2.2. Rezultate și discuții

Testele reologice au permis analiza în condiții dinamice și oscilatorii, determinând astfel, în același timp modulul elastic și vâscos al materialelor polimerice.

Amândouă modulele au crescut odată cu frecvența aplicată, G' fiind mai mare ca G'' , indicând faptul că hidrogelurile testate au un comportament elastic solid la frecvențele studiate. Totodată, la ω mici, se pot observa câteva mici modificări ale G'' , și acestea pot fi atribuite componentei vâscoase ale hidrogelurilor (Figura 82).

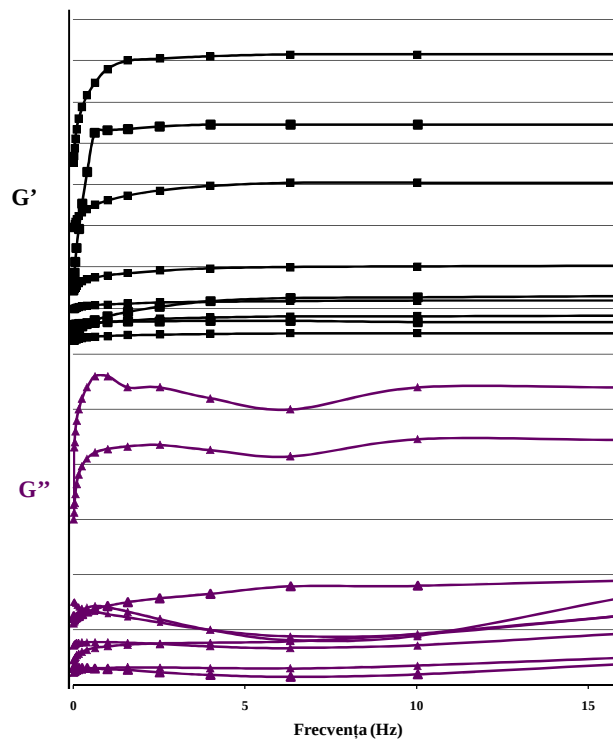


Figura 82. Reprezentarea lui G' și G'' pentru hidrogelurile obținute

Calcularea modulului de forfecare dinamic, G^* (Figura 83) a permis reprezentarea evoluției sale în funcție de frecvență aplicată.

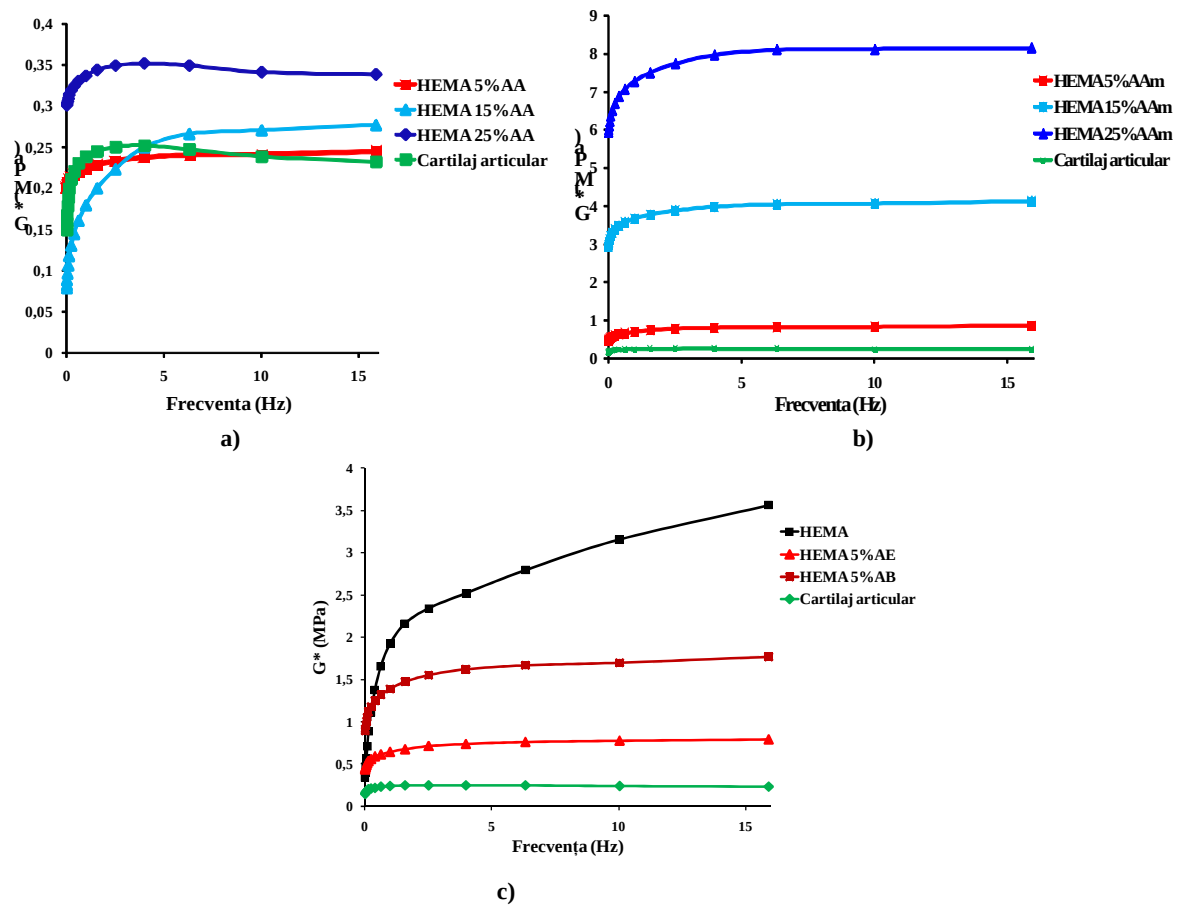


Figura 83. Modulul de forfecare aparent pentru hidrogelurile sintetizate în comparație cu cartilajul articular:

a) hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AA;

b) hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AAm;

c) hidrogel HEMA, hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomeri AE, AB.

Valorile $\tan(\delta) < 1$ indică prezența unei rețele interne stabile de forțe în probă, măsură a stabilității mecanice a acestora (Figura 82). Creșterea bruscă a valorii $\tan(\delta)$ relevă faptul că hidrogelurile au o structură formată dintr-o rețea permanentă reticulată.

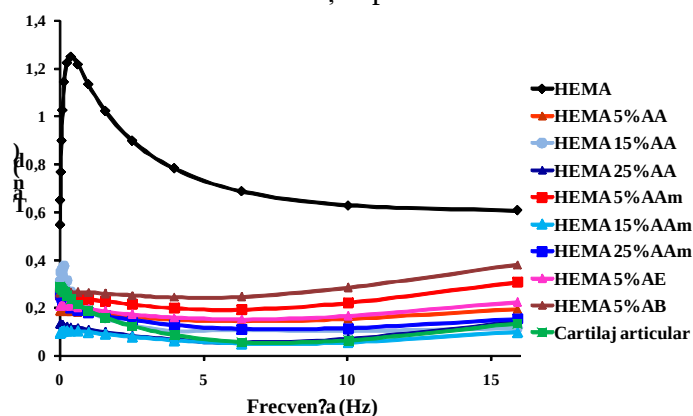


Figura 84. Valorile $\tan(\delta)$ obținute pentru hidrogelurile sintetizate în comparație cu cartilajul articular

De asemenea, valorile obținute pentru hidrogelurile sintetizate cu comonomeri, se încadrează în plaja de valori normale ale cartilajului articular, în care $\tan(\delta)$ are valori cuprinse între 0,15 și 0,36.

În concluzie, copolimerizarea a dus la îmbunătățirea proprietăților hidrogelului pe baza de HEMA, cu rezultate comparabile cu cele obținute pentru cartilajul articular.

IV.3. ANALIZA CRITICĂ A MATERIALELOR ȘI SELECȚIA SISTEMELOR CU POTENȚIALE APLICAȚII BIOMEDICALE

În tabelul 12 sunt sintetizate principalele valori obținute pentru hidrogelurile sintetizate și cartilajul articular.

Tabelul 12. Sinteza rezultatelor preliminarilor obținute

Proba	Grad de umflare (%)	G^* (MPa, la 3Hz)	E^* (MPa)
HEMA	26 ± 1	$2,3 \pm 0,5$	$0,7 \pm 0,02$
HEMA 5%AA	71 ± 1	$0,23 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,03$
HEMA 15%AA	76 ± 1	$0,22 \pm 0,4$	$0,6 \pm 0,01$
HEMA 25%AA	85 ± 1	$0,24 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,03$
HEMA 5%AAm	82 ± 1	$0,76 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,02$
HEMA 15%AAm	120 ± 1	$7,7 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,01$
HEMA 25%AAm	160 ± 1	$3,87 \pm 0,1$	$0,2 \pm 0,03$
HEMA 5%AE	52 ± 1	$0,71 \pm 0,4$	$0,1 \pm 0,01$

HEMA 5%AB	55±1	1,61±0,5	0,1±0,04
Cartilaj articular	75 ±1	0,25 ±0.2	0,9±0,05

Valorile care se apropie de cele ale cartilajului articular sunt prezentate îngroșat în tabelul 12. Se poate astfel observa că prin folosirea comonomerilor pentru hidrogelurile sintetizate s-au putut controla proprietățile hidrogelurilor pe bază de HEMA. Însă, adaosul comonomerului AA determină obținerea de hidrogeluri care se apropie cel mai mult de comportarea cartilajului articular. De aceea, în continuare, pentru testele următoare, se va lua în considerare doar trei formulări: HEMA 5%AA care are un răspuns mecanic la compresiune asemănător cu al cartilajului articular, HEMA 25%AA care are un răspuns mecanic la forfecare asemănător cu al cartilajului articular, precum și hidrogelul HEMA care este etalonul și cartilajul articular, pentru a putea compara valorile obținute. Valoarea obținută pentru cartilajul articular corespunde cu datele bibliografice [31].

IV.4. ANALIZA NANOMECHANICĂ A HIDROGELURILOR P(HEMA-co-AA)

IV.4.1. Teste de nanoindentare

PRINCIPIU: pentru măsurarea proprietăților nano-mecanice ale cartilajului de pui și hidrogelurilor sintetizate s-au utilizat măsurători în AFM. Pentru această aplicație, eșantionul vine în contact cu vârful nanometric al AFM-ului într-o manieră controlată, prin deplasarea tubului piezoelectric [Z (nm)]. În urma contactului, are loc o deflexiune statică a cantilever-ului. Această deviație este măsurată prin intermediul reflexiei fascicolului laser, care este proporțională cu forța [Fn(pN)] suportată de cantilever (Figura 87).

Pentru interpretarea rezultatelor au fost trasate curbe de forță de apropiere, F în funcție de deplasarea pe direcția z.

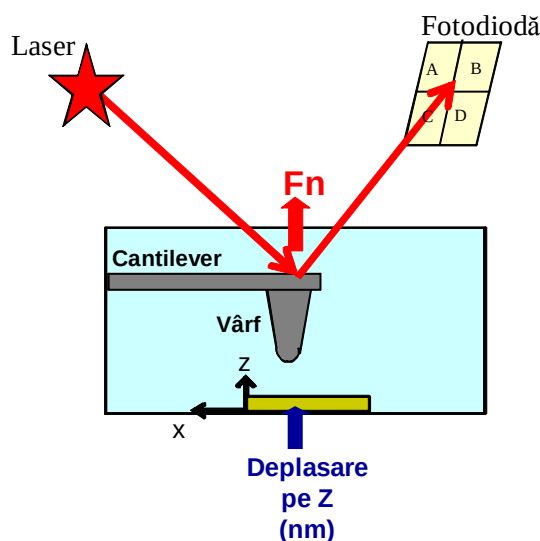


Figura 87. Reprezentarea schemei simplificate a AFM-ului

PARAMETRI:

MODELUL TEORETIC CONTACTULUI LUI HERTZ: Contactul lui Hertz se referă la forțele localizate atunci când două suprafețe sferice vin în contact, și se deformează ușor sub acțiunea forțelor aplicate. În acest caz, cele două suprafețe sunt vârful nanometric și eșantioanele, considerate sferice la scară nanometrică. Teoriei lui Hertz ne permite să punem în ecuație ($F = \frac{4}{3} \sqrt{R E^* (dz)^{1,5}}$) forța din zona de contact în funcție de forța normală aplicată [F (pN)], raza vârfului nanometric (R) și modulul de elasticitate aparent [E^* (MPa)].

IV.4.1.1 Stabilirea parametrilor experimentali

PROTOCOL EXPERIMENTAL

PROBELE: Hidrogelurile sintetizate și cartilajul de pui proaspăt, prelevat în aceeași zi au fost fixate (prin lipire cu ajutorul unei cantități mici de cianoacrilat) în suporturi de teflon (Figura 88).

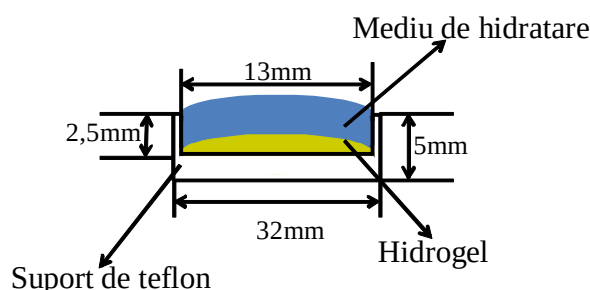


Figura 88. Schema suportului de teflon utilizat la teste de nanoidentare

Utilizarea acestor suporturi în teflon a permis formarea unui menisc la adăugarea mediului de hidratare, asigurând astfel menținerea condițiilor de hidratare pe parcursul experimentelor.

Pentru analize au fost utilizate două tipuri de nanosenzori (Figura 89):

- cu vârf ascuțit, din nitrură de siliciu (Si_3N_4) cu raza de 10nm și constanta elastică de 1N/m (Veeco, DNP-S10) (Figura 89a);
- cu vârf sferic, din borosilicat cu raza de 20 μm și constantă elastică de 2,8 N/m (NanoandMore, CP-FM-BSG) (Figura 89b).

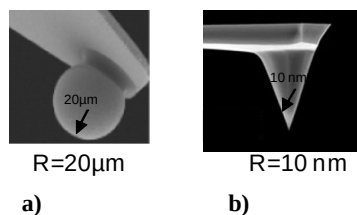


Figura 89. Micrografii ale nanosenzorilor folosiți:
a) vârf sferic
b) vârf ascuțit

Testele au fost făcute la o viteză medie de 500nm/s .

IV.4.1.2. Rezultate și discuții

Pentru măsurarea deflexiunii cantilever-ului care susține vârful nanometric, la apropierea eșantionului, avem următoarele situații (Figura 90):

- când vârful nu este în contact cu suprafața nivelul deflexiunii cantilever-ului este zero, deci forța exercitată asupra sondei este zero;
- când vârful este în contact cu o suprafață rigidă (în cazul nostru este referința), cum aria de contact rămâne constantă pentru că suprafața nu se deformează, deflexiunea măsurată va fi comportarea elastică a cantilever-ului, deci, vom obține o dreaptă cu panta proporțională cu constanta elastică a cantilever-ului: k_c ;
- când vârful este în contact cu o suprafață elastică (cazul hidrogelurilor și a cartilajului articular) deflexiunea cantilever-ului va fi reprezentată de deformarea cantilever-ului+deformarea probei: k_c+k_s . Cum contactul este considerat la scară nano sferă-plan, aria de contact variază cu forța normală, și vom obține o curbă parabolică.

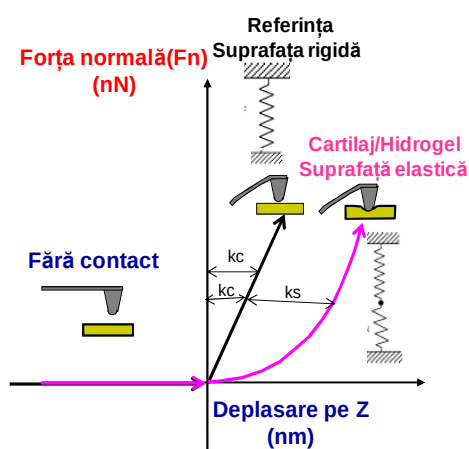


Figura 90. Interpretarea curbelor obținute prin nanoidentare

Pentru a interpreta aceste măsuri vom fița curba parabolică printr-o regresie de tip putere (Figura 91).

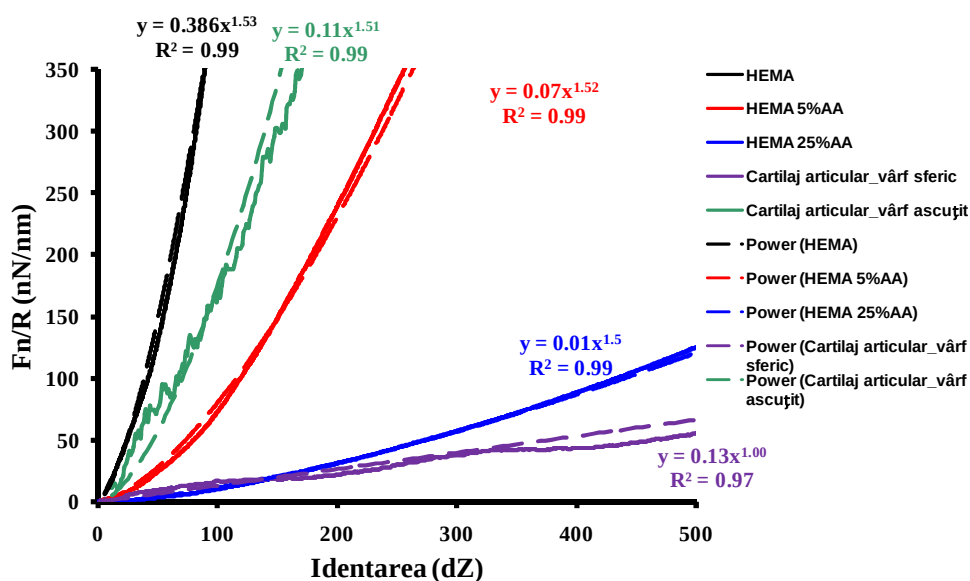


Figura 91. Reprezentarea curbelor F_n/R în funcție de indentare și curbele de fițare tip putere

În figura 90 se poate observa curbele de indentare pentru hidrogelurile sintetizate și cartilajul articular obținute în cazul testelor cu vârful sferic. Rezultatele (statistică pe ~1000

puncte de măsura) ne arată că, în cazul hidrogelurilor testate cu vârful sferic și cartilajului articular testat cu vârful ascuțit, analiza regresiei cu ajutorul unei curbe tip putere ne dă un coeficient α de 1,5 (Figura 92a). Însă, în cazul cartilajului articular, pentru testele în care este folosit nanosenzorul cu vârful sferic obținem coeficient 1 (Figura 92b).

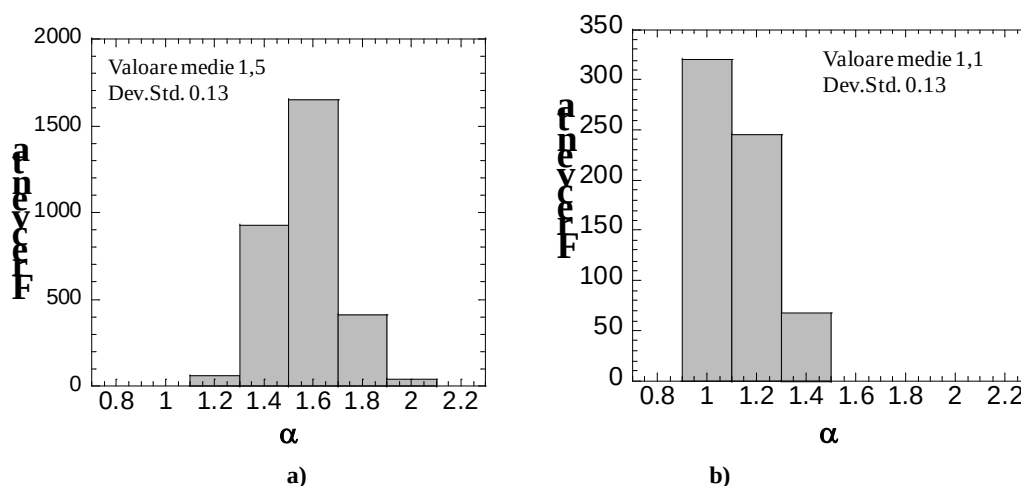


Figura 92. Histogramele obținute pentru:

- a) hidrogelurile sintetizate testate cu vârful sferic și cartilajul articular testat cu vârful ascuțit
- b) cartilajul articular testat cu vârful sferic

Explicația acestui comportament se poate pune pe baza rugozității cartilajului articular. Cartilajul articular are o rugozitate de $\sim 1000\text{nm}$. Având același ordin de mărime cu cel al vârfului de nanoidentare, este posibil să avem contacte multiple (Figura 93), ceea ce va duce la obținerea unui coeficient cu valoarea 1.



Figura 93. Schema simplificată a cartilajului articular testat cu:

- a) vârful sferic
- b) vârful ascuțit

În consecință, pentru a avea rezultate verosimile la scară nanometrică, trebuie controlați parametrii de testare, pentru a putea minimiza interpretările greșite. De exemplu, curbele AFM arată că pentru testele în care s-a folosit vârful sferic, cu raza de $20\mu\text{m}$, se obține o curbă de regresie cu coeficientul de 1,5, în cazul în care rugozitatea este mică (cazul hidrogelurilor), însă, când rugozitatea este de același ordin de mărime cu raza vârfului (cazul cartilajului articular), rezultatele nu urmează aceeași lege, având mai degrabă o lege liniară, aceasta putând fi datorată punctelor multiple de arii de contact. Pentru a soluționa această problemă, s-a ales folosirea unui vârful cu o rază mai mică decât rugozitatea cartilajului articular [32].

Deci, pentru a putea avea date interpretate de teoria lui Hertz, trebuie să alegem vârful nanosenzorului în funcție de rugozitatea probelor.

O altă condiție pentru a putea aplica teoria lui Hertz, este să nu existe forțe de adeziune. Se poate observa din histograma din figura 94 că doar 40% din curbele obținute au avut o adeziune de 0,7nN, în timp ce mai mult de jumătate din ele nu prezintă adeziune.

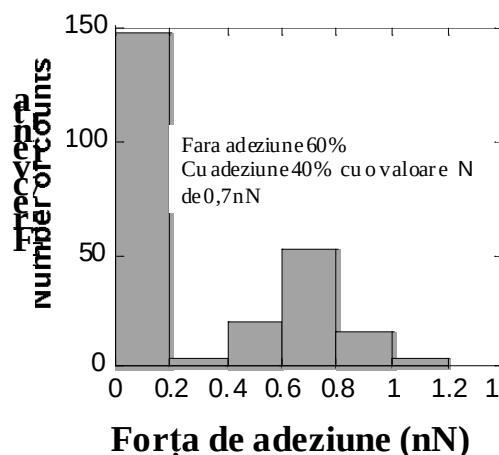


Figura 94. Histograma pentru forțele de adeziune

Toate aceste rezultate, ne permite aplicarea modelului teoretic al contactului lui Hertz, cu ajutorul căruia va fi posibilă calcularea modulului elastic aparent la scară nano (Figura 95).

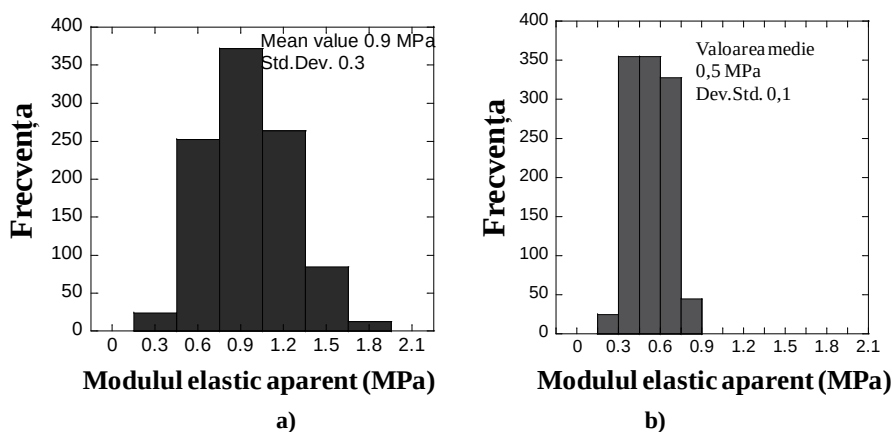


Figura 95. Histograme obținute pentru valorile modulului elastic aparent:
a) cartilajul articular
b) hidrogelul HEMA 5%AA

Valorile obținute pentru modulul elastic aparent sunt prezentate în tabelul 14.

Tabelul 14. Valorile modulului de elasticitate aparent obținute la scară nano

Proba	E* (MPa)
HEMA	0,9±0,08
HEMA 5%AA	0,5±0,1
HEMA 25%AA	0,2±0,07
Cartilaj articular	0,9±0,1

Valorile modulului de elasticitate aparent obținut la scară nano sunt comparabile cu cele obținute la scară macro, însă cu mici diferențe. Aceste diferențe cresc cu adăugarea comonomerului de AA și se datorează neomogenității hidrogelurilor, așa cum au arătat și testele de determinare a unghiului de contact dinamic.

CAPITOLUL V

ANALIZA TRIBOLOGICĂ A HIDROGELURILOR

V.1. STUDII DE FRECARĂ LA SCARĂ MACROSCOPICĂ

PRINCIPIUL METODEI constă în frecarea suprafeței eșantioanelor pe o suprafață de sticlă. Avantajul folosirii platanului din sticlă constă în faptul că se poate vizualiza contactul dintre cele două suprafețe, și degradarea probelor, acolo unde este cazul.

PARAMETRI folosiți pentru testele tribologice au fost stabiliți pe același reometru ARES folosit la testele de comprimare și forfecare. De obicei, testele tribologice se realizau cu un tribometru, însă folosirea reometrului ne permite controlarea unor parametri, ca viteza de deformare și frecvența de oscilare. De asemenea, geometria hidrogelurilor nu are importanță, iar sensibilitatea în măsurarea de coeficienți de frecare mici este mai mare decât în cazul unui tribometru [33]. A fost impusă o deformare normală constantă (15% din grosimea hidrogelurilor) și s-a măsurat cuplul de frecare alcătuit din forța normală și tangențială, ceea ce ne-a permis să reprezentăm coeficientul de frecare în funcție de timp. Pentru a evita suprapunerea liniilor de frecare ale celor trei hidrogeluri am realizat deplasări alternative corespunzătoare unei treimi din circumferința platanului reometrului (Figura 97). Testele au fost realizate în mediu hidratat, soluție pH 7, pentru a imita mediul fiziologic *in vivo*.

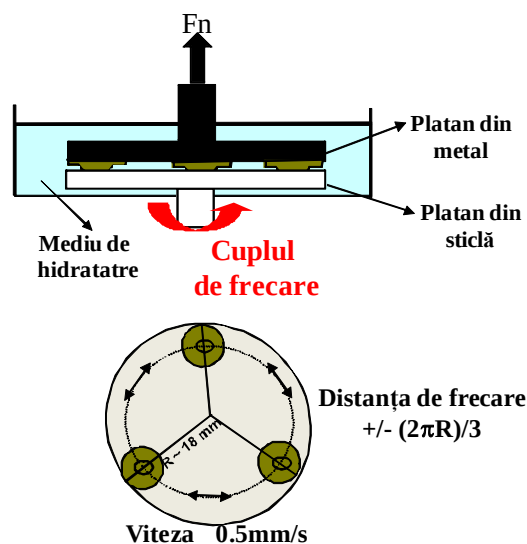


Figura 97. Reprezentarea schematică a dispozitivului de frecare la scară macro

COEFICIENTUL DE FRECARĂ (COF), permite caracterizarea contracției perpendiculară la direcția efortului aplicat. La o întindere, este raportul dintre contracția transversală și alungire axială. Este întotdeauna mai mică sau egală cu 0,5, o valoare limită care corespunde unei material incompresibil, cum ar fi de exemplu un lichid sau cauciuc (material solid).

V.1.1. Stabilirea parametrilor experimentali

PROTOCOL EXPERIMENTAL pentru testele realizate a fost folosită o viteză de 0,5mm/s, valoare ce reprezintă media intervalului fiziologic [34]. Forța tangențială înregistrată în timpul testelor a fost divizată la forța normală, obținându-se astfel coeficientul de frecare (COF).

PROBELE folosite au fost trei hidrogeluri plan convexe care au fost simetric lipite pe platanul superior din metal iar cel pe care au fost frecate hidrogelurile din sticlă. Hidrogelurile au fost în stare hidratată în soluție tampon pH 7.

V.1.2. Rezultate și discuții

Pentru a calcula coeficientul de frecare s-a determinat valoarea acestuia la dus și întors în funcție de timp (Figura 98). Valoarea COF este media valorilor obținute care are semnul plus la dus și semnul minus atunci când a fost schimbat sensul de frecare.

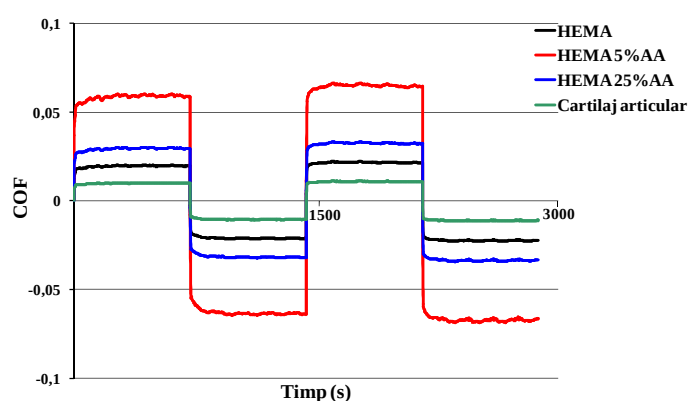


Figura 98. Graficul COF la scară macro în funcție de timp

Valorile obținute și cu deviația standard respectivă sunt prezentate în tabelul 15.

Tabelul 15. Valorile coeficienților de frecare pentru hidrogelurile sintetizate

Proba	COF
HEMA	0,02±0,002
HEMA 5%AA	0,05±0,004
HEMA 25%AA	0,03±0,003
Cartilaj articular	0,01±0,005

Rezultatele au arătat un coeficient de frecare mic, de ordinul 10⁻², și constant pentru o perioadă de 30 minute fără degradarea mecanică a probelor.

V.2. TESTE DE FREACRE LA SCARĂ NANOSCOPICĂ

PRINCIPIUL METODEI constă în faptul că, în afara forțelor normale, cantilever-ul este sensibil și la forțele de frecare (F_f) care creează un cuplu de torsiune, și deci o variație pe orizontală a semnalului fotodiodei. Experimentele de frecare au fost realizate în modul de modulare lateral. Această tehnică constă în aplicarea unei deplasări laterale contactului dintre

vârf și suprafață și măsurarea răspunsului de torsiune, adică a forței laterale create, în condițiile în care forța normală este constantă (Figura 102).

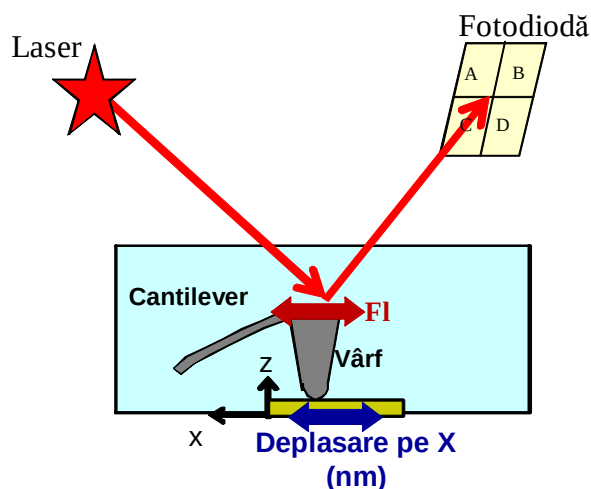


Figura 102. Reprezentarea schematică a dispozitivului de frecare la scară nano

V.2.1. Stabilirea parametrilor experimentali

Pentru **PROTOCOLUL EXPERIMENTAL** în cazul măsurătorile tribologice la scară nano s-a folosit tot microscopul de forțe atomice. Eșantionul este în contact cu sondă, și se impune o deplasare a eșantionului menținând forța normală constantă. Măsurând torsiunea cantilever-ului putem determina forța laterală cunoscând constanta elastică de torsiune a levierului. Testele au fost realizate în mediu hidratat, iar pentru a avea aceleași condiții experimentale ca cele de la scară macro, s-a folosit un senzor nanometric sferic din borosilicat, cu o constantă de torsiune de 150N/m și o rază de 20μm. Distanța de frecare a fost de ~ 20 μm, iar viteza de 0,5 μm/s ceea ce corespunde la 3Hz, valoare corespunzătoare condițiilor fiziologice [35]. Forța normală a fost de 500 nN.

PROBELE folosite au constat în hidrogeluri hidratate în soluție tampon pH 7 și cartilaj articular de pui.

V.2.2. Rezultate și discuții

Valorile COF la scară nano în funcție de timp sunt reprezentate în figura 103. În cazul cartilajului articular, datorită rugozităților sale de același ordin cu cel al senzorului AFM, nu s-a putu interpreta valorile obținute.

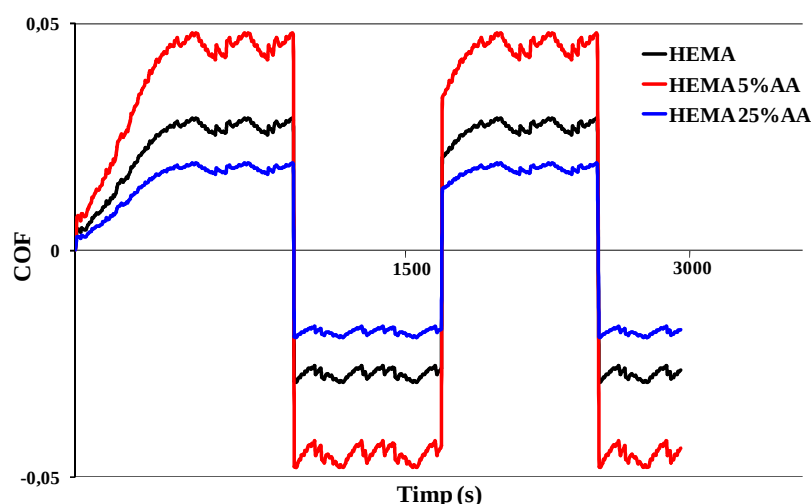


Figura 103. Graficul COF la scară nano în funcție de timp

Valorile obținute și cu deviația standard respectivă sunt trecute în tabelul 16.

Tabelul 16. Valorile coeficienților de frecare obținuți

Proba	COF
HEMA	0.03±0.005
HEMA 5%AA	0.05±0.007
HEMA 25%AA	0.02±0.003
Cartilaj articular	-

Valorile obținute sunt mici, de ordinul 10^{-2} , cu mici diferențe față de valorile obținute la scară macro.

V.3. STUDII DE TOPOGRAFIE

PRINCIPIUL METODEI AFM constă în măsurarea topografiei probelor prin scanarea unui vârf pe o suprafață atât în aer cât și în lichid. Imaginile sunt generate cu ajutorul unui semnal ce vine de la fotodetector, acesta fiind asociat cu deflecțiile cantilever-ului în urma interacțiunii acestuia cu suprafața. Forța dintre vârf și suprafață, este valoarea de referință pentru deflexia cantilever-ului.

V.3.1. Stabilirea parametrilor experimentali

Pentru **PROTOCOLUL EXPERIMENTAL** s-a ales un senzor AFM cu o constantă elastică mică de 0,2 N/m (VEECO, DNP-S-10), în modul contact. A fost măsurată rugozitatea pic-la-pic, care reprezintă valoarea medie dintre picul maxim și minim de rugozitate.

PROBELE folosite au constat în hidrogeluri hidratate în soluție tampon pH 7.

V.3.2. Rezultate și discuții

Imaginile topografice sunt prezentate în figura 106.

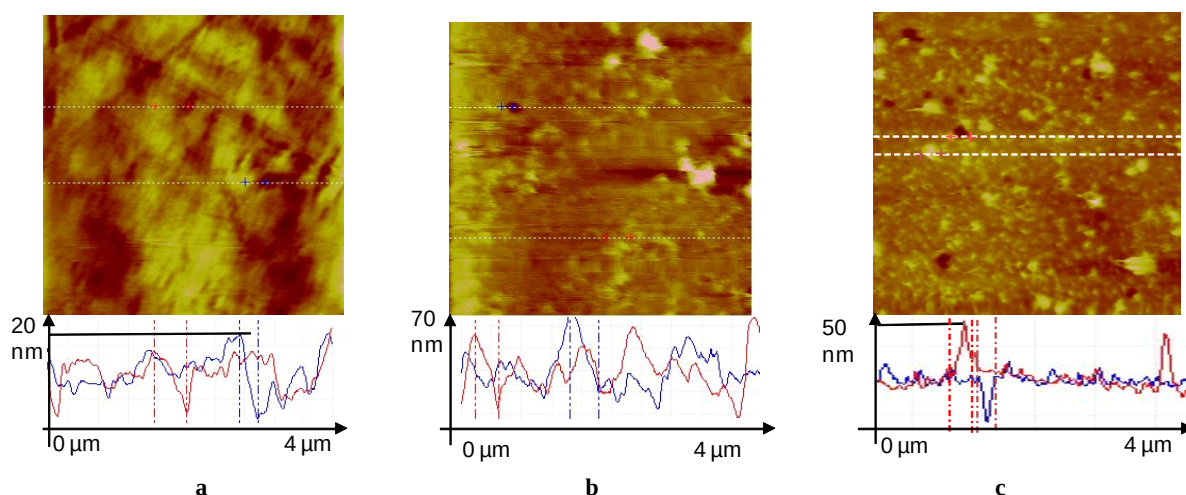


Figura 106. Topografia AFM pentru hidrogelurile:

- a) HEMA
- b) HEMA 5%AA
- c) HEMA 25%AA

Valorile rugozităților pic-la-pic sunt prezentate în tabelul 17. Se poate observa că valorile rugozităților pic-la-pic sunt mici, ca și consecință a folosirii matriței din ceramică.

Tabelul 17. Valorile rugozității pic-la-pic

Proba	Rugozitate pic-la-pic (nm)
HEMA	$\sim 15 \pm 2$
HEMA 5%AA	$\sim 50 \pm 5$
HEMA 25%AA	$\sim 25 \pm 2$

Valoarea rugozității a variat la adăugarea comonomerului de AA, nesemnalandu-se o dependență liniară a caracteristicii odată cu creșterea concentrației de AA în hidrogel; adaosul de AA în hidrogel a determinat, totuși, o creștere a rugozității materialului.

CAPITOLUL VI

STUDII CINETICE DE ÎNCĂRCARE ȘI ELIBERARE DE PRINCIPII ACTIVE ÎN/DIN HIDROGELURI P(HEMA-CO-AA)

VI.2.1.1. Încărcarea medicamentului în hidrogelurile pe baza de p(HEMA)

Hidrogelurile pe baza de HEMA și comonomer AA în stare uscată cu o masă între 0,5-1 g au fost imersate într-o soluție de medicament ketoprofen sau ibuprofen unde au fost menținute 48h. După acest interval de timp, hidrogelurile încărcate cu medicament au fost uscate, la etuvă, la 37°C, timp de 72 h. În figura 112 este prezentat schematizat procesul de încorporare a medicamentului în hidrogeluri.

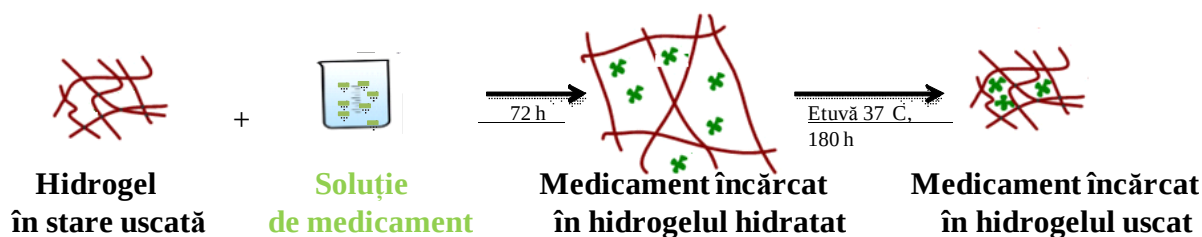


Figura 112. Schema simplificată de încorporare a medicamentului în hidrogeluri

Mecanismul de încorporare a fost unul fizic, pentru a nu schimba proprietățile mecanice ale hidrogelurilor prin modificarea gradului de reticulare sau schimbări esențiale ale proprietăților de umflare. Astfel, hidrogelurile pot fi încărcate cu medicamentele considerate, gradul de încărcare fiind dependent de solubilitatea medicamentului în mediu respectiv. Gradul de umflare în soluția de medicament a fost dependent de concentrația de acid acrilic din hidrogeluri, crescând odată cu creșterea concentrației de acid acrilic iar cantitatea maximă de ibuprofen sau ketoprofen încorporată a fost determinată pe baza curbei de etalonare (Figurile 113 și 114).

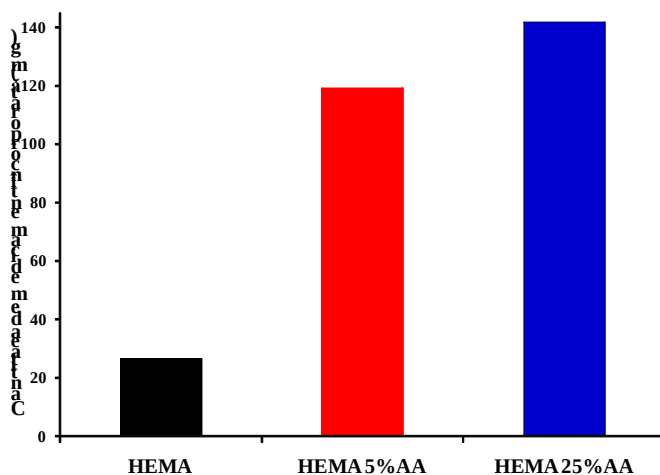


Figura 113. Gradul de încărcare maxim cu ketoprofen

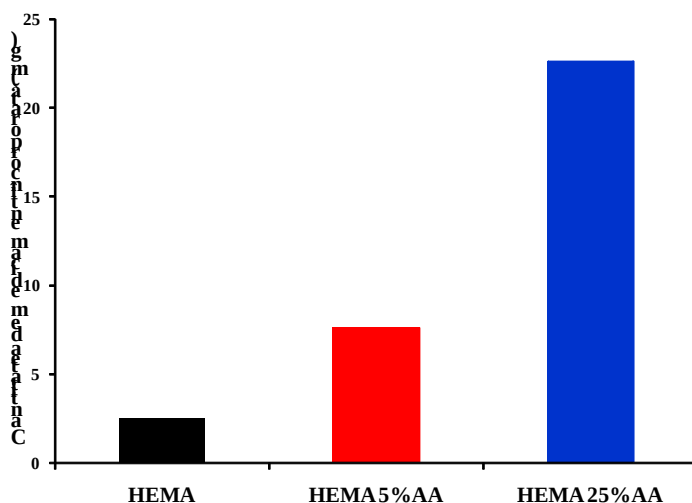


Figura 114. Gradul de încărcare maxim cu ibuprofen

VI.3. Studii cinetice privind difuzia unor substanțe biologice active din hidrogelurile sintetizate. Model teoretic de difuzie

Schema generală de eliberare a medicamentelor încorporate în hidrogeluri este prezentată în figura 115.

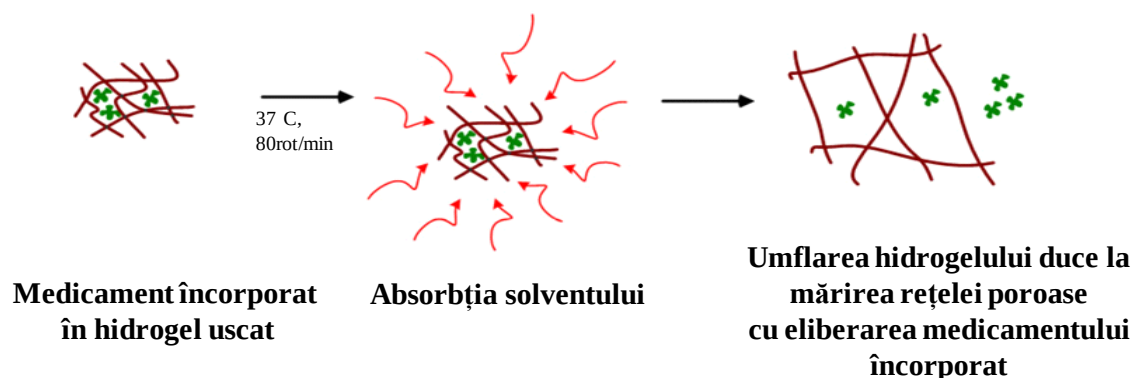


Figura 115. Schema de eliberare a medicamentului din hidrogeluri

Cinetica de eliberare a principiilor active depinde de procentul de comonomer AA din hidrogeluri, volumul molecular al medicamentului și caracteristicile de solubilitate a medicamentului în mediul de difuzie. Astfel, hidrogeluri cu o cantitate mare de AA au eliberat o cantitate mai mare de medicament. Cantitatea de medicament eliberată a fost în concordanță cu cea înglobată. Curbele cinetice de eliberare a medicamentului sunt prezentate în figurile 116 și 117.

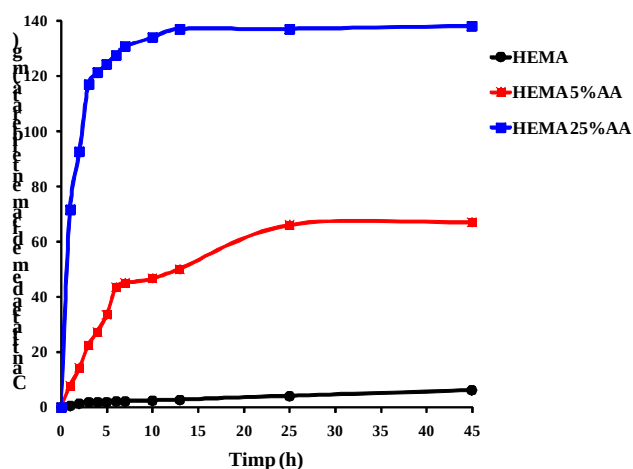


Figura 116. Curbele cinetice de eliberare a medicamentului eliberat în cazul ketoprofenului

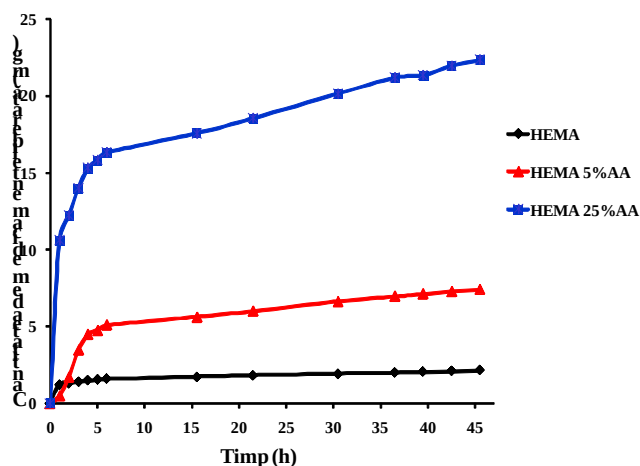


Figura 117. Curbele cinetice de eliberare a medicamentului eliberat în cazul ibuprofenului

În cazul ketoprofenului eliberarea s-a realizat în aproximativ 15 ore pentru HEMA 25%AA și 25 de ore pentru HEMA 5%AA. În cazul ibuprofenului, eliberarea s-a realizat în aproximativ 45 de ore, pentru toate hidrogelurile testate (tabelul 20).

Tabelul 20. Cantitatea de ibuprofen sau ketoprofen eliberată

Eșantion	Cantitatea de ibuprofen eliberată (mg)	Timpul (h)	Cantitatea de ketoprofen eliberată (mg)	Timpul (h)
HEMA	2,5	~45	26	~25
HEMA 5%AA	7,6	~45	118	~25
HEMA 25%AA	22,6	~45	141	~15

Hidrogelurile care conțin o cantitate mai mare de AA eliberează o cantitate mai mare de medicament. Eliberarea este corelată cu gradul de umflare la echilibru.

VI.3.1. Modelul teoretic de difuzie

Pentru analiza eliberării *in vitro* de principii active (medicamente), se folosesc anumite modele matematice utilizate la descrierea cineticii de eliberare. Pentru acest studiu s-a ales aplicarea modelului Korsmeyer-Peppas, care, descrie eliberarea de medicamente din sistemele polimerice. Alte modele matematice ca, cinetica de ordin zero, cinetica de ordin unu, modelul Higuchi și Hixon Crowell, descriu de obicei sistemele de eliberare în care viteza de eliberare depinde de concentrația medicamentului, descrierea eliberării din matrici insolubile bazate pe un transport tip Fikian, sau, eliberarea ca rezultat al unei modificări de suprafață și a diametrului tabletelor sau particulelor [36, 37, 38, 39].

Pentru a putea afla mecanismul de eliberare, curbilor de eliberare li s-a aplicat acest model (conform ecuației descrise în capitolul II)(Figurile 116 și 117).

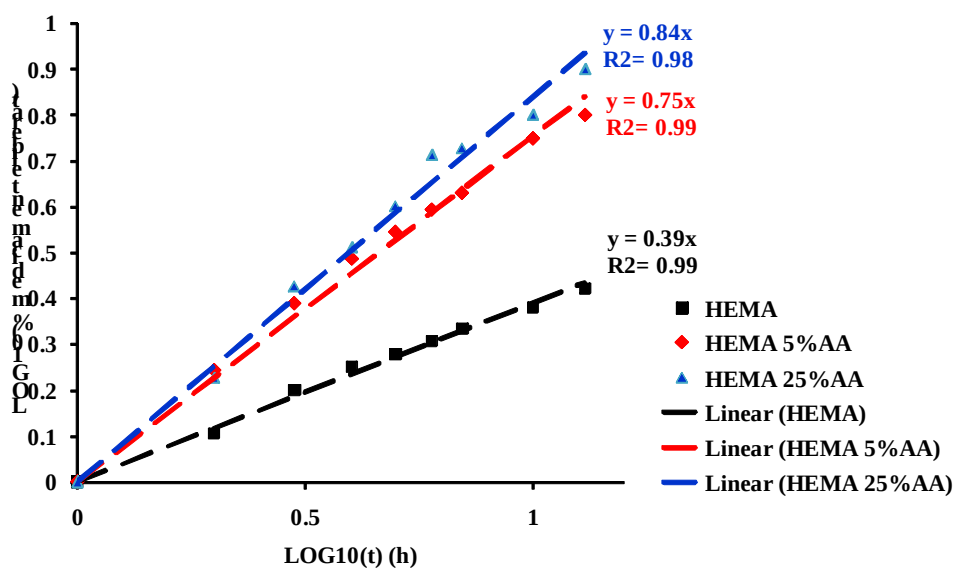


Figura 116. Modelul matematic Korsmeyer-Peppas pentru eliberarea de ketoprofen

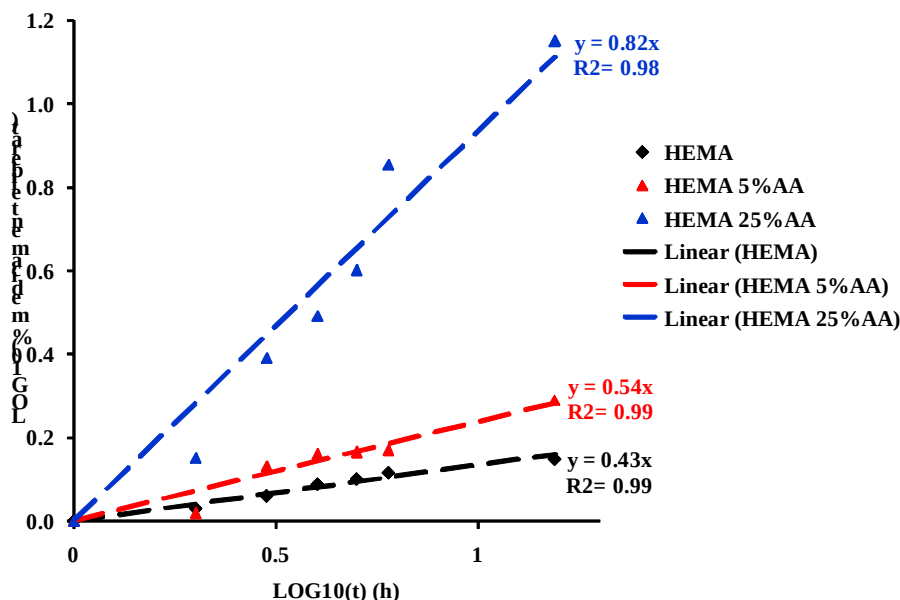


Figura 117. Modelul matematic Korsmeyer-Peppas pentru eliberarea de ibuprofen

Au fost obținuți indici în intervalul $0,39 < n < 0,89$, ceea ce indică o difuzie de tip non-Fikian. Difuzia medicamentului din matricea hidrogelurilor a fost în strânsă relație cu umflarea hidrogelurilor în mediul de eliberare (Tabelul 22).

Tabelul 22. Coeficienții obținuți în urma aplicării modelului matematic Korsmeyer-Peppas

Proba	Ibuprofen	Ketoprofen
HEMA	0,43; $r^2 \sim 0,99$	0,39; $r^2 \sim 0,99$
HEMA 5%AA	0,54; $r^2 \sim 0,99$	0,75; $r^2 \sim 0,99$
HEMA 25%AA	0,82; $r^2 \sim 0,98$	0,84; $r^2 \sim 0,98$

CONCLUZII GENERALE

Proprietățile mecanice unice ale cartilajului ca suprafață portantă rezultă atât din proprietățile sale structurale cât și compoziția chimică a matricei extracelulare. Însă, numeroase patologii osteoarticulare afectează cartilajul articular, ducând la uzura acestuia. Metodele de tratament actuale (medicamente, implanturi) nu pot asigura repararea cartilajului articular pe termen lung. Astfel, cercetătorii au găsit ca soluție ingineria tisulară. Scopul ingineriei tisulare a cartilajului articular este să se folosească celule, matrici, principii biologic active, singure sau în combinație unele cu altele, pentru a sintetiza *in vitro* un material care să fie echivalent cu cartilajul articular sănătos, atât din punct de vedere structural cât și funcțional.

Încadrându-se în contextul prezentat, lucrarea și-a propus să aducă contribuții în domeniul realizării de noi materiale polimerice pe bază de p(HEMA) cu aplicații în ingineria tisulară a cartilajului articular, cercetările efectuate permițând sistematizarea următoarelor concluzii generale:

1. Sinteza de noi hidrogelurile pe bază de p(HEMA) s-a realizat într-o singură etapă de polimerizare radicalică, într-un timp scurt, fără a necesita o aparatură complicată, precum și un cost redus. Hidrofilia a fost modificată utilizând diferiți co-monomeri cu caracter puternic hidrofil (acid acrilic-AA, acrilamidă-AAm) sau hidrofob (acrilat de etil - AE, acrilat de butil - AB), în prezența unui monomer bifuncțional cu rol de reticulant, tetraetilenglicol diacrilat (TEGDA).

2. Din analiza datelor de spectroscopie în infraroșu (spectrele FTIR) rezultă faptul că reacția de polimerizare s-a produs între componentele considerate pentru sinteză. Odată cu creșterea procentului de comonomer, se poate observa o creștere a intensității benzii –OH ($\sim 3440\text{ cm}^{-1}$), benzii corespunzătoare legăturii C este O (~ 1640) și a benzii caracteristice grupării metil, ceea ce confirmă faptul că copolimerul este bine prezent în structura hidrogelurilor sintetizate.

3. Din rezultatele TG obținute se poate observa că hidrogelurile sintetizate au o stabilitate termică mai mare decât pentru hidrogelului p(HEMA), iar această stabilitate în general crește odată cu creșterea procentului de comonomer folosit la sinteză. Aceste rezultate sunt în concordanță cu spectrele FTIR, în care intensitatea domeniului grupelor -OH crește odată cu creșterea procentului de comonomer. Energia de activare în general crește odată cu creșterea procentului de copolimer adăugat, sugerând o îmbunătățire a stabilității termice a hidrogelurilor. Valoarea mică a ordinului de reacție sugerează faptul că la descompunerea termică este un proces dominant fizic. Din datele de DSC s-a putut calcula valoarea T_g a hidrogelurilor. Aceasta a crescut cu adăugarea de comonomer, ceea ce ne confirmă îmbunătățirea proprietăților termice odată cu creșterea cantității de comonomer.

4. Din micrografiile ESEM se poate observa că prin copolimerizare se obține o structură poroasă bine definită față de hidrogelul HEMA. Din micrografiile SEM se poate

observa o structură mai netedă odată cu adăugarea de comonomer, însă, hidrogelurile sunt sensibile la fascicolul de electroni.

5. În toate cazurile, gradul de umflare al hidrogelurilor crește cu creșterea pH-ului mediului, datorită repulsiilor electrostatice dintre formele ionizate ale grupelor carboxilice. În cazul aplicațiilor lor ca substitut de cartilaj articular, pH-ul este 7. Se observă o creștere a gradului de umflare odată cu creșterea procentului de comonomer. În cazul monomerilor hidrofobi AE și AB, datorită hidrofobității lor, se poate observa o scădere a gradului de umflare. Se observă de asemenea că hidrogelurile HEMA 5%AA, HEMA 15%AA și HEMA 5%AAm au un comportament asemănător cu cel al cartilajului articular, în ceea ce privește această proprietate.

6. Adăugarea de comonomer a dus la creșterea valorii tensiunii superficiale, deci a fost necesară o energie din ce în ce mai mare pentru a rupe legăturile din hidrogel. Acest lucru confirmă faptul că, cu adăugarea de comonomer, legăturile de hidrogen cresc în intensitate.

Valorile unghiului dinamic, dau informații cu privire la textura suprafeței testate, dacă este omogenă sau neomogenă. O suprafață omogenă este atunci când lichidul va umple toate rugozitățile de suprafață, deci va avea un histerezis mare. Valorile histerezisului au scăzut cu adăugarea de comonomer, deci, omogenitatea de suprafață a hidrogelurilor sintetizate descrește în acest sens.

7. Testele de compresiune au fost realizate pentru a evalua proprietățile hidrogelurilor sintetizate comparativ cu cele ale cartilajului articular. Hidrogelurile HEMA și HEMA cu comonomerul AA au avut un comportament asemănător cu cel al cartilajului articular, în ceea ce privește modulul elastic aparent(E^*).

O altă caracteristică importantă a cartilajului articular o constituie proprietățile de vâscoelasticitate. Hidrogelurile sintetizate și cartilajul articular au fost testate la forfecare, determinându-se astfel modulul de forfecare (G^*).

8. Hidrogelurile sintetizate cu comonomerul AA au avut un comportament asemănător cu cel al cartilajului articular. De aceea, în continuare, au fost selectate pentru testele următoare, pentru trei formulări:

- hidrogelul HEMA, etalonul, pentru a vedea comparativ comportamentul hidrogelurilor obținute prin modificarea acestui hidrogel;
- hidrogelul HEMA 5%AA care are un răspuns mecanic la compresiune asemănător cu al cartilajului articular;
- Hidrogelul HEMA 25%AA care are un răspuns mecanic la forfecare asemănător cu al cartilajului articular.

9. Pentru hidrogelurile selectate, datorită faptului că sinteza a fost realizată prin polimerizare radicalică, s-a pus problema omogenității de suprafață. Pentru aceasta, au fost realizate teste la scară nano, folosind microscopia de forță atomică, în aceleași condiții ca cele realizate la scară macro. Din rezultatele obținute se poate sublinia faptul că valorile

modulului de elasticitate aparent obținut la scară nano sunt comparabile cu cele obținute la scară macro, cu mici diferențe datorate neomogenităților care cresc odată cu adăugarea de comonomer AA.

10. Una din cele mai importante caracteristici mecanice ale cartilajului articular o reprezintă coeficientul de frecare foarte mic dar și uzura mică, ceea ce îl face un material performant din punct de vedere tribologic. Aceasta a făcut necesară analiza hidrogelurile sintetizate și din punct de vedere al proprietăților tribologice, optându-se pentru o evaluare atât la scară macro cât și la scară nanometrică.

Coeficienții de frecare obținuți au avut valori mici de ordinul 10^{-2} , comparabili cu valoarea coeficientului de frecare al cartilajului articular. Valorile obținute au fost comparabile la cele două nivele testate, macro și nano. Coeficientului de frecare a variat în funcție de structura hidrogelurilor, astfel, valoarea sa a scăzut cu creșterea gradului de umflare, deci cu adăugarea de comonomer AA. De asemenea, așa cum era de așteptat, coeficientul de frecare a fost mai mic în cazul hidrogelurilor cu rugozitate mai mare.

11. Pentru a analiza caracteristicile de suport pentru eliberare controlată de medicamente, hidrogelurile pe bază de HEMA și AA au fost încărcate și eliberare de principii biologice active utilizate în tratamentul afecțiunilor cartilajului. Au fost realizate sisteme de eliberare controlată cu ketoprofen și ibuprofen din hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AA.

Caracteristicile de solubilitate a ketoprofenului și ibuprofenului a determinat adoptarea unei strategii pentru încărcarea cu medicament din amestec apă-etanol, gradul de încărcare obținut fiind în concordanță cu recomandările de concentrații descrise în specificațiile de tratament al afecțiunilor cartilajului.

Difuzia medicamentului din hidrogeluri a fost datorată umflării acestora în mediul de eliberare, soluție tampon, pH 7. Eliberarea a fost dependentă de procentul de acid acrilic din hidrogeluri, iar modelul propus pentru cinetica de eliberare a fost cel descris de Korsmeyer-Peppas. Indicii obținuți, $0,39 < n < 0,89$, descriu o difuzie de tip non-Fikian.

Rezultatele obținute pe parcursul acestei teze au fost valorificate prin următoarele publicații și comunicări științifice:

Lucrări publicate sau acceptate spre publicare în reviste cu factor de impact:

1. Y. Margaron, **L. Bostan**, J.-Y. Exposito, M. Malbouyres, A.-M. Trunfio-Sfarghiu, Y. Berthier, C. Lethias, *Tenascin-X increases the stiffness of collagen gels without affecting fibrillogenesis*, Biophysical Chemistry (2010), 147:87–91.
2. **L. Bostan**, F. Munteanu, M. I. Popa, L. Vereștiuc, *Preliminary Studies on Fatigue Analysis of Hydrogels Based on p(HEMA)*, Revista de Chimie (Bucharest) 61 (2010), 12: 1235-1238.
3. **L.Bostan**, A-M. Trunfio-Sfarghiu, L.Vereștiuc, M.I.Popa, F. Munteanu, Y.Berthier, *Macro and nano-tribological characterisation of a new HEMA hydrogel for articular cartilage replacement*, Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, Volume 13, Supplement 1, (September 2010), ISSN: 1025-5842, 33-35.
4. **L.Bostan**, A.-M. Trunfio-Sfarghiu, L.Vereștiuc, M.I.Popa, F. Munteanu, J.-P.Rieu, Y.Berthier, *Mechanical and tribological properties of poly(hydroxyethyl methacrylate) hydrogels for articular cartilage substitute*, Tribology International, TRIBINT-D-10-00484 - trimisă spre publicare.

Lista de lucrări comunicate la Congrese Naționale și Internaționale:

1. **L.Bostan**, L. Vereștiuc, F. Munteanu, M.I. Popa, *Studii asupra caracteristicilor tribologice ale poli(hidroxietyl metacrilat)*, Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului IV, 15-16 noiembrie 2007, ISSN: 1912-1937-2007, Iași, România.

2. O. Novac, N. Popa, **L. Bostan**, L. Profire, M. I. Popa, “*Natural Polymers/Theophylline Nanostructured Systems*”, International Conference of Applied Sciences, Chemistry and Chemical Engineering, CISA-2008, 4-6 aprilie, 2008, Slănic Moldova, Bacău, România.

3. O. Novac, N. Aelenei, N. Popa, **L. Bostan**, M. I. Popa, “*Kinetics of polyphenol delivery from nanostructured systems*”, International Conference Applied Sciences – Chemistry and Engineering Chemistry: CISA – 2008, CISA-2008, 4-6 aprilie, 2008, Slănic Moldova, Bacău, România.

4. **L. Bostan**, L. Vereștiuc, M. I. Popa, *Model al cartilajului articular - Hidrogel pe baza de p(HEMA), Polimeri hidrosolubili pentru aplicatii avansate*, Curs pentru tinerii cercetători, 15 – 17 aprilie 2008, Iași, România.

5. **L. Bostan**, M. I. Popa, F. Munteanu, L. Vereștiuc, *Hydrogels based on poly(HEMA) with application in tissue engineering of cartilage*, 6th International Workshop for Musculoskeletal and Neuronal Interactions, 8-11 May 2008, Kardinal Schulte Haus, Bergisch Gladbach, Cologne, Germany.

6. **L. Bostan**, M. I. Popa, L. Vereștiuc, *P(HEMA) – application dans l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire*, aV-a Ediție a Colocviului Franco-Român de Chimie Aplicată, COFrRoCA – 2008, 25-29 iunie 2008, Universitatea din Bacău, România.

7. **L. Bostan**, M. I. Popa, L. Vereștiuc, C. Ibănescu, M. Danu, G. Lisa, *Hydrogels based on p(HEMA) with application in tissue engineering of articular cartilage*, 3rd International Conference on Biomaterials and Medical Devices (BiomMedD'2008), November 13-16th, 2008, Bucharest, Romania.

8. **L. Bostan**, M. I. Popa, L. Vereștiuc, C. Ibănescu, M. Danu, G. Lisa, *Tribological analysis of hydrogels based on p(HEMA). Possibility of using as articular surfaces in hip prothesis*, 3rd International Conference on Biomaterials and Medical Devices (BiomMedD'2008), November 13-16th, 2008, Bucharest, Romania.

9. **L. Bostan**, M. I. Popa, L. Vereștiuc, C. Ibănescu, M. Danu, G. Lisa, *Perspective în obținerea unui material de substituție al cartilajului articular*, Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului V, 19-21 noiembrie 2008, Iași, România.

10. **L. Bostan**, A –M. Trunfio-Sfarghiu, Y. Berthier, M. I. Popa, F. Munteanu, L. Vereștiuc, *Synthesis and biomechanical characterisation of hydrogels based on p(HEMA) with applications in articular cartilage substitution*, 22nd European Conference on Biomaterials, The annual conference of the European Society for Biomaterials, September 7-11, 2009, Lausanne, Switzerland.

11. **L. Bostan**, A –M. Trunfio-Sfarghiu, L. Vereștiuc, M. I. Popa, F. Munteanu, Y. Berthier,

Macro and nano-tribological characterisation of a new HEMA hydrogel for articular cartilage replacement, 35ème congrès annuel de la Société de Biomécanique, 25 -27 Aout 2010, Le Mans, France.

12. **L.Bostan**, A-M. Trunfio-Sfarghiu, L.Vereștiuc, M.I.Popa, F. Munteanu, Y.Berthier, *Analyse of mechanical and tribological properties of polymers with controlled hydrophilic character for articular cartilage substitute*, 37th Leeds-Lyon Symposium on Tribology, Tuesday 7th - Friday 10th September 2010, Leeds, UK.

13. **L.Bostan**, A-M. Trunfio-Sfarghiu, L.Vereștiuc , M.I.Popa , F. Munteanu , Y.Berthier, *Tribological behavior of hydrogels based on p(HEMA)*, The 11th International Conference on Tribology, 4 – 7 noiembrie 2010, Iași, România, ISSN 2069-1718.

Lucrări publicate în volume de specialitate:

1. O.Novac, N. Aelenei, N.Popa, **L. Bostan**, M.I.Popa, “*Kinetics of polyphenol delivery from nanostructured systems*”, International Conference Applied Sciences – Chemistry and Engineering Chemistry: CISA – 2008, p.46-51, ISBN 978-973-1833-86-6.

2. O. Novac, N. Popa, **L. Bostan**, L. Profire, M.I. Popa, “*Natural polymers/theophylline nanostructured systems*”, International Symposium of Applied Sciences, Bacău, 4-6 aprilie, 2008.

3. **L.Bostan**, M.I.Popa, L.Vereștiuc, F. Munteanu, *P(HEMA) – Application dans l’ingenierie tissulaire du cartilage articulaire*, Scientific Study and Research, 2008, Vol. VII (4), p. 445-451.

4. **L. Bostan**, A.-M. Trunfio-Sfarghiu, L. Vereștiuc, M.I. Popa, Yves Berthier, *Tribological behaviuor of hydrogels based on p(HEMA)*, Buletinul Institutului Politehnic din Iași, Tomul LVII (LXI), Fasc. 1, 2011, p.1-9.

Membru în echipele de cercetare al contractelor de cercetare

1. CEEEX-M1-C2-1927, nr. 108/09.10.2006.
2. Contract PNCD II, Ministerul Educației și Cercetării, nr. 81051/2/14.09.2007.
3. Contact PNCD II, Ministerul Educației și Cercetării, nr. 41-017/2007.
4. Proiect PN II-ID, Ministerul Educației și Cercetării, 314/nr. 660/2009.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

1. Skalak R. and Fox C. F., *Tissue Engineering*, Ed. Alan R. Liss(1988), New York, p.30.
2. Langer R. and Vacanti J. P., *Tissue engineering*, Science (1993), 260: 920–926.
3. Kretlow J.D., Mikos A.G., *From material to tissue: Biomaterial development, scaffold fabrication, and tissue engineering*, AIChE Journal (2008), 54(12): 3048-3067.
4. Liu C., Xia Z., Czernuszka J.T., *Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering*, Chemical Engineering Research and Design (2007), 85(7): 1051-1064.
5. Moroni L., De Wijn J.R., Van Blitterswijk C.A., *Integrating novel technologies to fabricate smart scaffolds*, Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition (2008), 19(5): 543-572.
6. Babensee J.E., Anderson J.M., McIntire L.V., Mikos A.G., *Host response to tissue engineered devices*, Advanced Drug Delivery Reviews (1998), 33(1-2): 111-139.
7. Williams D.F., *On the mechanisms of biocompatibility*, Biomaterials (2008), 29(20): 2941-2953.
8. Hutmacher D.W., *Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues state of the art and future perspectives*, Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition (2001), 12: 107-124.
9. Ito Y., Zheng J., Imanishi Y., *Enhancement of cell growth on a porous membrane coimmobilized with cell γ -growth and cell adhesion factors*, Biomaterials (1997), 18(3): 197-202.
10. Mitragotri S., Lahann J., *Physical approaches to biomaterial design*, Natural Materials (2009), 8(1): 15-23.
11. Hutmacher D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*, Biomaterials (2000), 21(24): 2529-2543.
12. Agrawal C.M., Ray R.B., *Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering*, Journal of Biomedical Materials Research (2001), 55(2): 141-150.
13. Karageorgiou V., Kaplan D., *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*, Biomaterials (2005), 26:5474-5491.
14. Karande T.S., Ong J.L., Agrawal C.M., *Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: Design issues related to porosity, permeability, architecture, and nutrient mixing*, Annals of Biomedical Engineering (2004), 32(12): 1728-1743.
15. Kannan R.Y., Salacinski H.J., Sales K., Butler P., Seifalian A.M., *The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of microvascular networks: a review*, Biomaterials (2005), 26(14): 1857-1875.

-
16. Dunn G.A., Heath J.P., *A new hypothesis of contact guidance in tissue cells*, Experimental Cell Research (1976), 101(1): 1-14.
 17. Falconnet D., Csucs G., Grandin M.H., Textor M., *Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays*, Biomaterials (2006), 27(16): 3044-3063.
 18. Flemming R.G., Murphy C.J., Abrams G.A., Goodman S.L., Nealey P.F., *Effects of synthetic microand nano-structured surfaces on cell behavior*, Biomaterials (1999), 20(6): 573-588.
 19. Papenburg B.J., Vogelaar L., Bolhuis-Versteeg L.A., Lammertink R.G., Stamatialis D., Wessling M., *One-step fabrication of porous micropatterned scaffolds to control cell behavior*, Biomaterials (2007), 28(11): 1998-2009.
 20. Li W.J., Jiang Y.J., Tuan R.S., *Chondrocyte phenotype in engineered fibrous matrix is regulated by fiber size*, Tissue Engineering (2006), 12:1775-1785.
 21. Ingram J.H., Korossis S., Howling G., Fisher J., Ingham E., *The use of ultrasonication to aid recellularization of acellular natural tissue scaffolds for use in anterior cruciate ligament reconstruction*, Tissue Engineering (2007), 13(7): 1561-1572.
 22. Feng X. D., Guo X. Q., Qiu K. Y., *Study of the initiation mechanism of the vinyl polymerization with the system persulfate/N, N,N', N'-tetramethylethylenediamine*, Makromolecular Chemistry (1988), 189: 77-83.
 23. Zhang X. Z., Zhuo R. X., *Synthesis and properties of fast responsive, temperature sensitive p(NIPA-co-AA) hydrogel*, Chemical Journal of Chinese University (2000), 21(8): 1309-1311.
 24. Duan S., Zhu W., Yu L. and Ding J., *Negative cooperative effect of cytotoxicity of a di-component initiating system for a novel injectable tissue engineering hydrogel*, Chinese Science Bulletin (2005), 50(11): 1093-1096.
 25. Freeman E.S., Carroll B., *The application of thermoanalytical techniques to reaction kinetics. The thermogravimetric evaluation of the kinetics of the decomposition of calcium oxalate monohydrate*, Journal of Physical Chemistry (1958), 62: 394.
 26. Kurkuri M.D., Aminabhavi T.M., *Poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) sequential interpenetrating network pH-sensitive microspheres for the delivery of diclofenac sodium to the intestine*, Journal of Controlled Release (2004), 96: 9-20.
 27. Schrader M.E., Loeb G.I., *Modern Approaches to Wettability. Theory and Applications*, New York: Plenum Press. (1992), ISBN 0306439859.
 28. Marmur A., *Wetting of Hydrophobic Rough Surfaces: To be heterogeneous or not to be*, Langmuir (2003), 19: 8343-8348.
 29. Margaron Y, **Bostan L.**, Exposito J.-Y., Malbouyres M., Trunfio-Sfarghiu A.-M., Berthier Y., Lethias C., *Tenascin-X increases the stiffness of collagen gels without affecting fibrillogenesis*, Biophysical Chemistry (2010), 147: 87-91.
 30. Hayes W.C., Keer L.M., Herrmann G., Mockros L.F., *A mathematical analysis for indentation tests of articular cartilage*, Journal of Biomechanics (1972), 5(5): 541-551.
 31. Mow V.C., Ratcliffe A., *Structure and function of articular cartilage and meniscus*, In: Basic orthopaedic biomechanics, 2nd ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven (1997), p. 113-177.
 32. **Bostan L.**, Sfarghiu-Trunfio A.-M., Vereștiuc L., Popa M.I., Munteanu F., Berthier Y., *Macro and nano-tribological characterisation of a new HEMA hydrogel for articular cartilage replacement*, Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering (2010), 13(1): 33-35, ISSN: 1025-5842.
 33. Gong J.P., Osada Y., *Surface friction of polymer gels*, Polymeric Science (2002), 27: 3-38.
 34. Macirowski T., Tepic S. and Mann R.W., *Cartilage stresses in the human hip joint*, ASME (1994), 116: 10-18.

-
35. Stolz M., Raiteri R., Daniels A.U., VanLandingham M.R., Baschong W., and Aebi U., *Dynamic Elastic Modulus of Porcine Articular Cartilage Determined at Two Different Levels of Tissue Organization by Indentation-Type Atomic Force Microscopy*, Biophysical Journal (2004), 86: 3269-3283.
36. Hadjiioannou T.P, Christian G.D, Koupparis M.A. and Macheras P.E., *Quantitative Calculations in Pharmaceutical Practice and Research*, VCH Publishers Inc., New York(1993), p. 345-348.
37. Bourne D.W.A., *Pharmacokinetics*, In: Banker GS, Rhodes CT, Modern Pharmaceutics, 4th ed., Marcel Dekker Inc., New York (2002), p. 67-92.
38. Higuchi T., *Mechanism of sustained action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices*, Journal of Pharmarmaceutical Science (1963), 52: 1145-1149.
39. Hixson A.W. and Crowell J.H., *Dependence of reaction velocity upon surface and agitation (I) theoretical consideration*, Industrial Engineering Chemistry (1931), 23: 923-931.