

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI

Școala Doctorală a Facultății de Inginerie Chimică
și Protecția Mediului



BIOMATERIALE COMPOZITE PE BAZĂ DE BIOPOLIMERI ȘI FOSFAȚI DE CALCIU CU APLICAȚII ÎN INGINERIA TISULARĂ A OSULUI

- Rezumatul tezei de doctorat -

Conducător de doctorat:

Prof.univ.dr.ing. Marcel Ionel Popa

Doctorand:

Bioinginer Constantin-Edi Tanase



Teza de doctorat a fost realizată cu sprijinul financiar al proiectului „Burse Doctorale - O Investiție în Inteligență (BRAIN)”.

Proiectul „Burse Doctorale - O Investiție în Inteligență (BRAIN)”, POSDRU/6/1.5/S/9, ID 6681, este un proiect strategic care are ca obiectiv general „Îmbunătățirea formării viitorilor cercetători în cadrul ciclului 3 al învățământului superior - studiile universitare de doctorat - cu impact asupra creșterii atractivității și motivației pentru cariera în cercetare”.

Proiect finanțat în perioada 2008 - 2011.

Finanțare proiect: 14.424.856,15 RON

Beneficiar: Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași

Partener: Universitatea “Vasile Alecsandri” din Bacău

Director proiect: Prof. univ. dr. ing. Carmen TEODOSIU

Responsabil proiect partener: Prof. univ. dr. ing. Gabriel LAZĂR

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GH. ASACHI" IAȘI
RECTORATUL

Către.....

Vă facem cunoscut că în ziua de 27 octombrie 2011 la ora 16⁰⁰, în sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

“ BIOMATERIALE COMPOZITE PE BAZĂ DE BIOPOLIMERI ȘI FOSFAȚI DE CALCIU CU APLICAȚII ÎN INGINERIA TISULARĂ A OSULUI”

elaborată de domnul bioing. **Constantin-Edi TANASE** în vederea conferirii titlului științific de doctor în chimie.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

Prof.univ.dr.ing. **Nicolae HURDUC**

președinte

Universitatea Tehnică "Gh. Asachi" din Iași

Prof.univ.dr.ing. **Ionel Marcel POPA**

conducător științific

Universitatea Tehnică "Gh. Asachi" din Iași

Prof.univ.dr. **Ion POEATĂ**

membru

Universitatea de Medicină și Farmacie "Gr.T.Popa" din Iași

Conf.univ.dr.chim. **Doina HUMELNICU**

membru

Universitatea "Al. I. Cuza" din Iași

Conf.univ.dr.ing. **Liliana VEREȘTIUC**

membru

Universitatea de Medicină și Farmacie "Gr.T.Popa" din Iași

Vă trimitem rezumatul tezei de doctorat cu rugămintea de a ne comunica, în scris, aprecierile dumneavoastră. Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

RECTOR,

Prof. univ. dr. ing. **ION GIURMA**



Secretar universitate,

Ing. Cristina Nagăț

Mulțumiri:

În primul rând aș vrea să mulțumesc familiei mele, care mi-a fost aproape și m-a susținut în tot acest timp.

Mulțumesc domnului prof.dr.ing. Marcel Ionel Popa, căruia îi sunt recunoscător pentru oportunitatea oferită de a lucra sub îndrumarea acestuia. Determinarea, creativitatea, viziunea, entuziasmul și dedicația sa profesională au fost pentru mine adevărate inspirații. Vreau să îl felicit pentru toate realizările de până acum și îi doresc mult succes pe viitor.

De asemenea, doresc să mulțumesc doamnei conf.dr.ing Liliana Vereștiuc cu care am avut privilegiul de a colabora pe diferite subiecte care au fost esențiale pentru realizarea acestei teze de doctorat. Aș dori să îi mulțumesc pentru răbdarea, rigoarea și generozitatea sa.

Vreau să mulțumesc domnului prof.dr. James Kirkpatrick, domnului dr. Ronald Unger și domnișoarei Anne Sartoris pentru sprijinul și sfaturile acordate pe parcursul stagiului de cercetare efectuat în cadrul REPAIR Lab, al Institutului de Patologie—Centrul Medical Universitar Johannes Gutenberg-Mainz.

Cele mai sincere mulțumiri le adresez colectivului de Chimie-Fizică, doamnei conf.dr. Gabriela Lisă și doamnei dr.ing. Doina Hrițcu, pentru sprijinul acordat în diverse ocazii.

Adresez cele mai sincere mulțumiri colegilor de birou Luciana, Simona, Gianina, Ana-Maria și Ovidiu, pentru sprijinul și sfaturile pertinente primite. În mod special vreau să îi mulțumesc Verei, pentru tot ce a făcut pentru mine, iar exemplul ei a fost motivația mea cea mai provocatoare. A fost o plăcere să împărtășesc acești ani cu voi și vă mulțumesc tuturor pentru sprijinul acordat.

Cu respect, tuturor,

Constantin Edi Tanase

Dedic această teză tatălui meu,

Constantin C. Tanase
(1959-2011)

"Inspirația există, dar trebuie să te găsească muncind"

Pablo Ruiz Picasso (1881 -1973)

CUPRINS

ABREVIERI	i
INTRODUCERE	iii
Capitolul I—Stadiul actual	
I. BIOMATERIALE CU APLICAȚII ÎN INGINERIA TISULARĂ A OSULUI	1
I.1. Concepte teoretice	1
I.2. Structura, compoziția și funcția țesutului osos	3
I.2.1. Structura și compoziția țesutului osos	3
I.2.2. Osteoblastele și Osteocitele	4
I.2.3. Osteoclastele	5
I.2.4. Modelarea țesutului osos	6
I.2.5. Metabolismul țesutului osos	7
I.2.6. Proprietățile mecanice ale țesutului osos	9
I.3. Ingineria Țesutului osos	9
I.4. Biomateriale utilizate în ingineria tisulară a osului	10
I.4.1. Materiale polimerice biodegradabile utilizate în ingineria tisulară a țesutului osos	11
I.4.1.1. Biomateriale polimerice naturale	12
I.4.1.1.1. Proteinele	13
I.4.1.1.2. Polizaharidele	18
I.4.1.2. Biomateriale polimerice sintetice	28
I.4.1.2.1. Poliesterii saturați alifatici	28
I.4.1.2.2. Polihidroxialcanoatii	31
I.4.2. Ceramici bioactive	32
I.4.3. Aplicații ale compozitelor polimer—fosfați de calciu în ingineria tisulară a țesutului osos	36
I.5. Biomimetica	40
I.6. Concluzii	40
II. STRATEGIA EXPERIMENTALĂ	42
II.1. Obținerea compozitelor pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu	44
II.2. Materiale	45
II.2.1. Reactivi	45
II.3. Metode de analiză	48
II.3.1. Spectroscopia IR (FTIR)	48
II.3.2. Analiză elementală	48
II.3.3. Microscopia electronică de baleiaj (SEM)	50
II.3.4. Microscopia confocală cu baleiaj laser	50
II.3.5. Difrakția cu raze X (XRD)	51
II.3.6. Analiza prin energie de dispersie a razelor X (EDX)	52
II.3.7. Comportamentul în soluții de interes biologic	53
II.3.8. Studii de degradare <i>in vitro</i>	54
II.3.9. Analize mecanice	56
II.3.10. Evaluarea biocompatibilității	56
II.3.10.1. Izolarea și cultivarea celulară	56
II.3.10.2. Vizualizarea celulelor	57
II.3.10.3. Studii de viabilitate celulară	58
II.3.10.3.1. Analize MTS	58

II.3.10.3.2. Măsurarea activității LDH-ului	59
II.3.10.4. Analiza expresiei genetice	60
II.3.10.4.1. Metode imunoenzimatică (ELISA) pentru cuantificarea VEGF-ului	60
II.3.11. Programe experimentale	61
II.3.11.1. Prelucrarea datelor experimentale	62
SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA COMPOZITELOR PE BAZĂ DE BIOPOLIMERI ȘI FOSFAȚI DE CALCIU	
III. COMPOZITE PE BAZĂ DE CHITOSAN ȘI FOSFAȚI DE CALCIU	65
III.1. Obținerea compozitelor pe bază de chitosan și fosfați de calciu	65
III.2. Analiza compozitelor obținute prin procedeul amestecare-uscarea	69
III.2.1. Determinarea compoziției—analiza elementală	69
III.2.2. Analiza compozitelor prin spectroscopie FTIR	70
III.2.3. Analiza materialelor prin XRD și EDX	71
III.2.4. Comportarea în soluții de interes biologic	74
III.2.5. Studii de degradare <i>in vitro</i> și morfologia compozitelor	76
III.2.6. Analiza mecanică	78
III.3. Analiza compozitelor pe bază de chitosan și fosfați de calciu obținute prin procedeul amestecare-liofilizare	80
III.3.1. Analiza prin spectroscopie FTIR și morfologia compozitelor Cs-CP liofilizate	80
III.3.2. Analiza fazei anorganice din compozitelor Cs-CP liofilizate	81
III.3.3. Analiza mecanică a compozitelor Cs-CP liofilizate	82
III.4. Concluzii	83
IV. COMPOZITE PE BAZĂ DE CHITOSAN-ACID HIALURONIC ȘI FOSFAȚI DE CALCIU	85
IV.1. Obținerea compozitelor pe bază de chitosan-acid hialuronic și fosfați de calciu	85
IV.2. Analiza compozitelor obținute prin procedeul amestecare-uscarea	86
IV.2.1. Analiza prin spectroscopie FTIR	86
IV.2.2. Analiza probelor prin XRD și EDX	88
IV.2.3. Comportarea în soluții de interes biologic	90
IV.2.4. Studii de degradare <i>in vitro</i> și morfologia compozitelor	91
IV.2.5. Analiza mecanică	93
IV.3. Analiza compozitelor obținute prin procedeul amestecare-liofilizare	93
IV.3.1. Analiza FTIR a compozitelor Cs-Hya-CP liofilizate	93
IV.3.2. Analiza mecanică a compozitelor Cs-Hya-CP liofilizate	94
IV.4. Concluzii	95
V. COMPOZITE PE BAZĂ DE CHITOSAN-CHONDROITIN SULFAT ȘI FOSFAȚI DE CALCIU	97
V.1. Obținerea compozitelor pe bază de chitosan-chondroitin sulfat și fosfați de calciu	97
V.2. Analiza compozitelor obținute prin procedeul amestecare-uscarea	98
V.2.1. Analiza prin spectroscopie FTIR	98
V.2.2. Analiza probelor prin XRD și EDX	99
V.2.3. Comportarea în soluții de interes biologic	101
V.2.4. Studii de degradare <i>in vitro</i> și morfologia compozitelor	102
V.2.5. Analiza mecanică	104

V.3. Analiza compozitelor obținute prin procedeul amestecare-liofilizare	104
V.3.1. Analiza FTIR a compozitelor Cs-CP liofilizate	104
V.3.2. Analiza mecanică a compozitelor Cs-CP liofilizate	105
V.4. Concluzii	106
 VI. STUDII <i>IN VITRO</i> ASUPRA BIOCOMPATIBILITĂȚII MATERIALELOR	109
VI.1. Evaluarea citotoxicității celulare directe	111
VI.2. Studiarea viabilității celulare — teste MTS	112
VI.3. Evaluarea activității LDH-ului	114
VI.4. Cuantificarea VEGF-ului	116
VI.5. Vizualizarea compozitelor după culturi celulare	118
VI.6. Concluzii	119
 VII. CONCLUZII GENERALE	121
 DISEMINAREA REZULTATELOR OBȚINUTE	124
 REFERINȚE BIBLIOGRAFICE	127

Abrevieri

↑	Creștere
↓	Descrescere
°C	Grade Celsius
ACP	Fosfați amorfi de calciu
aprox.	Aproximativ
BCP	Fosfați de calciu bifazici
bFGF	Factor de creștere fibroblastic
bmSC	Celule umane stromale din măduva osoasă
BSA	Albumină din ser bovin
CA	Apatite carbonatate
CaCl ₂	Clorură de calciu
cca.	Circa
CDHap	Hidroxiapatită deficită în calciu
ChS	Chondroitin sulfat
CP	Fosfați de calciu
Cs	Chitosan
DA	Grad de acetilare
Da	Daltoni
DCPA	Fosfat dicalcic anhidru, monetit
DCPD	Fosfat dicalcic dihidrat, brușit
DD	Grad de deacetilare
DMAc	N,N-dimetilacetamidă
DMEM	Mediu de cultura Dulbecco modificat
EC	Celule endoteliale
ECM	Matrice extracelulară
EDTA	Acid Etilendiaminotetraacetic
EtOH	Oxid de etilen
EULAR	Comitetul European Impotriva Reumatismului
FBS	Ser bovin
GAG	Glicozaminoglicani
GalNAc	N-acetil-galactozamina
GlcA	Acidului glucuronic
GPa	Giga Pascali
Hap	Hidroxiapatită
HCA	Hidroxiapatită carbonată
HDMEC	Celule endoteliale microvasculare dermale umane
HOS	Osteoblaste primare umane
Hya	Acid hialuronic
LDH	Lactat de hidrogenază
M199	Mediu de cultura bazal endotelial
MCMP	Fosfat monocalcic monohidrat
MG63	Linie celulară osteoblastică umană
MPa	Mega Pascali

MTS	Sare de tetrazoliu—(3-4,5-dimetiltiazol-2-il-5-3-carboximetoxifenil-2-4-sulfofenil-2H-tetrazoliu)
NAG	N-acetil-D-glucozamina
NF-kB	Factor de transcripție celular care activează expresia genelor implicate în inflamație
Ob	Osteoblaste
Oc	Osteoclaste
OCP	Fosfat octocalcic
P/S	Penicilina/Streptomicină
PBS	Soluție tampon fosfat
PCL	Poli (ε-caparolactona)
PGA	Poli (acid glicolic)
PHT	Hormonul paratiroidian
PLA	Poli (acid lactic)
PMMA	Poli (metilmetacrilat)
POE	Poli (orto-esteri)
PPF	Poli (propilen-fumarat)
rad	Radiani
RANK	Receptor activator al NF-kB
s.d.	Deviația standard
Streptavidin-HRP	Streptavidină-peroxidază din hrean
TCP	Fosfat tricalcic
TMB	Tetrametilbenzidină
u.a.	Unități arbitrare
VEGF	Factor de creștere endotelial vascular
α-TCP	α-Fosfat tricalcic
β-TCP	β-fosfat tricalcic

INTRODUCERE

În ultimii ani suporturile biodegradabile pe bază de polimeri naturali, cum ar fi polizaharide sau proteine, prezintă un interes ridicat în domeniul ingineriei regenerative a țesutului osos ca urmare a caracteristicilor acestora precum biocompatibilitatea și osteoconductivitatea ridicată.

Suportul ideal pentru ingineria țesutului osos trebuie să ofere o bioresorbabilitate bună, biocompatibilitate pentru a stimula atașarea celulară, proliferarea și diferențierea celulară și să se degradeze odată cu formarea de nou țesut osos. Aceste suporturi joacă un rol important în ingineria tisulară prin ghidarea creșterii noului țesut *in vivo* și *in vitro*.

Materialele suport acționează ca o matrice de ancorare pentru celule, stimulând răspunsurile celulare specifice și, de asemenea, sunt responsabile de atragerea celulelor în zonele în care sunt implantate. În conceperea acestor suporturi proprietățile fizico-chimice sunt esențiale deoarece influențează și contactul direct cu celulele și țesuturile învecinate.

Deși materiale polimerice utilizate ca atare au arătat unele rezultate pozitive pentru regenerare osoasă, eforturi susținute s-au orientat spre îmbunătățirea și stimularea răspunsului țesutului osos prin utilizarea de compozite obținute prin amestecarea materialelor polimerice cu ceramici pe bază de fosfați de calciu.

Chitosanul este un biopolimer cationic, fiind studiat pentru o gamă largă de aplicații biomedicale cum ar fi pansamente dermale, suporturi pentru eliberare de principii active, datorită proprietăților sale de non-toxicitate, biodegradabilitate, biocompatibilitate, bioresorbabilitate, activitatea antibacteriană și caracteristici hemostatice. Producții săi de degradare sunt non-toxici, non-imunogenici și non-cancerigeni și împreună cu proprietățile sale osteoconductive îl fac un candidat promițător pentru substituția țesutului osos.

Ceramicile pe bază de fosfați de calciu sunt materiale care s-au dovedit a fi produse excelente pentru regenerarea țesuturilor osoase, datorită osteoconductivității, proprietăților de biocompatibilitate și a structurii chimice asemănătoare cu minerale din țesutul osos, cu o stabilitate ridicată în condiții biologice, fiind utilizate ca material de substituție pentru regenerarea și creșterea țesutului osos. Studiile clinice au arătat că fosfații de calciu sunt atât biocompatibili cât și rezistenți la infecții; în plus acoperirea implanturilor ortopedice cu fosfați de calciu îmbunătățește rata de succes a acestora.

Combinarea polimerilor naturali cu fosfați de calciu poate duce la obținerea de noi substituenți osoși ce îmbină proprietățile acestor două clase de materiale. O abordare în refacerea defectelor osoase utilizând materiale natural-sintetice reprezintă un progres la ceea ce în prezent este reprezentat de grefele osoase și ingineria reparatorie a țesutului osos.

Teza de față își propune obținerea și caracterizarea unor materiale compozite natural-sintetice, care să aibă atât structura chimică și morfologică cât și proprietățile mecanice similare cu cele ale țesutului osos. Lucrarea este alcătuită din două părți, una teoretică și cealaltă

experimentală, structurată în șase capitole, în care: primul capitol reprezintă partea teoretică, iar celelalte, partea originală, experimentală.

Capitolul I intitulat „*Biomateriale cu aplicații în ingineria tisulară a osului*” prezintă principalele caracteristici ale țesutului osos, precum structura, compoziția și funcția acestuia, împreună cu stadiul actual al biomaterialelor natural-sintetice utilizate în ingineria regenerativă a țesutului osos. Stadiul actual al materialelor utilizate pentru substituția osoasă sunt prezentate împreună cu dezavantajele acestora, subliniindu-se caracteristicile ideale ale unui material de substituție osoasă. Pentru obținerea de noi substituenți osoși ce conferă proprietăți unice structurale, morfologice și mecanice au fost analizați diferiți polimeri naturali și fosfați de calciu, caracteristicile acestora, împreună cu aplicațiile biomedicale. În urma acestui studiu s-au evidențiat principalele obiective de cercetare ale lucrării și elementele de noutate ce pot fi abordate.

În **capitolul II**, „*Strategia experimentală*”, este prezentat conceptul experimental al lucrării având drept scop obținerea de noi materiale pe bază de biopolimeri (chitosan, acid hialuronic, chondroitin sulfat) și fosfați de calciu utilizând procedee biomimetice de procesare. De asemenea sunt prezentate tehnicile de analiză, materialele și metodele utilizate în analiza materialelor obținute.

Capitolul III, intitulat „*Compozite pe bază de chitosan și fosfați de calciu*” este dedicat prezentării rezultatelor experimentale privind obținerea și caracterizarea de compozite pe bază de chitosan și fosfați de calciu, realizate prin metode biomimetice (temperatură și pH fiziologice; 37°C și pH 7,2). Prin precipitarea fosfaților de calciu pe fibra de chitosan se poate regla caracteristicile de degradare ale compozitului final. Materialele obținute au fost caracterizate prin spectroscopie FTIR, analiză elementală, difracție de raze X, spectroscopie de raze X prin dispersie de energie, s-a analizat comportamentul în soluții de interes biologic, microscopie electronică de baleiaj, s-au efectuat studii de degradare *in vitro* și testarea mecanică.

În **capitolul IV** „*Compozite pe bază de chitosan, acid hialuronic și fosfați de calciu*”, se prezintă sinteza și caracterizarea compozitelor pe bază de chitosan, acid hialuronic și fosfați de calciu păstrând aceleași condiții biomimetice de lucru. Evaluarea influenței acidului hialuronic asupra compozitelor Cs-CP a fost descrisă pentru fiecare metodă de caracterizare în parte. Analiza proprietăților fizico-chimice, morfologice, mecanice și a comportamentului în soluții de interes biologic au fost efectuate cu scopul de a obține cât mai multe informații despre structura și caracteristicile compozitelor.

Capitolul V intitulat „*Compozite pe bază de chitosan, chondroitin sulfat și fosfați de calciu*” prezintă sinteza și caracterizarea compozitelor în condiții fiziologice (pH-7,2 temperatură 37°C). Influența chondroitin sulfatului asupra proprietăților fizico-chimice ale compozitelor a fost detaliată pentru fiecare metodă de caracterizare în parte.

În **capitolul VI** „*Studii in vitro asupra biocompatibilității materialelor*”, sunt prezentate rezultatele testelor de viabilitate/citotoxicitate celulară precum și a celor imunoenzimatice, precum și determinarea factorului de creștere endotelial vascular cu rol în procesul de atașare și

proliferație, celulară utilizând trei tipuri de celule diferite (MG63, HOS și HDMEC). Aceste analize sunt necesare în evaluarea proprietăților de biocompatibilitate a compozitelor Cs-CP.

Rezultatele obținute pe parcursul acestei teze au fost valorificate prin publicarea și trimiterea spre publicare a 6 lucrări, dintre care 3 articole în reviste cu factor de impact, precum și comunicarea rezultatelor la 15 manifestări științifice interne și internaționale.

Menționez că numerotarea capitolelor, figurilor, tabelelor, relațiilor matematice și bibliografiei din prezentul rezumat este aceeași cu cea din teza de doctorat.

II.Strategia experimentală

O mare varietate de biomateriale sunt utilizate astăzi în chirurgia plastică și reconstructivă a țesutului osos și a cartilajului articular.

Materialele cu utilizări în ingineria țesutului osos trebuie să prezinte o serie de caracteristici legate de structura lor fizico-chimică și caracteristici mecanice (proprietăți chimice și mecanice), de interacțiunea cu mediului fiziologic în care vor fi utilizate (condiții fiziologice) și de proprietățile acestora de a permite atașarea și proliferarea celulară. Datorită proprietăților importante necesare, precum biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, proprietăți mecanice și osteoconductivitatea, numărul de materiale ce se pretează pentru astfel de aplicații este restrâns.

Un rol important în dezvoltarea de noi produse cu aplicații biomedicale este reprezentat de utilizarea de BIOPOLIMERI, datorită biocompatibilității ridicate, biodegradabilității, oferind astfel materialului final un potențial ridicat de utilizare în ingineria tisulară. Pe de altă parte combinarea cu diverse materiale anorganice ce și-au dovedit de-a lungul anilor biocompatibilitatea, osteoconductivitatea face ca materialele compozite polimer-anorganice obținute să cuprindă proprietăți ale ambelor tipuri de materiale, completându-se astfel reciproc.

Strategiile biomimetice de realizare a compozitelor care conțin componentă anorganică sunt inspirate din procesele naturale de mineralizare, unde mineralele sintetizate de către organism, sunt combinate de obicei sub formă de compozite cu proteine, polizaharide sau alte forme de origine biologică, în condiții fiziologice de temperatură (37°C) și pH (7,2—7,4). Aceste condiții permit încorporarea de substanțe bioactive, fără compromiterea performanțelor și chiar pot îmbunătăți funcționalitatea fazei anorganice.

În urma analizei stadiului actual al cercetărilor științifice realizate în direcția materialelor pentru substituția tisulară a țesutului osos s-a optat pentru lucrarea de față la o strategie de cercetare care a avut ca obiectiv central:

Obținerea prin metode biomimetice de compozite pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu cu potențiale aplicații în ingineria țesutului osos.

În alegerea materialelor de bază pentru obținerea substituenților osoși s-a urmărit utilizarea unui polimer biodegradabil care să imite ECM a țesutului osos și care prin degradarea acestuia să nu influențeze procesele metabolice de la acest nivel, precum și o fază anorganică care să mimeze îndeaproape forma, structura și compoziția cristalelor de Hap și CP de la nivelul țesutului osos natural.

Datorită proprietăților precum, biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, aderarea celulară, non-toxicitate, proliferarea diferitelor tipuri de celule, caracteristici atribuite datorită densității ridicate de sarcini cationice și a interacțiunilor electrostatice cu compușii anionici precum factorii de creștere și ADN, biopolimerii Cs, Hya și ChS au fost aleși ca parte organică a substituentului osos. Mai mult decât atât, prin degradarea enzimatică *in vivo* a acestor biopolimeri se obțin reziduuri de glucozamină, similare cu structura componentelor din ECM.

Pentru partea anorganică a substituentului au fost aleși CP sintetici, deoarece prezintă o structură similară cu cea a mineralului primar din componența țesutului osos cât și pentru proprietățile lor cum ar fi, osteoinducția, osteoconducția, osteointegrarea, demonstrate în diferite studii *in vitro* și *in vivo*. Aceștia au fost obținuți prin precipitarea din precursorii: CaCl_2 și NaH_2PO_4 . Prin utilizarea proceselor biomimetice se urmărește formarea de CP cu structură și funcționalitate asemănătoare apatitelor biologice din corpul uman, asigurând o refacere și regenerare eficientă a țesutului osos afectat.

Pe lângă obținerea de noi materiale pentru substituția osoasă pe bază de biopolimeri și CP, prin metode biomimetice de co-precipitare *in situ* sub diferite forme, un obiectiv important al lucrării de față îl constituie evaluarea biocompatibilității compozitelor formate.

Compozitele biopolimeri-CP au fost analizate din punct de vedere al compoziției fazei organice/anorganice, a structurii și morfologiei urmărindu-se interacțiunile ce au loc între biopolimeri și CP. De asemenea s-a urmărit și comportamentul materialelor în soluții de interes biologic, degradarea enzimatică *in vitro*, comportarea mecanică la solicitări de compresiune precum și biocompatibilitatea pentru compozitele ce au evidențiat proprietăți mecanice adecvate.

Noutatea acestei lucrări constă în obținerea compozitelor utilizând un proces biomimetic de co-precipitare a CP în soluția de Cs. Strategia formării cristalelor de CP prin precipitarea în prezență de Cs este similară cu procesul natural de formare a țesutului osos. Datorită proprietăților materialelor alese, se poate afirma că biomaterialul propus a se realiza în această lucrare este un material compozit din a treia generație de biomateriale.

Pentru realizarea obiectivelor s-a recurs la o strategie experimentală de tip multifactorial, utilizându-se programe experimentale cu două variabile independente, prelucrarea datelor experimentale cu modele matematice urmărind furnizarea unor informații privind fenomenologii existente, manifestarea efectelor sinergetice și stabilirea condițiilor de optimizare.

III. Compozite pe bază de chitosan și fosfați de calciu

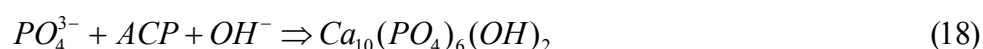
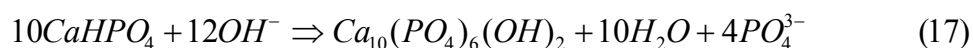
Datele existente în literatura de specialitate care abordează materialele pentru substituție osoasă evidențiază dezavantajele utilizării autogrefelor (limitarea cantității de țesut osos ce poate fi prelevat de la același pacient, posibilitatea apariției unor complicații, resorbția grefelor), alogrefelor (proprietăți mecanice scăzute, resorbție osoasă, reducerea proprietăților osteogenice, riscul de transmitere a unor boli), accentuând necesitatea dezvoltării unor noi materiale natural-sintetice care să evite pe cât de mult posibil aceste inconveniente.

Diversitatea proprietăților Cs cum ar fi biocompatibilitate, biodegradabilitatea *in vivo*, adeziunea și proliferarea osteoblatelor alături de posibilitățile de alegere a caracteristicilor fizico-chimice ale acestuia, contribuie la creșterea interesului față de implicarea acestui biopolimer în formarea de noi compozite cu potențiale aplicații în ingineria tisulară a țesutului osos. CP sintetici precum Hap prezintă o structură asemănătoare mineralului primar din componența țesutului osos. Datorită proprietăților acestora precum biocompatibilitate, bioactivitate, osteoinductivitate ridicată, ne-toxicitate, acestea sunt utilizate ca materiale de substituție osoasă. Utilizând metode biomimetice (temperatură și pH fiziologic) de co-precipitare a CP în soluția de Cs, în lucrarea de față s-a urmărit formarea cristalelor de CP în condiții asemănătoare cu cele din organismul uman. Compozitele Cs-CP au fost obținute prin procedee de amestecare—uscare și amestecare—liofilizare urmărindu-se influența Cs cât și a raportului Ca/P asupra caracteristicilor materialelor rezultate.

III.1. Obținerea compozitelor pe bază de chitosan și fosfați de calciu

Compozitele s-au obținut prin precipitarea CP din precursorii săi, și anume CaCl_2 și NaH_2PO_4 , într-o soluție de Cs, în prezența de NH_4OH , procesul desfășurându-se în condiții fiziologice. Compozitele pe bază de Cs și CP au fost ulterior prelucrate prin procedee de amestecare-uscare și amestecare-liofilizare.

Mecanismul de formare a CP, incluzând Hap sintetică, cuprinde două etape: (1) formarea de brușit instabil și ACP, (2) formarea de Hap cristalină conform reacției [229]:



Datorită valorii $\text{pK}_a \sim 6,3$ al Cs-ului, prin precipitarea CP la un pH $\sim 7,2$, lanțurile polimerice de Cs vor trece din starea de destindere în starea de aglomerare, în acest mod cristale de CP formate sau în curs de formare vor fi cuprinse între fibrele de polimer precipitate. Studiile

de literatură au evidențiat că axa c a Hap și CP tind să se alinieze de-a lungul fibrelor de Cs [230].

În figura III.1 este exemplificat procesul de precipitare și formare a CP pe fibrele de Cs astfel: (a) omogenizarea soluțiilor de Cs cu CaCl_2 și NaH_2PO_4 ; (b) ionii de calciu și fosfat sunt absorbiți de matricea polimerică; la $\text{pH} \approx 5$, ionii de calciu și fosfat sunt încorporați în matricea de Cs; (c) la $\text{pH} 7$ se formează nuclee apatitice, ca urmare a difuziei ionilor Ca^{2+} și fosfat între fibrele de Cs în formare. În condiții alcaline, nucleele apatitice se transformă în cristale de TTCP, DCPA, DCPD etc; (d) cristalele de Hap se formează pe fibrele de Cs; (e) formarea compozitului Cs-CP.

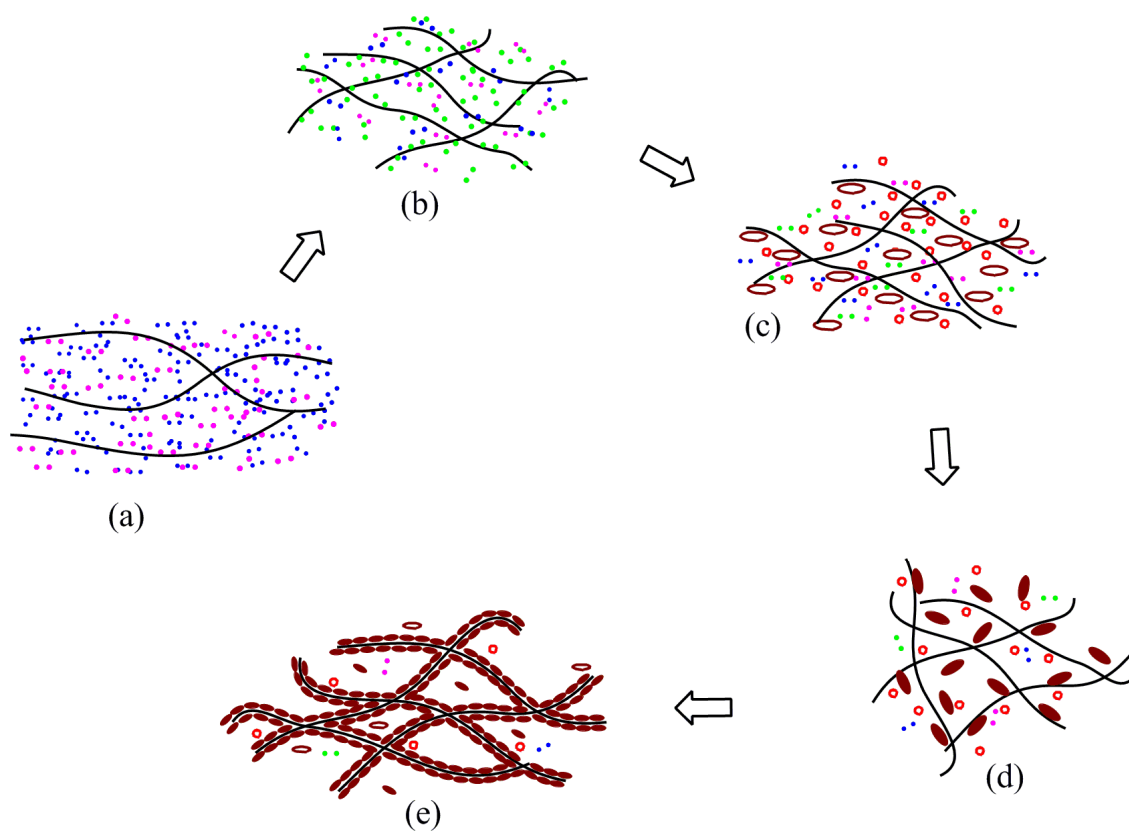


Figura III.1. Schema de formare a CP pe fibrele de Cs în mediu alcalin; — Fibra de polimer-Cs; $\cdot$ Ionii de Ca^{2+} , $\cdot$ ionii de PO_4^{2-} , $\cdot$ ioni OH^- , $\cdot$ nuclee apatitice, $\cdot$ DCPA, DCPD, TCP etc., $\cdot$ cristale de Hap și CP.

Schema interacțiunilor electrostatice dintre grupările polare hidroxil și amino ale Cs cu ionii de Ca^{2+} și PO_4^{3-} ale CP sunt prezentate în figura III.2.

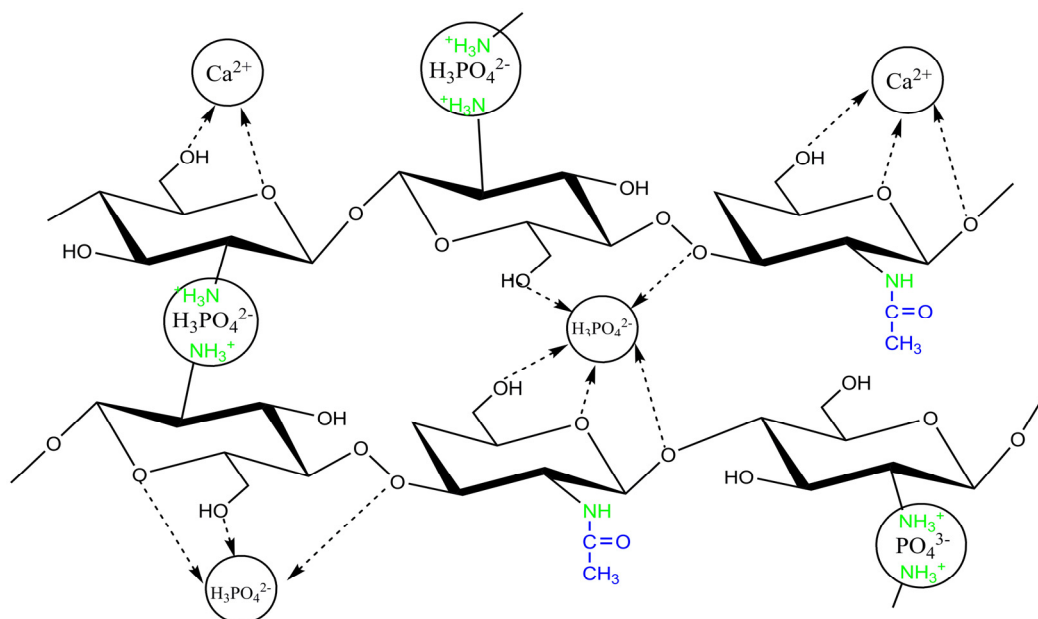


Figura III.2. Interacțiunile grupărilor polare dintre Cs și CP.

Pentru studierea influenței compoziției inițiale asupra materialelor obținute a fost folosit un program experimental cu două variabile (Cs și raportul Ca/P). Valorile variabilelor investigate din programul experimental împreună cu răspunsurile observate sunt prezentate în tabelul III.3.

Tablelul III.3. Programul experimental împreună cu valorile determinate pentru Cs, degradare și retenție pentru compozitele Cs-CP.

Nr. exp.	Codat		Y ₁ , Cs (%)	Y ₂ , Cs degradat (mmol/mL)	Y ₃ , Retenție (%)
	X ₁	X ₂			
1	-1	-1	24,17	50,97	138
2	1	-1	58,61	54,05	184
3	-1	1	12,17	53,31	155
4	1	1	60,87	53,03	158
5	-1,414	0	19,82	52,07	136
6	1,414	0	65,73	53,48	167
7	0	-1,414	46,95	52,01	163
8	0	1,414	46,95	53,03	166
9	0	0	46,95	52,18	152
10	0	0	46,95	52,18	152
11	0	0	46,95	52,17	153
12	0	0	46,95	52,20	153
13	0	0	46,95	52,19	154

Compozitele astfel obținute au fost caracterizate din punct de vedere al structurii și compoziției utilizând spectroscopia IR cu transformată Fourier (FTIR), microscopia electronică de baleiaj (SEM), difracția cu raze X (XRD), spectrometria de raze X cu dispersie de energie (EDX). De asemenea s-a urmărit comportamentul compozitelor în soluții de interes biologic precum și studii de degradare *in vitro*, s-au efectuat și teste de citotoxicitate.

III.2. Analiza compozitelor obținute prin procedeul amestecare-uscare

III.2.1. Determinarea compoziției—analiza elementală

CP au fost precipitați pe fibrele de Cs prin formarea de săruri dintre ionii de Ca^{2+} și cei PO_4^{3-} în condiții fiziologice de temperatură și pH. Ionii de Ca^{2+} sunt răspunzători de dislocarea moleculelor de apă ce înconjoară lanțurile de Cs respingându-se reciproc, astfel permițând reacția cu ionii PO_4^{3-} , ceea ce duce la formarea unor structuri tridimensionale ce vor precipita sub formă de CP pe fibrele de Cs.

Datorită structurii sale, Cs prezintă o afinitate ridicată pentru CP, iar caracterul sau hidrofil facilitează distribuția omogenă în soluția apoasă ce conține CP. Conținutul final de Cs pentru compozitele studiate este prezentat în figura III.3 A și B.

În figura III.3 A, se poate observa că conținutul de Cs din compozite crește odată cu creșterea cantității de Cs din compoziția inițială. Pentru conținutul de Cs de peste 35 % (raportat la concentrația totală de săruri minerale de $CaCl_2$ și NaH_2PO_4 , concentrația finală de Cs este ușor peste 60 %.

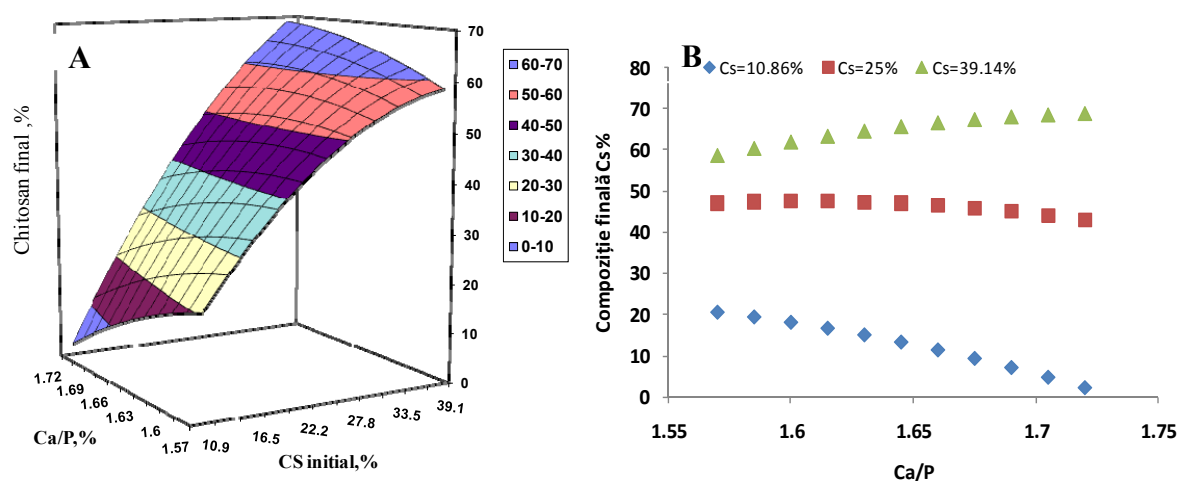


Figura III.3. A-Concentrația finală de CS în compozitele Cs-CP, corelată cu raportul inițial de Ca/P și cantitatea inițială de Cs, B-compoziția finală a compozitelor funcție de raportul Ca/P.

Din rezultatele obținute putem constata că odată cu descreșterea cantității de biopolimer, precipitarea CP este împiedicată datorită faptului că o parte din ioni sunt implicați în reacții cu Cs [243]. Variația Cs din compoziția finală a compozitelor funcție de raportul Ca/P este prezentat în figura III.3 B.

Se evidențiază o influență moderată a acestui parametru asupra conținutului componentului organic; la concentrații de 25 % Cs utilizat în compoziția inițială, cantitatea de biopolimer din compozit nu variază cu raportul Ca/P.

III.2.3. Analiza materialelor prin XRD și EDX

Pentru identificarea fazelor anorganice din compozitele obținute s-au utilizat standardele Centrului Internațional pentru Difracție (JCPDS). Figura III.5 prezintă difractograma XRD și picurile caracteristice pentru compozitele Cs-CP. Cristalinitatea acestor compozite scade la cantități ridicate de Cs din compoziție și, de asemenea, se observă apariția a diferitelor forme de CP (tabelul III.5). Toate aceste forme de CP sunt recunoscute ca fiind implicate în dezvoltarea noului țesut osos [214]. În compozite se observă o agregare preferențială a cristalelor de CP de-a lungul axei *c*, fapt relatat și de diferite studii în domeniu [235, 236]. În timpul procesului biomimetic de co-precipitare, s-a observat că prin precipitarea matricei biopolimerice, cristalele de CP sunt imobilizate printre fibrele de Cs [237].

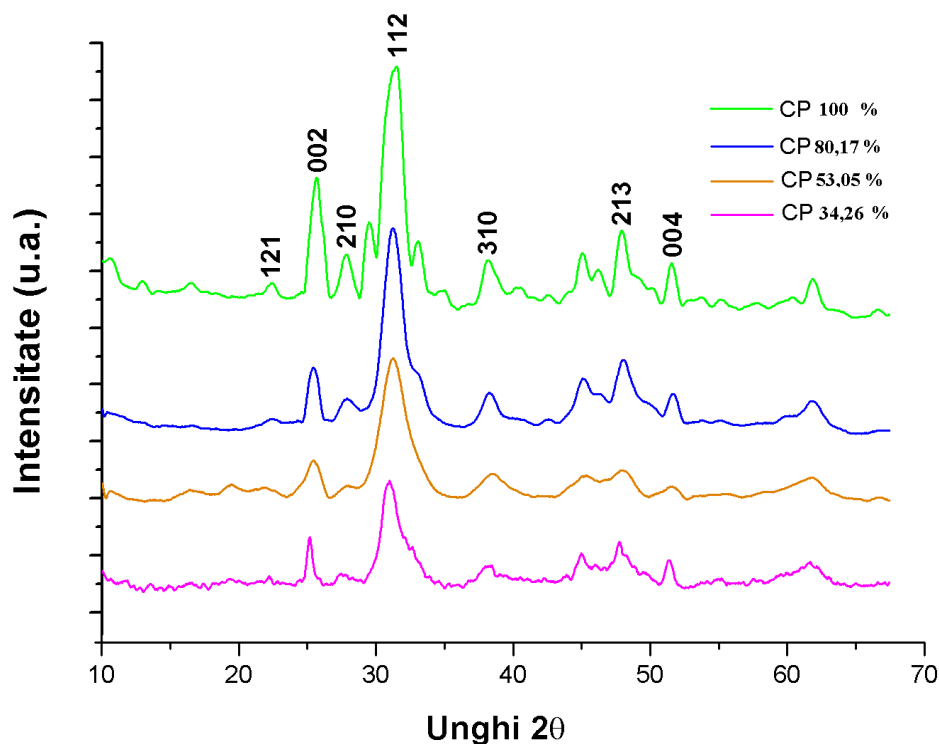


Figura III.5. Spectrul XRD pentru compozitele Cs-CP obținute prin procedeul de amestecare-uscare.

Formarea CP în matricea biopolimerului poate limita migrarea cristalelor de CP, ceea ce diminuează dezintegrarea compozitului la momentul aplicării acestuia ca substituent osos.

Rezultatele XRD indică faptul că cristalele majoritare din compoziția acestor materiale sunt atribuite Hap, căreia îi corespund planele 002 și 112.

Tabelul III.5. Diferite forme de CP prezente în compozitele Cs-CP conform JCPDS.

Unghi 2θ	Intensitate	Număr index *	Formula chimică
23	121	09-0347	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
26	002	44-0778	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$
28	210	44-0810	$\text{Ca}_3\text{H}_2(\text{P}_2\text{O}_7)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
31	112	72-1243	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$
49	213	72-1243	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$
53	004	02-1350	CaHPO_4

* conform J.P.C.D.S.

Mai mult decât atât, condițiile biomimetice (temperatura și pH fiziologic) utilizate în sinteza compozitelor pe bază de Cs-CP, conduc la formarea de cristale de CP cu dimensiuni apropiate apatitelor biologice din țesutul osos al adultului [214] și, prin urmare, aceste compozite pot fi un candidat pentru aplicații în ingineria regenerativă a țesutului osos [243].

Raportul molar, dintre calciu și fosfor a fazei minerale din compozite, a fost calculat din analizele EDX, prezentate în tabelul III.7. Datele EDX (figura III.6), confirmă formarea diferitelor forme de CP în structura compozitelor, conform raportului Ca/P obținut [243].

Table III.7. Raportul Ca/P inițial și final din compozitele Cs-CP.

Probe (Cs %)	Raportul teoretic Ca/P	Calciu-EDX (at.%)	Fosfor-EDX (at.%)	Raportul real Ca/P
19,82	1,65	12,57	8,26	1,52
46,95	1,65	8,59	4,93	1,74
65,74	1,65	8,75	5,04	1,73
46,95	1,57	7,93	4,67	1,69
46,95	1,65	8,59	4,93	1,74
46,95	1,72	12,71	7,20	1,76

III.2.4. Comportarea în soluții de interes biologic

O proprietate importantă a compozitelor Cs-Hap ce se doresc a fi utilizate ca substituent osos este corelată cu interacțiunea cu soluții de interes biologic. Rezultatele obținute pentru aceste studii sunt evidențiate în figura III.7 A și B. Retenția, de PBS a compozitelor Cs-CP, crește cu creșterea conținutului de Cs, pentru valori relativ mici ale raportului Ca/P, subliniind astfel că o creștere a cantității de Cs servește la îmbunătățirea retenției soluției de PBS deoarece

Cs crește hidrofilia compozitelor, datorită grupărilor polare, hidroxil și amino, din structura biopolimerului (figura III.7 A).

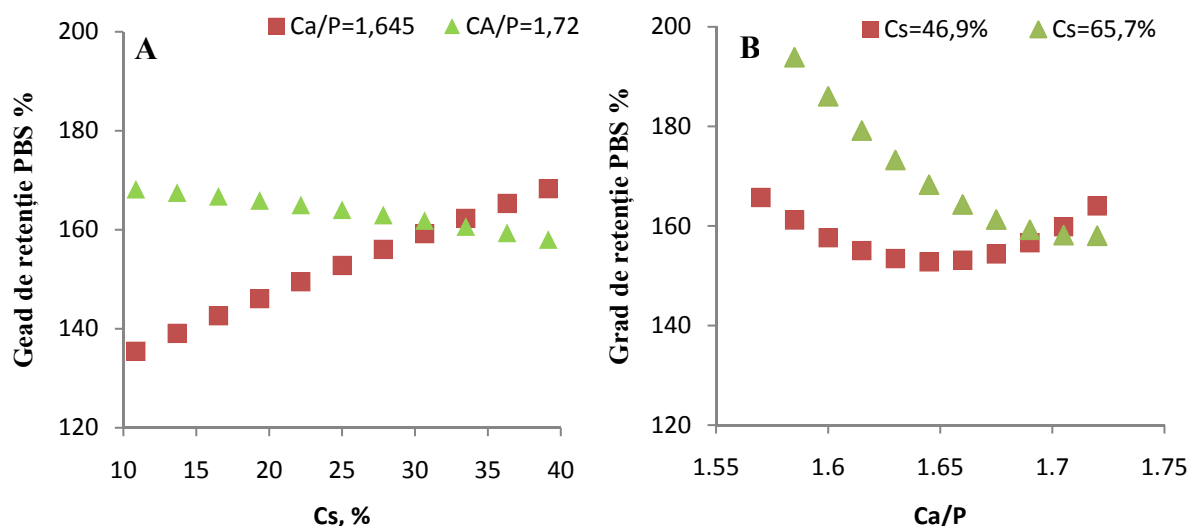


Figura III.7. Influență A-cantității de Cs teoretic și B-raportului Ca/P, asupra retenției de PBS.

În figura III.7 B se poate observa că retenția de PBS a compozitelor Cs-CP, pentru cantități reduse de Cs (46,9 %), are o tendință de scădere, apoi creștere cu creșterea raportului Ca/P, în timp ce la un conținut ridicat de Cs, gradul de retenție scade la valori mari ale raportului Ca/P, crește odată cu creșterea raportului Ca/P și implicit creșterea cantității de Ca din compozite [243].

În compozitele cu cantități ridicate de Cs (65,7 %) creșterea raportului Ca/P are un efect diferit asupra retenției de PBS; astfel retenția scade odată cu creșterea conținutului de Ca din compozite fiind corelată cu scăderea hidrofiliei compozitelor.

Toate aceste date indică o importantă contribuție adusă de interacțiunile electrostatice dintre grupările $-NH_3^+$ și $-OH$ ai Cs și ionii de PO_4^{3-} și Ca^{2+} din structura CP, asupra interacțiunilor compozit-soluție.

Interacțiunea compozitelor pe bază de Cs-CP cu soluția de PBS este strâns legată de compoziție: creșterea cantității de Cs duce la creșterea absorbției retenției de PBS. Această proprietate de reținerea a soluției PBS este atribuită proprietăților hidrofile și structurii poroase tridimensionale.

Prin adăugarea de albumina umană în PBS retenția soluției nu depășește valori de 200 %, iar parametrii analizați (cantitatea de Cs și raportul Ca/P) au o influență diferită asupra cantității finale de lichid acumulat (figura III.8). Retenția soluției de PBS-albumină a compozitelor Cs-CP, descrește cu creșterea conținutului de Cs pentru valori ridicate ale raportului Ca/P.

La rapoarte Ca/P mai mici creșterea cantității de Cs din compozite, permite interacțiunea cu albumina umană îmbunătățind retenția; legăturile de hidrogen se formează prin intermediul grupărilor polare hidroxil și amino ale Cs și grupările amino și carboxil ale albuminei umane.

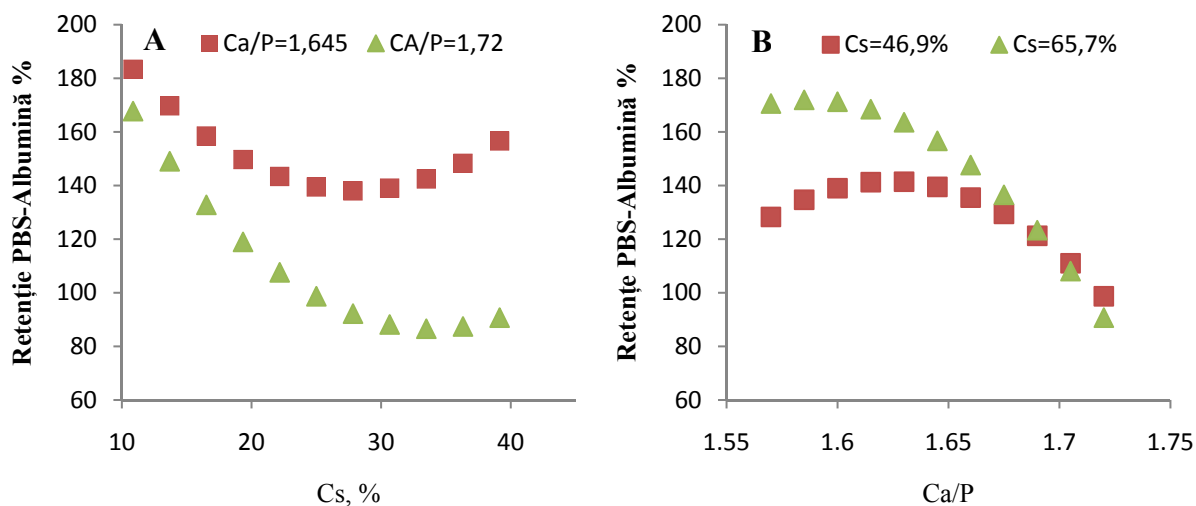


Figura III.8. Influență A-cantității de Cs teoretic și B-raportului Ca/P, asupra retenției compozitelor în PBS-albumină.

III.2.5. Studii de degradare *in vitro* și morfologia compozitelor

Studiile de degradare și stabilitate structurală a compozitelor reprezintă o metodă fiabilă și adecvată pentru evaluarea materialelor cu aplicații în ingineria tisulară [247]. Scopul principal al acestor studii de degradare, folosind lizozim, este de a reproduce cât mai fidel condițiile fiziologice. Studiile de degradare pentru diferite materiale cu aplicații în ingineria țesutului osos, au un rol crucial în evidențierea contribuției materialului la dezvoltarea pe termen lung a noului țesut osos.

Degradarea *in vitro* a compozitelor Cs-CP, a fost studiată în prezența lizozimului (1200 $\mu\text{g/L}$), enzimă principală responsabilă de degradarea Cs *in vivo* [248], la concentrații similare cu cele din serul uman (950-2450 $\mu\text{g/L}$) [249].

Rezultatele obținute anterior de către Freier și colab. [250] precum și de alți autori [251-254], subliniază faptul că lizozimul este principala enzimă ce degradează Cs și că acest biopolimer nu este degradat prin alte mecanisme de depolimerizare [247]. Prin degradarea Cs produșii de reacție rezultați conțin NAG, hetero și homo oligozaharide și Cs de masă moleculară mică, iar gradul de deacetilare (DD) al Cs-ului este un factor important în ceea ce privește aceste studii; degradarea este diminuată la Cs cu DD ridicat [255].

Acțiunea enzimei asupra degradării compozitelor pe bază de Cs-CP a fost studiată pe o perioadă de 14 zile.

Din studiile de degradare *in vitro* s-a observat o viteză lentă de degradare, figura III.9, fiind datorată DD ridicat și cristalinității Cs. Un alt motiv îl constituie faptul că matricea de Cs este strâns legată de CP datorită procesului de co-precipitare, îngreunând astfel pătrunderea lizozimului în compusul polimeric, rezultând o degradare lentă a compozitului.

Datorită caracterului hidrofil al Cs-ului, difuzia soluției de PBS în compozitele Cs-CP, este mult mai rapidă decât degradarea acestora, iar compozitele suferă un proces de retenție înainte de a fi degradate (figura III.9).

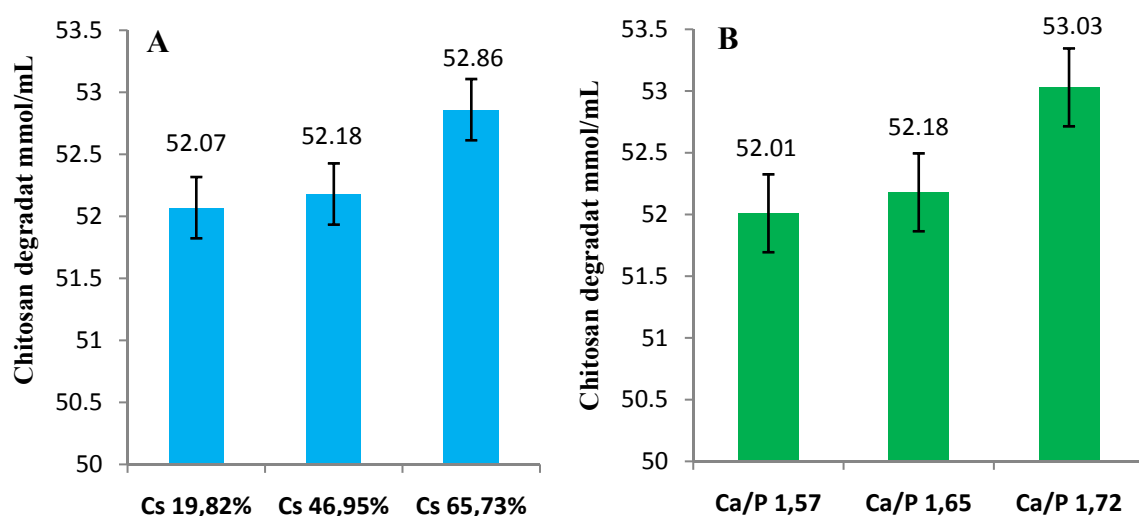


Figura III.9. Degradarea *in vitro* pentru compozitele cu: A- raport Ca/P 1.65, B-46.95 % Cs.

După cum se poate observa în figura III.9 viteza de degradare a compozitelor Cs-CP cu un conținut ridicat de Cs, la același raport Ca/P (1,65), este superioară față de restul compozitelor. Pentru studiile unde s-a urmărit degradarea compozitelor Cs-CP menținând același conținut de Cs (25 %) și modificând raportul Ca/P, se pare că viteză de degradare a matricei polimerice (Cs) crește cu creșterea conținutului de Ca din compoziția finală a compozitelor.

Imaginile de microscopie electronică de baleiaj, ale compozitelor Cs-CP cu un conținut de 19,82 % Cs, înainte (A) și după (B) degradare sunt prezentate în figura III.10.

În figura III.10 A se poate observa cum matricea polimerică (Cs) se comportă ca un liant cuprinzând cristalele de CP înăuntrul matricei. După 14 zile, compozitele Cs-CP sunt degradate de către lizozim, iar cristalele de CP nu mai sunt cuprinse în rețeaua polimerică, figura III.10 B.

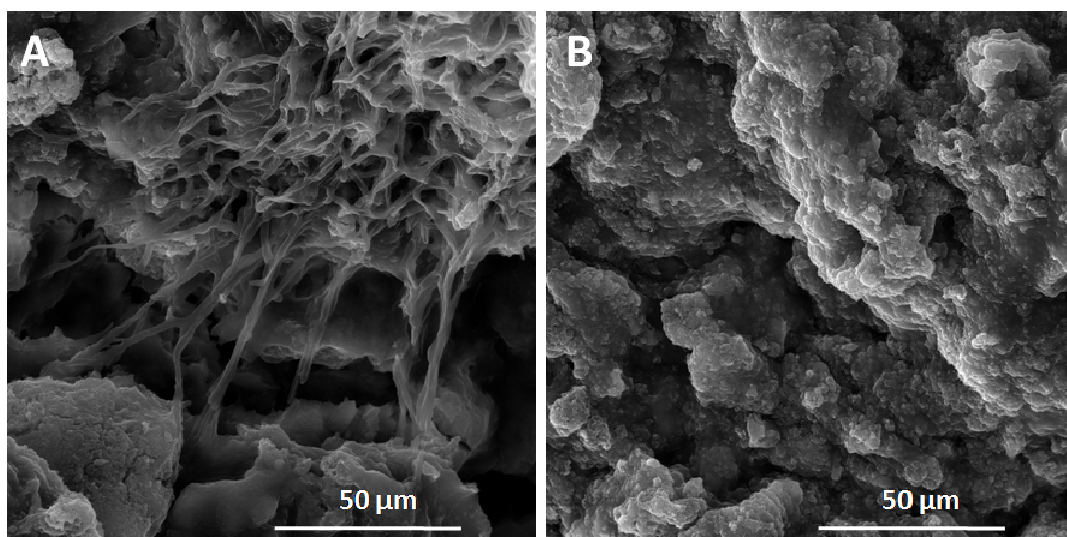


Figura III.10. Imagini microscopie SEM pentru compozitele Cs-CP (65,73 % Cs), A-înainte și B-după degradare.

III.2.6. Analiza mecanică

Influența cantității de biopolimer și a raportului Ca/P este reprezentată în figura III.12. Se poate observa o ușoară modificare a modulului de elasticitate cu creșterea conținutului de Cs pentru compozitele cu un raport Ca/P=1,64 și o creștere a modulului lui Young cu creșterea conținutului de Cs, pentru compozitele cu un raport Ca/P=1,72.

Referitor la influența raportului Ca/P în figura III.11 B, se poate observa că odată cu creșterea cantității de CP crește și modulul de elasticitate la compresiune; la un conținut ridicat de Ca din compozite, matricea polimerică (Cs) este acoperită, astfel realizându-se o creștere a modulului de elasticitate [243].

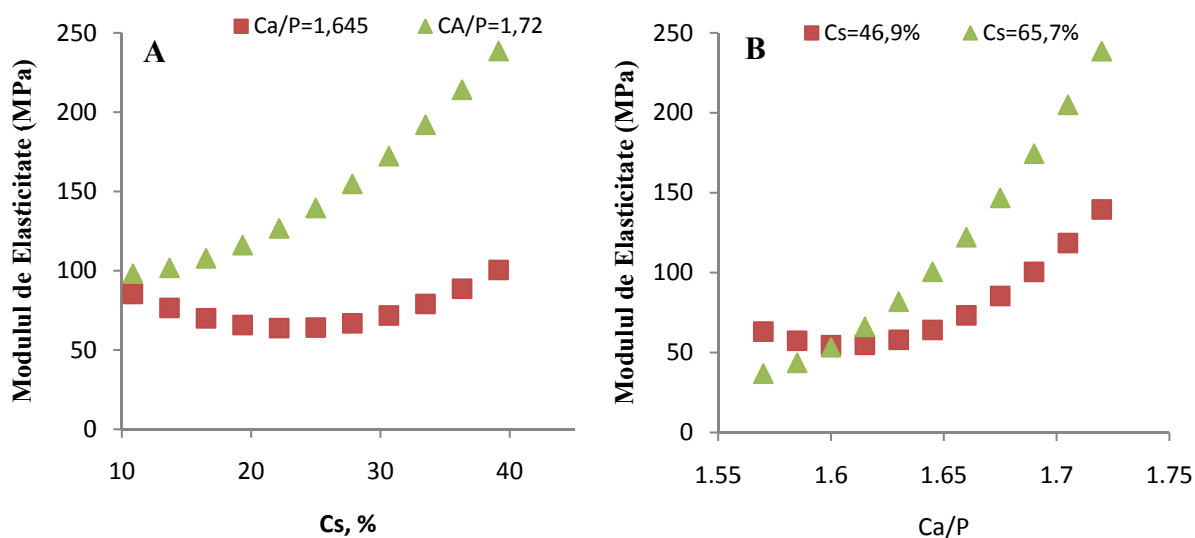


Figura III.12. Influență A-cantității de Cs și B-raportului Ca/P asupra modulului de elasticitate a compozitelor.

Modulul de elasticitate al compozitelor obținute prin metode biomimetice de co-precipitare, are valori cuprinse în intervalul proprietăților mecanice ale țesutului osos natural (tabelul III.9), indicând astfel posibila aplicație a acestor compozite în ingineria reparatorie a țesutului osos.

Tabelul III.9. Modulul de elasticitate la compresiune pentru compozitele Cs-CP în comparație cu modulul țesutului osos spongios.

Compoziție probe (Cs %)	Raport molar Ca/P	Modulul Young-probe (MPa)	Modulul Young-țesut osos (MPa)
19,82	1,52	140,44	40-400
46,95	1,74	62,79	
65,73	1,73	69,41	
46,95	1,69	83,24	
46,95	1,74	62,79	
46,95	1,76	143,42	

III.3. Analiza compozitelor pe bază de chitosan și fosfați de calciu obținute prin procedeul amestecare-liofilizare

După obținerea amestecului Cs-CP și condiționarea acestuia, compozitul a fost congelat la -52 °C, după care a fost supus procesului de liofilizare. Prin procedeul de sublimare s-a îndepărtat fază apoasă din sistem obținând în final compozite cu o porozitate ridicată.

III.3.1. Analiza morfologică a compozitelor Cs-CP liofilizate

Structura morfologică a compozitelor obținute prin liofilizare este prezentată în figura III.14 A și B. Microstructura compozitelor suferă modificări în ceea ce privește porozitatea și dimensiunea porilor. Din imaginile SEM se poate evidenția o porozitate ridicată și pori interconectați.

Porii din structura compozitelor se formează prin sublimarea apei prin intermediul procesului de liofilizare, dimensiunea porilor fiind cuprinsă între 50—200 μm. Datorită hidrofiliei Cs, acesta încorporează o cantitate ridicată de apă, ceea ce duce la obținerea unei porozități ridicate după liofilizarea amestecului Cs-CP.

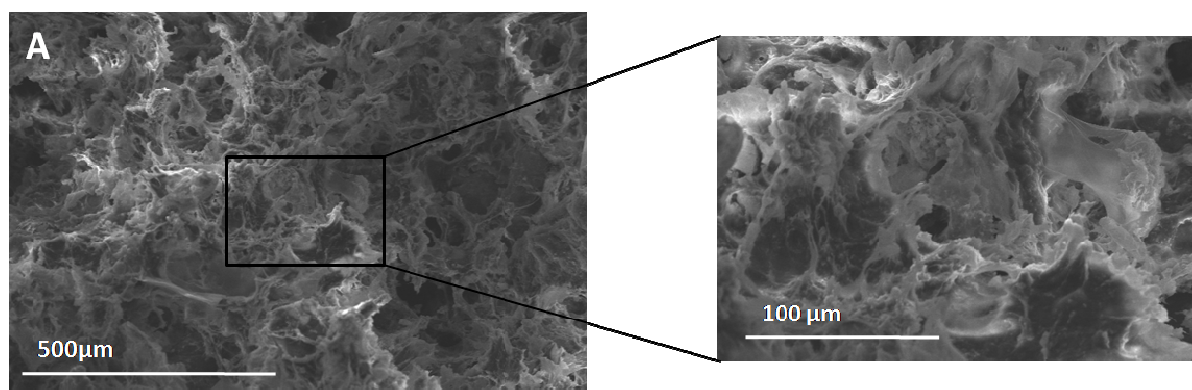


Figura III.14. Morfologia compozitelor Cs-CP liofilizate cu: A— Cs-25 % .

III.3.2. Analiza fazei anorganice din compozitelor Cs-CP liofilizate

Pentru identificarea diferitelor forme de fosfați de calciu din faza anorganică s-a utilizat difracția de raze X și atribuirea picurilor utilizând standardele JCPDS (tabelul III.10).

S-a comparat difractograma corespunzătoare CP cu cele obținute pentru compozitele liofilizate cu 89,14 % , 75 % și respectiv 60,86 % CP (figura III.15).

Din datele obținute se poate evidenția prezența diferitelor forme de CP în structura compozitelor, faza predominantă fiind reprezentată de Hap (002 și 112) [256].

Tabelul III.10. Diferite forme de CP prezente în compozitele Cs-CP liofilizate conform JCPDS.

Unghi 2θ	Intensitate	Număr index *	Formula chimică
23	121	09-0347	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
26	002	44-0778	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$
28	210	44-0810	$\text{Ca}_3\text{H}_2(\text{P}_2\text{O}_7)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
31	112	72-1243	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$
49	213	72-1243	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$
53	004	02-1350	CaHPO_4

* conform J.P.C.D.S.

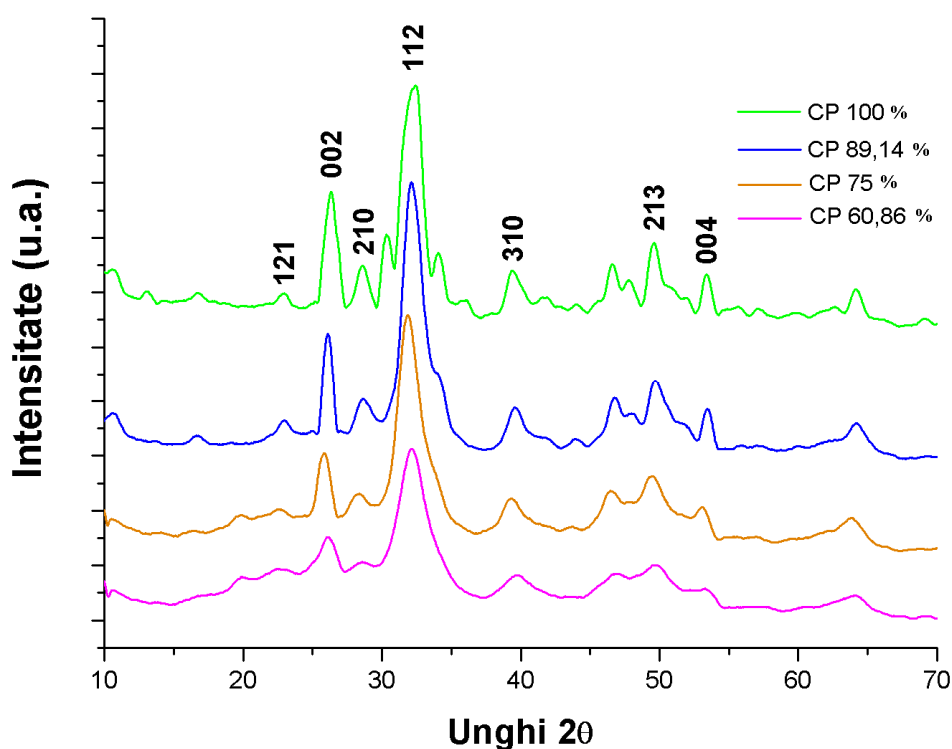


Figura III.15. Spectru XRD pentru compozitele Cs-CP obținute prin procedeul de amestecare-liofilizare.

III.3.3. Analiza mecanică a compozitelor Cs-CP liofilizate

Valorile obținute pentru modulul de elasticitate la compresiune, pentru compozitele liofilizate Cs-CP, sunt reprezentate în figura III.16. Rezultatele obținute indică valori cuprinse între 10 MPa și 36 MPa, valori apropiate de limita inferioară a modulului de elasticitate a țesutului spongios [256]; aceste valori sunt în mare parte determinate de porozitatea ridicată a compozitelor obținute prin procedeul de liofilizare.

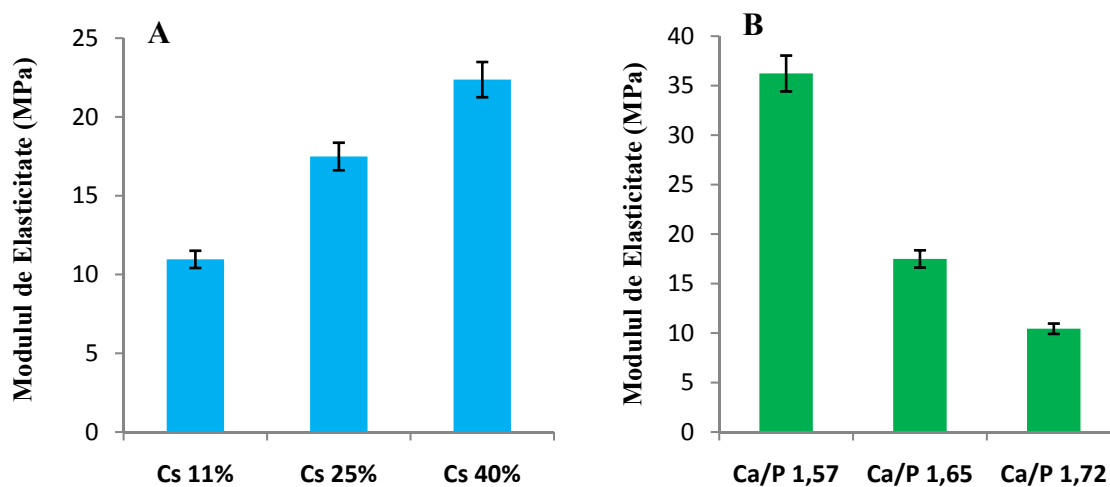


Figura III.16. Modulul de elasticitate la compresiune pentru compozitele cu: A-aceleși raport Ca/P (1,65) și conținut diferit de fază organică, B-aceeași cantitate de Cs (25 %) și raport diferit Ca/P.

Porozitatea acestor compozite ar putea avea o influență semnificativă asupra proliferării celulare în cazul culturilor celulare *in vitro* [257].

III.4. Concluzii

1. S-au sintetizat compozite pe bază de Cs și CP prin procedee biomimetice în scopul utilizării lor în ingineria regenerativă a țesutului osos, utilizând metode de procesare a compozitului prin amestecare—uscare și amestecare—lioofilizare. Compozitele obținute au fost caracterizate prin: FT-IR, analiză elementală, XRD, EDX, retenția de soluțiilor de interes biologic, studii de degradare *in vitro*, SEM, determinarea modului de elasticitate la compresiune.

2. Datele XRD evidențiază formarea diferitelor forme de CP din precursorii săi (CaCl_2 și NaH_2PO_4) și Hap, atât pentru compozitele obținute prin procedeul amestecare-uscăre cât și pentru cele obținute prin procedeul amestecare-líoofilizare. Determinarea raportului molar Ca/P prin analizele EDX confirmă prezența diferitelor forme de CP cu valori ale raportului Ca/P cuprins între 1,52—1,76. În cazul compozitelor obținute prin amestecare—uscăre dimensiunea cristalelor și cristalinitatea CP este similară apatitelor biologice.

3. Prin analiza comportamentul compozitelor în soluții de interes biologic s-a constatat că o creștere a conținutului de Cs în amestec determină creșterea capacității de absorbție a soluțiilor de interes biologic. Proprietatea compozitelor pe bază de Cs-CP, de a reține soluția de PBS sau PBS-albumină este atribuită atât hidrofiliei acestora, interacțiunilor grupărilor polare cât și structurii tridimensionale și porozității.

4. Din studiile de degradare enzimatică și din microscopia SEM se poate observa o degradare parțială a compozitelor Cs-CP care este probabil cauzată de cristalinitatea probelor și masa molară ridicată a Cs. Fibra de Cs este strânsă conectată cu cristalele de CP, ceea ce împiedică pătrunderea în profunzime a enzimei, rezultând astfel o acțiune lentă a acesteia asupra matricei polimerice și facilitând controlul degradării *in vitro* al materialelor obținute.

5. Analiza proprietăților mecanice a evidențiat valori ale modului de elasticitate la compresiune asemănătoare cu cele ale țesutului osos spongios (în special pentru compozitele obținute prin procedeul amestecare—uscăre), indicând astfel potențialul de utilizare în ingineria regenerativă a țesutului osos.

IV. Compozite pe bază de chitosan-acid hialuronic și fosfați de calciu

Hya este un GAG ce se regăsește cu preponderență în majoritatea componentelor ECM, având proprietăți hidrofile ridicate, implicații în procesul de formare a calusului de la nivelul fracturilor țesutului osos și se regăsește la nivelul citoplasmei celulelor osteoprogenitoare. În plus Hya este recunoscut de receptorii diferitelor tipuri de celule, reglând activitatea celulară, este implicat în angiogeneză și în procesul de vindecare și se comportă ca un strat protectiv în jurul membranei celulare [258]. Astfel utilizând aceleași condiții biomimetice, prezentate anterior în cap. III, se va urmări influența Hya și a raportului molar Ca/P asupra compozitelor Cs-Hya-CP și caracteristicile acestora, materialele fiind obținute prin două procedee distincte: amestecare—uscare și amestecare—liefilizare.

IV.1. Obținerea compozitelor pe bază de chitosan-acid hialuronic și fosfați de calciu

Pentru obținerea de compozite pe bază de Cs-Hya-CP s-a utilizat o concentrație de Hya de 10%, raportat la cantitatea totală de biopolimer introdusă în sinteză (tabelul IV.1 și tabelul IV.2). Alegerea Hya este în primul rând bazată pe abundența în țesuturile moi, afinitatea chimică ridicată pentru CP și capacitatea de a influența creșterea anizotropică a CP [259].

Hya prezintă o valoare a pKa-ului cuprinsă între 2,5—3,0 [260], iar cel al Cs are o valoare de ~ 6,3 iar prin precipitarea soluției de Cs, Hya și precursorii CP (CaCl_2 și NaH_2PO_4) în prezență de NH_4OH , Hya va precipita primul fără a cuprinde în timpul acestui proces nucleu apatitice, ce sunt răspunzătoare de formarea ulterioară de CP.

Tabelul IV.2. Valorile teoretice din programul experimental împreună cu valorile determinate pentru degradare și retenție pentru compozitele Cs-Hya-CP.

Nr.exp	X ₁ Cs-Hya			X ₂ Ca/P		Y ₁ , Cs degradat (mmol/mL)	Y ₂ , Retenție (%)
	Codat	Cs %	Hya %	Codat	Ca/P		
1	-1,414	9,77	1,08	0	1,65	51,57	153,15
2	1,414	35,29	3,91	0	1,65	52,13	236,24
3	0	22,5	2,5	-1,414	1,579	52,92	187,5
4	0	22,5	2,5	1,414	1,721	51,96	240,74
5	0	22,5	2,5	0	1,65	52,13	224,24

Experimentele s-au desfășurat utilizând un program experimental de ordinul II.

Hya precipitat va fi cuprins de lanțurile de Cs ce vor precipita la un $pK_a \sim 6,3$ valoare la care procesul de nucleație al nucleelor apatitice este în plină desfășurare. Datorită procesului de omogenizare ce are loc pe tot parcursul procesului de co-precipitare a fazei organice și a celei anorganice, Hya este distribuit în toată masa compozitului, având astfel proprietăți de stimulare a celulelor endoteliale vasculare [261], migrării celulare [262], sintezei de collagen [263] și angiogenezei [264].

IV.2.2. Analiza probelor prin XRD și EDX

Figura IV.2 prezintă difractogramele pentru CP și pentru compozitele cu diferite cantități de CP: 100% respectiv 89 % și 60 %. Diferitele forme de CP au fost evidențiate utilizând standardele JCPDS (tabelul IV.4)

Se poate observa că faza anorganică este compusă din diferite forme de CP. Raportul molar al fazei minerale dintre calciu și fosfor din compozitele Cs-Hya-CP a fost obținut în urma analizelor EDX efectuate, tabelul IV.6. Datele EDX (figura IV.3) confirmă formarea diferitelor forme de CP în structura compozitelor, conform raportului Ca/P obținut.

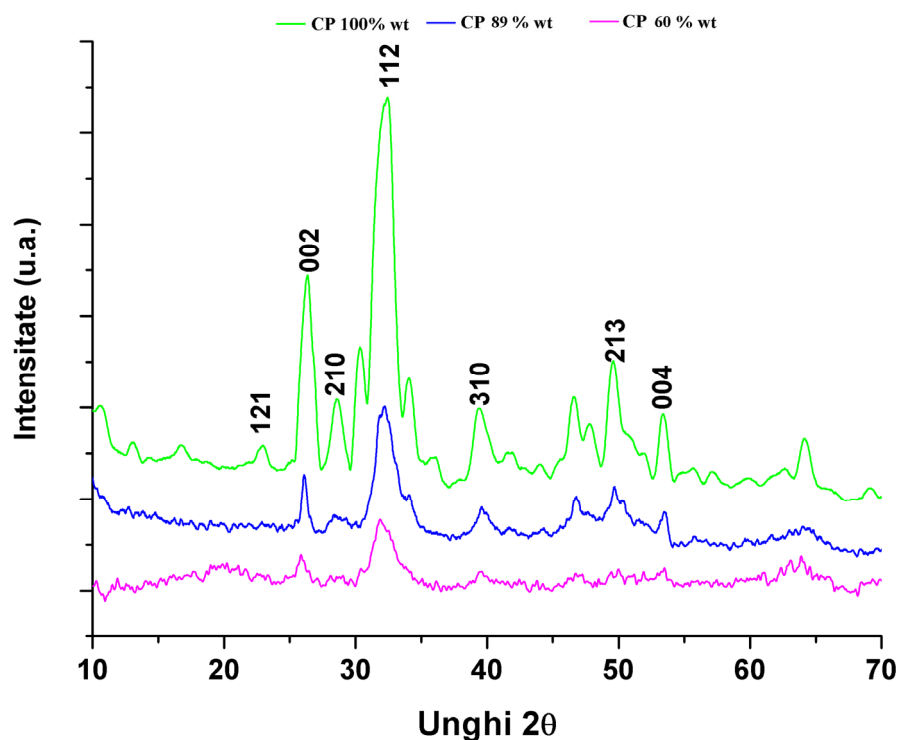


Figura IV.2. Difractogramele XRD pentru CP și compozitele Cs-Hya-CP cu diferite cantități teoretice de CP.

Tabelul IV.4 Diferite forme de CP prezente în compozitele Cs-Hya-CP conform JCPDS.

Unghi 2θ	Intensitate	Număr index*	Formula chimică
23	121	09-0347	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
26	002	44-0778	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$
28	210	44-0810	$\text{Ca}_3\text{H}_2(\text{P}_2\text{O}_7)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$
31	112	72-1243	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$
49	213	72-1243	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot (\text{OH})_2$
53	004	02-1350	CaHPO_4

*conform J.P.C.D.S.

Table IV.6. Raportul Ca/P inițial și final din compozitele Cs-CP.

Probe (Cs+Hya %)	Raportul teoretic Ca/P	Raportul real Ca/P
11	1,65	1,54
25	1,65	1,55
40	1,65	1,38
25	1,57	1,67
25	1,65	1,55
25	1,72	1,46

IV.2.4. Studii de degradare *in vitro* și morfologia compozitelor

Degradarea compozitelor Cs-Hya-CP a fost efectuată pe o perioadă de 14 zile în soluții PBS conținând lizozim, figura IV.5.

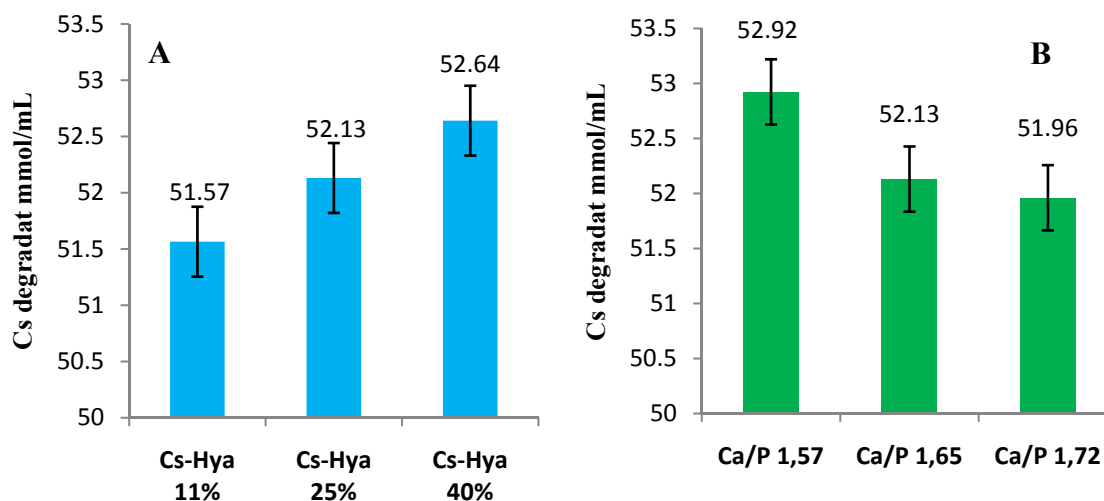


Figura IV.5. Gradul de degradare pentru compozitele cu: A- același raport Ca/P (1,65), B-aceeași cantitate de biopolimer (25 %).

Datorită naturii hidrofile a Cs și Hya, difuzia soluției de PBS, la nivelul compozitelor pe bază de Cs-Hya-CP, este mai rapidă decât degradarea acestora prin urmare compozitele încep să se umfle înainte să se degradeze.

Pentru studiile în care s-a urmărit degradarea enzimatică a compozitelor Cs-Hya-CP, menținându-se un raport constant de fază organică (25 %) și modificând raportul Ca/P, se poate observa că viteza de degradare a matricei polimerice este invers proporțională cu creșterea conținutului de Ca din compoziția finală a materialelor. Se consideră că fenomenul este datorat acoperirii cu fază anorganică a lanțurilor polimerice de Cs și Hya, nepermițând enzimei să pătrundă în întreaga masă a compozitului pentru a-l degrada.

În figura IV.6 este prezentată morfologia SEM a compozitelor Cs-Hya-CP cu 89 % respectiv 60 % CP. Se poate observa că faza anorganică (CP) (figura IV.6 A) este predominantă iar formarea cristalelor de CP acoperă lanțurile polimerice, pe când în figura IV.6 B se evidențiază matricea polimerică iar cantitatea de CP este mult mai redusă.

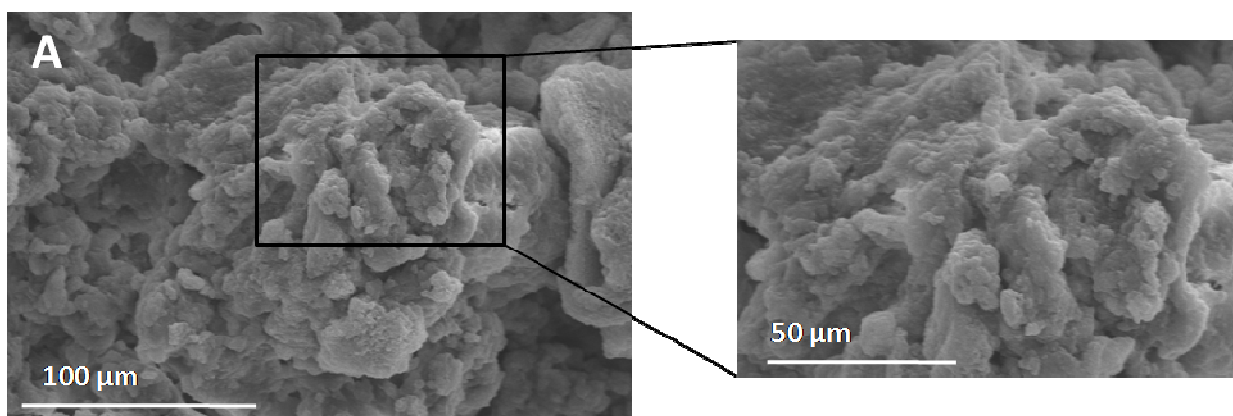


Figura IV.6. Morfologia compozitelor Cs-Hya-CP, A- 89 % CP.

IV.2.5. Analiza mecanică

Analiza mecanică (modulul de elasticitate) a compozitelor este un factor important ce trebuie luat în considerare în cazul aplicațiilor clinice. De regulă materiale de substituție trebuie să prezinte un modul de elasticitate mai mic decât modulul de elasticitate a țesutului înconjurător, pentru a nu permite distribuția forțelor direct pe materialul implantat având ca rezultat fracturi la nivelul acestuia.

Valorile modulului de elasticitate pentru compozitele Cs-Hya-CP, sunt prezentate în figura IV.7. Se observă că, pentru materialele în care se modifică cantitatea de Cs, modulul de elasticitate cel mai ridicat îl au probele cu 25% Cs. În ceea ce privește modificarea raportului Ca/P, se observă că materialele cu un raport Ca/P-1,65 au un modul de elasticitate mai ridicat decât restul compozitelor.

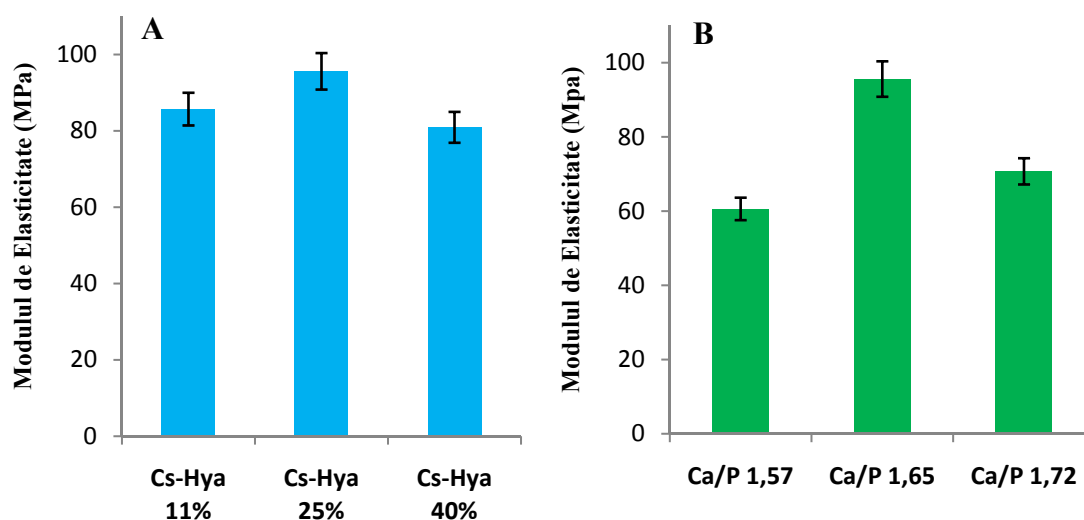


Figura IV.7. Modulul de elasticitate pentru compozitele cu: A- același raport Ca/P (1,65), B- aceeași cantitate de biopolimer (25 %).

Valorile modulului de elasticitate este cuprins între 60—90 MPa, fiind mai mici decât cele ale compozitelor Cs-CP, indicând un bun comportament ca substitut al țesutului osos cu potențiale aplicații în reconstrucția defectelor osoase.

IV.3. Analiza compozitelor obținute prin procedeul amestecare-liofilizare

IV.3.2. Analiza mecanică a compozitelor Cs-Hya-CP liofilizate

Analiza mecanică la care au fost supuse compozitele pe bază de Cs-Hya-CP, pentru obținerea modulului de elasticitate la compresiune, au evidențiat valori cuprinse între 16 MPa și 24 MPa (figura IV.9). Aceste valori sunt datorate în mare parte porozității rezultate în urma procesului de sublimare al apei prin procedeul de liofilizare.

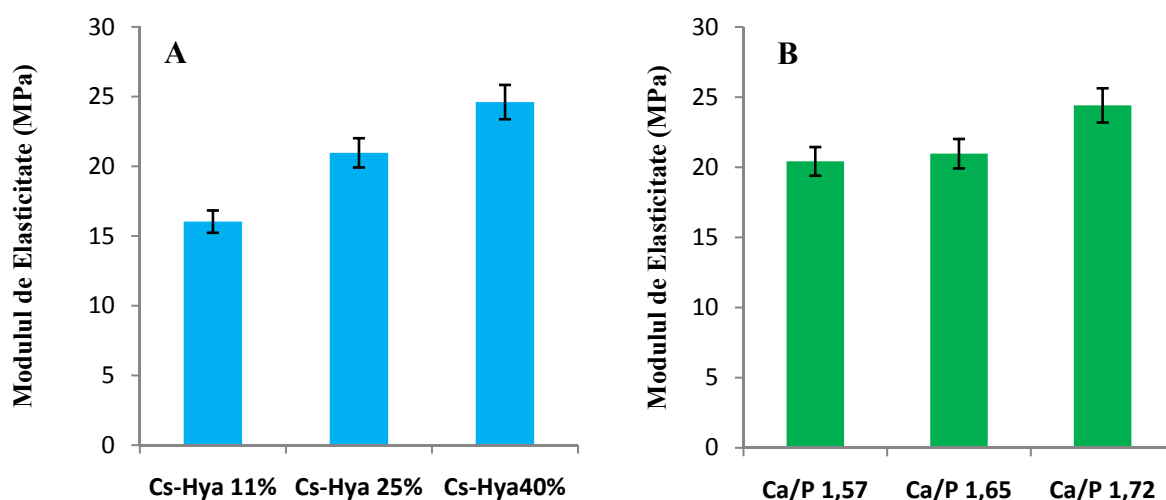


Figura IV.9. Modulul de elasticitate la compresiune pentru compozitele cu: A-aceiași raport Ca/P (1,65), B-aceiași cantitate de Cs-Hya (25 %).

IV.4. Concluzii

1. S-au obținut compozite pe bază de Cs-Hya-CP prin metode biomimetice de coprecipitare și stabilizarea formei prin procedee amestecare—uscare și amestecare—liofilizare. Compozitele astfel obținute au fost caracterizate din punct de vedere structural, compositional, morfologic, evaluarea caracteristicilor de interacțiune cu soluții de interes biologic, gradul de degradare *in vitro*, proprietăți mecanice. Alegerea Hya a fost bazată în primul rând de faptul că este un GAG cu o structură asemănătoare Cs și a proprietăților sale de stimulare a creșterii celulelor endoteliale vasculare și angiogenezei.

2. Interacțiunea Hya cu Cs și CP este în mare parte datorat interacțiunilor electrostatice dintre grupările $-NH_3^+$ ale Cs-ului și grupările $-COO^-$ ale Hya, precum și interacțiunile specifice dintre grupările COO^- ale Hya cu ionii de PO_4^{3-} și Ca^{2+} ai CP.

3. Gradul de retenție a soluțiilor apoase în compozitele Cs-Hya-CP este dependentă de compoziția finală a materialelor, adăugarea de Hya în sistem ducând la o creștere a hidrofiliei compozitului, iar retenția compozitelor crește odată cu creșterea cantității de biopolimeri și Ca din compoziție. Influența Hya asupra compozitelor Cs-CP are ca rezultat creșterea gradului de retenție.

4. Din datele XRD obținute pentru compozitelor Cs-Hya-CP se evidențiază prezența diferitelor forme de CP fapt confirmat și de rezultatele din analizele EDX prin care s-a determinat raportul molar Ca/P cu valori cuprinse între 1,54 – 1,67. În cazul compozitelor obținute prin procedeul amestecare—uscare cu 89 % CP, cristalinitatea este asemănătoare cu cea din apatitele biologice.

5. Proprietățile mecanice rezultate au valori mai mici decât cele ale compozitelor pe bază de Cs-CP, dar se încadrează în intervalului 40 MPa — 400 MPa corespunzător țesutului osos spongios natural. Pentru materialele obținute prin procedeul amestecare-liofilizare acestea au valori scăzute, datorat procesului de obținere utilizat.

V. Compozite pe bază de chitosan-chondroitin sulfat și fosfați de calciu

ChS este un component important al ECM, având un rol important în menținerea funcției celulare, regăsindu-se la nivelul diferitelor componente ale țesutului osos. Grupările funcționale precum SO_4^{2-} și COO^- îi conferă o polaritate negativă și de asemenea aceste grupări sunt implicate în interacțiunea cu mineralele din țesutul osos și alte componente ale ECM. ChS este implicat în procese biologice precum adeziunea și proliferarea celulară, are efect antiinflamator și prezintă capacitatea de a îmbunătăți regenerarea țesutului osos vătămat.

În consecință ChS a fost ales cu scopul de a urmări influența sa asupra compozitelor Cs-CP alături de studiul influenței raportului Ca/P asupra proprietăților finale. Metoda biomimetică utilizată (pH-7,2 temperatură 37°C) și procedeele de obținere, amestecare—uscare și amestecare—liofilizare, au fost folosite în scopul de a putea urmări efectele ChS asupra caracteristicilor finale ale compozitelor Cs-ChS-CP.

V.1. Obținerea compozitelor pe bază de chitosan-chondroitin sulfat și fosfați de calciu

ChS face parte din categoria GAG ce se regăsește la nivelul cartilajului precum și în țesutul osos spongios și cortical [269]. ChS are capacitatea specifică de a se lega de componentele ECM, de a media legătura dintre celulele țesutului osos (Ob și Oc) cu ECM și de a lega moleculele solubile, precum factorii de creștere [270]. De asemenea, poate interacționa cu ioni de Ca^{2+} fiind un punct de plecare pentru procesul de mineralizare [270]. Prin urmare adăugarea ChS la compozitele pe bază de Cs-CP cu aplicații pentru substituția osoasă, are ca scop creșterea proprietăților osteoconductive.

ChS este omniprezent în structura ECM a țesutului osos și în cartilaj [269, 271]. Una din monozaharidele din structura ChS este N-acetil-galactozamina ce conține o grupare sulfat iar cealaltă monozaharidă este reprezentată de acidul glucuronic ce conține gruparea carboxil. Combinația dintre aceste două monozaharide oferă ChS o densitate mare a grupărilor negative, permițând formarea zonelor de nucleație prin interacțiunea cu faza anorganică, mai precis cu ioni de Ca^{2+} din structura CP [271].

Pentru obținerea de compozite pe bază de Cs-ChS-CP s-a utilizat o concentrație de ChS de 10%, raportat la cantitatea totală de biopolimeri utilizată în sinteză.

Experiențele s-au desfășurat după un program central de ordinul II. Codificarea variabilelor este dată în tabelul V.2.

Tabelul V.2. Valorile teoretice din programul experimental împreună cu valorile determinate pentru degradare și retenție pentru compozitele Cs-ChS-CP.

Nr.exp	X ₁ Cs-ChS			X ₂ Ca/P		Y ₁ , Cs degradat (mmol/mL)	Y ₂ , Retenție (%)
	Codat	Cs %		Codat	Ca/P		
1	-1,414	9,77	1,08	0	1,65	51,23	137,28
2	1,414	35,29	3,91	0	1,65	52,87	188,67
3	0	22,5	2,5	-1.414	1,579	52,47	105,88
4	0	22,5	2,5	1.414	1,721	51,57	157,89
5	0	22,5	2,5	0	1,65	51,68	139,53

V.2. Analiza compozitelor obținute prin procedeul amestecare–uscare

V.2.2. Analiza probelor prin XRD și EDX

Figura V.2 prezintă difractogramele pentru CP și pentru compozitele cu diferite rapoarte de CP 100 % respectiv 89 % și 60 %. Diferitele forme de CP au fost stabilite utilizând standardele JCPDS (tabelul V.3)

Tabelul V.3. Diferite forme de CP prezente în compozitele Cs-Hya-CP conform JCPDS.

Unghi 2θ	Intensitate	Număr index*	Formula chimică
23	121	09-0347	Ca(H ₂ PO ₄) ₂ • H ₂ O
26	002	44-0778	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ • (OH) ₂
28	210	44-0810	Ca ₃ H ₂ (P ₂ O ₇) ₂ • H ₂ O
31	112	72-1243	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ • (OH) ₂
49	213	72-1243	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ • (OH) ₂
53	004	02-1350	CaHPO ₄

*conform J.P.C.D.S.

Raportul molar dintre calciu și fosfor al fazei minerale din compozitele Cs-Hya-CP a fost obținut din urma analizelor EDX efectuate, tabelul V.5. Datele EDX (figura V.3) confirmă existența diferitelor forme de CP în structura compozitelor, conform raportului Ca/P obținut.

Table V.5. Raportul Ca/P inițial și final din compozitele Cs-CP.

Probe (Cs+ChS %)	Raportul teoretic Ca/P	Raportul real Ca/P
11	1,65	1,63
25	1,65	1,75
40	1,65	1,60
25	1,57	1,62
25	1,65	1,75
25	1,72	1,35

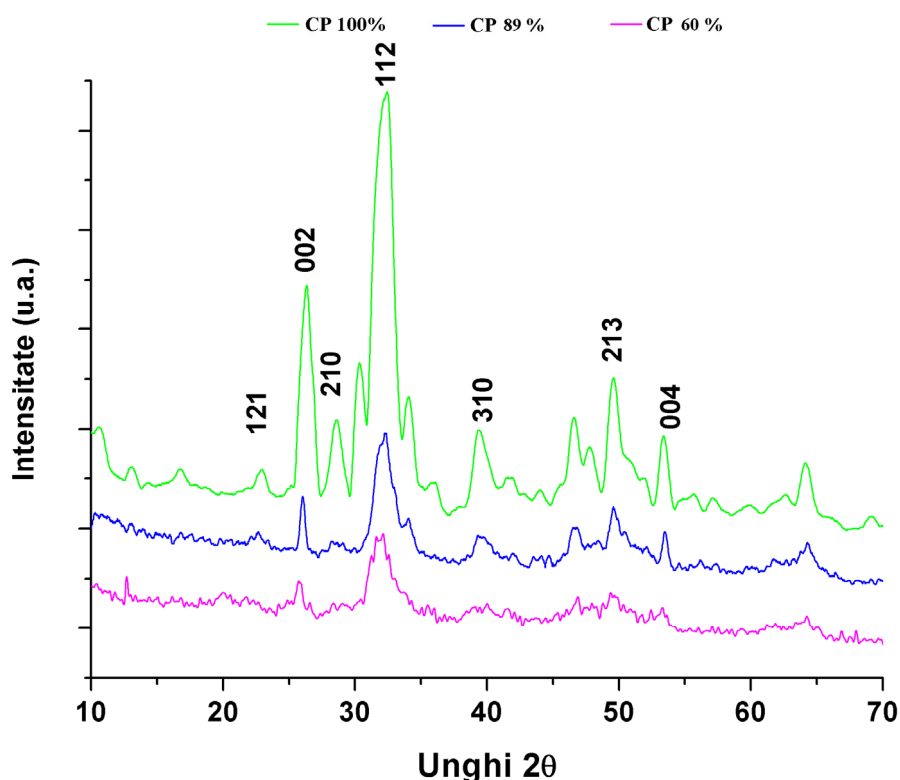


Figura V.2. Difractogramele XRD pentru Cp și compozitele Cs-ChS-CP.

V.2.4. Studii de degradare *in vitro* și morfologia compozitelor

Degradarea compozitelor Cs-ChS-CP a fost efectuată pe o perioadă de 14 zile în soluții PBS conținând lizozim, rezultatele fiind prezentate în figura V.5.

Datorită naturii hidrofile a Cs și ChS, difuzia soluției de PBS la nivelul compozitelor pe bază de Cs-ChS-CP este mai rapidă decât degradarea acestora; prin urmare compozitele încep să se umfle înainte să se degradeze.

Se poate observa că pentru studiile de degradare enzimatică, în care s-a urmărit efectul raportului de Cs, menținând același raport Ca/P (1,65) și ChS constant, asupra compozitelor Cs-

ChS-CP se evidențiază că viteză de degradare a matricei polimerice (Cs și ChS) crește cu creșterea cantității de fază organică de Cs din compoziția materialului final.

Pentru studiile în care s-a urmărit degradarea enzimatică a compozitelor Cs-ChS-CP, menținându-se un raport constant de Cs (25%) și modificând raportul Ca/P, se poate observa că viteza de degradare a matricei polimerice (Cs și ChS) scade cu creșterea conținutului de Ca din compoziția finală a materialelor deoarece acesta acoperă fibrele de Cs și ChS, nepermițând enzimei să pătrundă în întreaga masă a compozitului pentru a-l degrada.

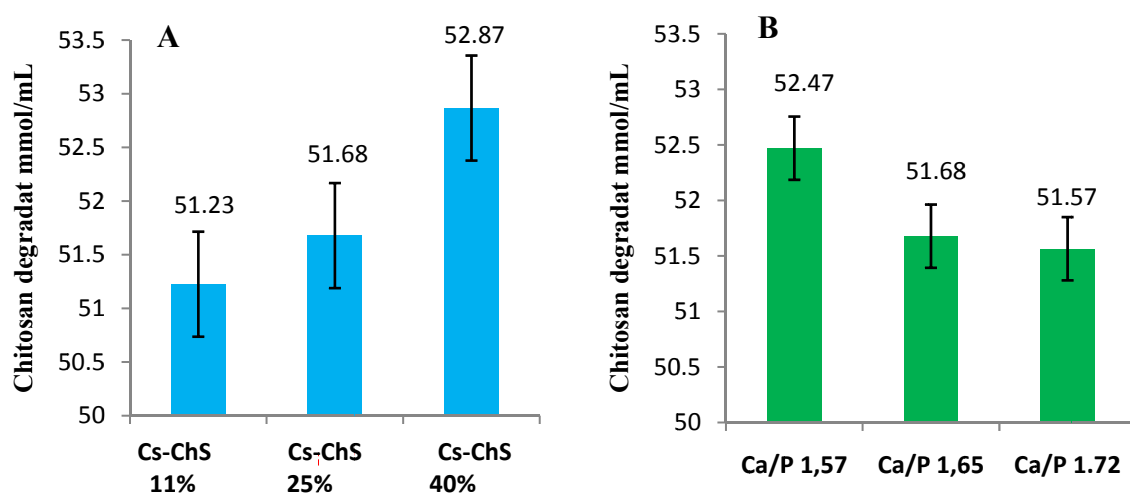
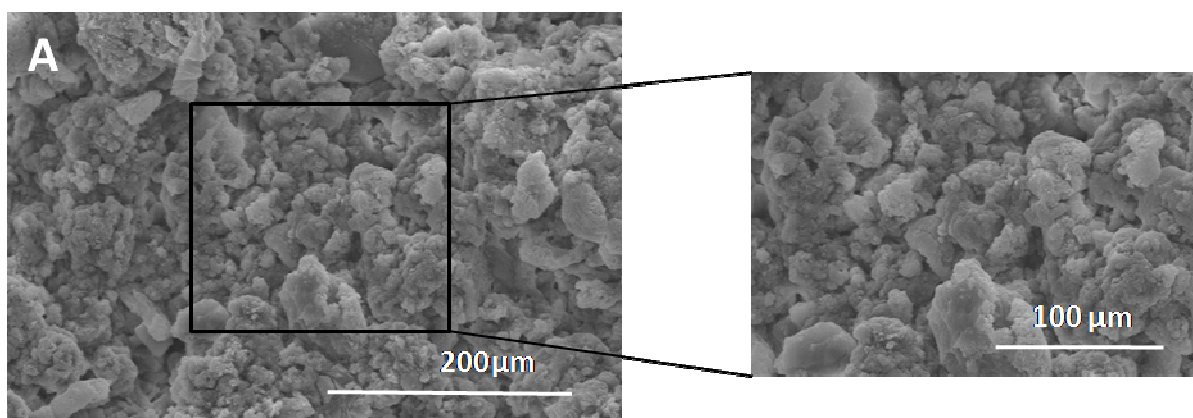


Figura V.5. Gradul de degradare in vitro: A-pentru compozitele cu același raport Ca/P-1,65; B-pentru compozitele cu același conținut de biopolimer - 25 %.

Din datele de microscopie SEM se observă faptul că faza anorganică este prezentă într-o cantitate mai mare decât cea organică (figura V.6 A) pentru compozitele cu CP 89 % respectiv 60 %.



Figur V.6. Morfologia compozitelor Cs-ChS-CP, A- 89 % CP.

V.2.5. Analiza mecanică

Modulele de elasticitate Young pentru compozitele Cs-Hap-ChS, sunt reprezentate în figura V.7. Se observă că, pentru materiale în care se variază cantitatea de Cs, modulul de elasticitate cel mai ridicat îl au compozitele cu 40 % Cs. În ceea ce privește influența raportului Ca/P se observă că materialele cu un raport Ca/P-1,72 au un modul de elasticitate mai ridicat decât celelalte compozite.

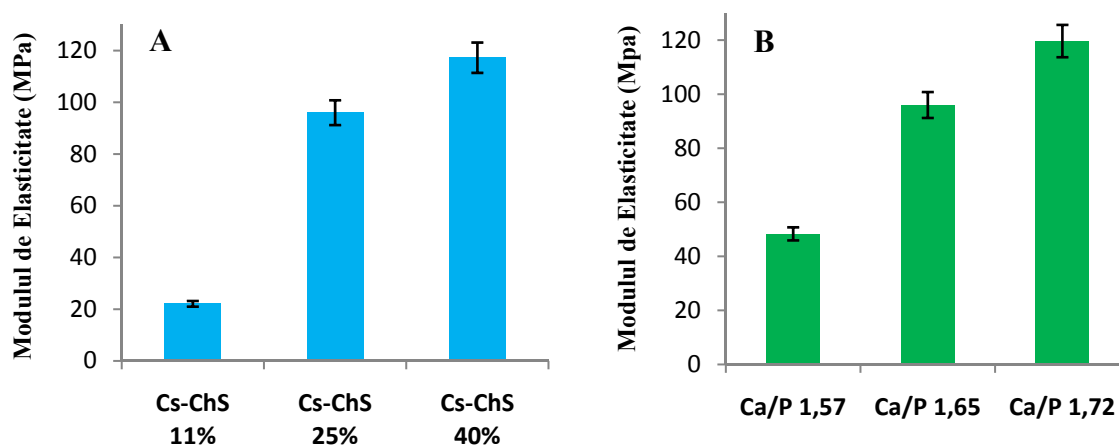


Figura V.7. Modulul de elasticitate:A-pentru compozitele cu același raport Ca/P-1,65;B-pentru compozitele cu același raport de biopolimer-25 %.

La fel ca și în sistemul Cs-Hap și Cs-Hap-Hya valorile modulului de elasticitate ale compozitelor pe bază de Cs-ChS-CP obținute prin metode biomimetice au valori apropiate de cele întâlnite în țesutul osos din organismul uman, recomandându-le în reconstrucția defectelor osoase.

V.3. Analiza compozitelor obținute prin procedeul amestecare-liofilizare

V.3.2. Analiza mecanică a compozitelor Cs-CP liofilizate

Determinarea proprietăților mecanice ale compozitelor pe bază de Cs-ChS-CP au fost efectuate pentru evaluarea modulului de elasticitate la compresiune, iar valorile obținute sunt prezentate în figura V.9.

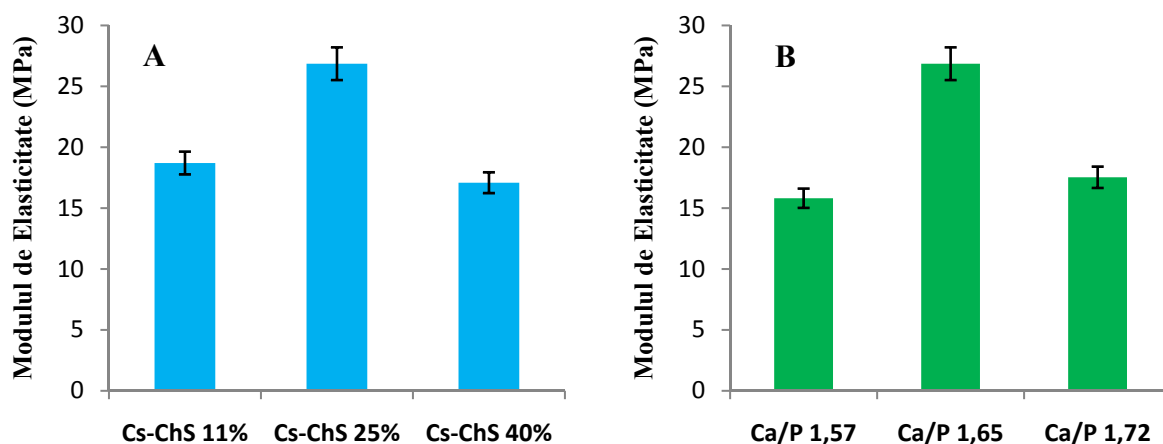


Figura V.9. Modulul de elasticitate la compresiune pentru compozitele cu: A-aceleși raport Ca/P (1,65), B-aceeași cantitate de Cs-ChS (25 %).

Comparativ cu compozitele Cs-ChS-CP obținute prin amestecare—uscare acestea prezintă valori ale modulului de elasticitate mult mai reduse, fapt datorat porozității ridicate obținute după liofilizarea probelor.

V.4. Concluzii

1. Adaosul de ChS în compozitele Cs-CP influențată de proprietățile acestuia, fiind implicat în procesul de mineralizare alături de ioni de Ca^{2+} , poate interacționa cu componentele ECM, iar adăugarea de ChS poate contribui la creșterea proprietăților osteoconductive.

2. Compozitele au fost obținute prin procedee biomimetice de co-precipitare a CP pe fibrele de Cs și ChS via amestecare—uscare și amestecare—liofilizare, urmărind formarea de CP cât mai aproape de procesul ce are loc *in vivo* (temperatură și pH fiziologic).

3. Formelor de CP au fost evidențiate prin XRD și determinarea raportului molar Ca/P s-a efectuat prin EDX. Datele obținute la XRD au fost comparate cu standardele JCPDS, evidențiind astfel formarea diferitelor forme de CP cu rapoarte Ca/P cuprinse între 1,35—1,75. Pentru compozitele cu 89 % CP, obținute prin procedeul de amestecare—uscare dimensiunea critelelor și cristalinitatea este similară cu cea a apatitelor biologice.

4. Datorită caracterului hidrofil al Cs și al ChS, retenția și viteza de degradare sunt dependente de cantitatea de biopolimer precum și de cantitatea de Ca din materiale. Retenția de soluție aposă în compozitele Cs-ChS-CP este asemănătoare cu cea a materialelor pe bază de Cs-CP, dar mai scăzută decât cea a celor pe bază de Cs-Hya-CP.

5. Proprietățile mecanice ale compozitelor Cs-ChS-CP obținute prin metoda amestecare—uscare sunt mai bune comparativ cu compozitele Cs-Hya-CP dar mai reduse decât cele cu Cs-CP. Pentru materialele obținute prin metoda amestecare—liofilizare, modulul de elasticitate la compresiune este similar cu cele ale compozitelor Cs-Hya-CP și mai mici decât cele cu Cs-CP. Toate valorile obținute la testele mecanice sunt similare cu proprietățile țesutului osos spongios.

VI. STUDII *IN VITRO* ASUPRA BIOCOMPATIBILITĂȚII MATERIALELOR

Unul dintre factorii cei mai des importanți care controlează performanța generală a unui produs în ingineria tisulară este biocompatibilitatea. Cea mai importantă caracteristică care distinge un biomaterial de orice alt material este capacitatea sa de a exista în contact cu țesuturile sau componente ale țesuturilor, din corpul uman, fără a provoca nicio reacție adversă.

„Biocompatibilitatea” este o noțiune utilizată pe scară largă în domeniul științei biomaterialelor, dar există încă o mare incertitudine cu privire la ceea ce înseamnă de fapt și despre mecanismele care sunt subsumate în cadrul fenomenelor care constituie colectiv biocompatibilitatea.

Este pe deplin acceptat faptul că materialele biocompatibile trebuie să prezinte proprietăți non-toxice, non-imonogenice, non-trombogenice, non-cancerigenice, non-iritante etc. Cumularea acestor caracteristici într-un material îi evidențiază în mod implicit caracterul de material biocompatibil.

De asemenea, biocompatibilitatea suporturilor tridimensionale pentru ingineria tisulară poate fi definită ca fiind: ”capacitatea unui material de a se comporta ca un substrat, cu proprietăți optime pentru activitatea celulară, cu scopul de a optimiza regenerarea tisulară, fără a provoca nici un răspuns advers din partea țesutului gazdă”.

În vederea evaluării testelor de biocompatibilitate, selecția materialelor a fost strâns legată de compoziția fizico-chimică și proprietățile mecanice ale fiecărui tip de compozit în parte.

Biomaterialele pe care s-au efectuat culturi celulare și ulterior viabilitate/citotoxicitate, determinarea VEGF-ului și morfologia celulară, au fost cele pe bază de Cs-CP. În cadrul studiilor de biocompatibilitate s-au utilizat din programul experimental, probele ce au în componența lor cea mai mare și cea mai mică cantitate de Cs teoretic.

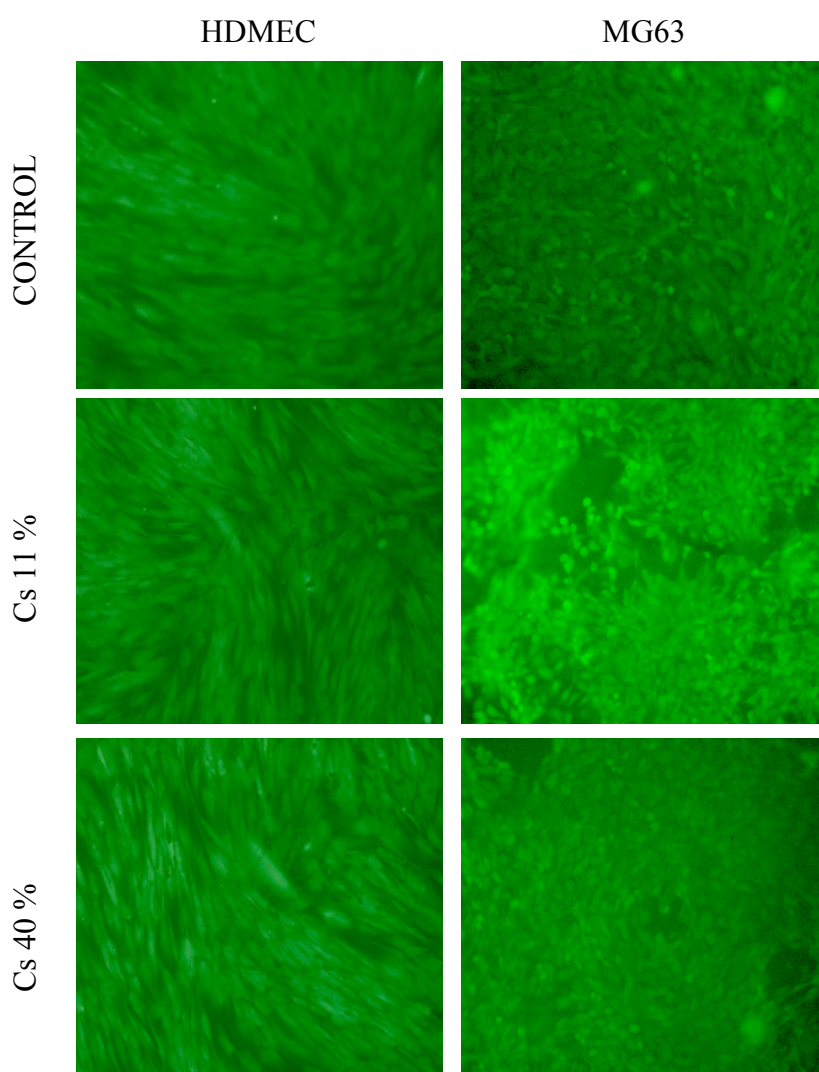
VI.1. Evaluarea citotoxicității celulare directe

Datorită sensibilității ridicate a celulelor utilizate în aceste experimente (MG63, HOS, HDMEC), o evaluare a citotoxicității directe poate furniza date extrem de importante cu privire la eliberarea unor compuși citotoxici, înglobați în structura compozitelor în momentul sintezei sau neîndepărtați, care pot influența negativ atașarea și proliferarea celulară. În cazul în care materialul supus testării eliberează compuși citotoxici, viabilitatea celulară este rapid influențată și se poate observa o scădere a acesteia în primele 24 h din momentul în care celulele au fost puse în contact direct cu materialul.

Pentru evaluarea citotoxicității celulare directe, biomaterialele, care în prealabil au fost sterilizate, au fost puse în contact direct cu osteoblaste de linie MG63 și HDMEC timp de 24 h

după care celulele viabile au fost marcate cu ajutorul unui marker fluorescent (Calcein AM), figura VI.1. Controlul este reprezentat de celule ce au fost cultivate pe godeuri în condiții identice ca și probele studiate.

După cum se poate observa în figura VI.1 viabilitatea, morfologia și structura celulelor (MG63 respectiv HDMEC) este similară cu cea a controlului. S-a constatat că după 24 ore compozitele nu influențează negativ proliferarea și dezvoltarea celulară. Rezultatele astfel obținute evidențiază faptul că materialele utilizate nu sunt citotoxice sau nu eliberează substanțe citotoxice care să influențeze negativ proliferarea celulară, astfel pot fi testate pe culturi celulare *in vitro* pe termen lung.



Figur VI.1. Structura și morfologia celulelor cultivate pe compozitele Cs-CP la 24h (marcare Calcein AM).

VI.2. Studiarea viabilității celulare — teste MTS

Sarea de tetrazoliu (MTS) este redusă de către celulele viabile într-un produs colorat numit formazan, care este solubil în mediul de cultură. Cantitatea de formazan produsă este măsurată spectrofotometric la 492 nm, iar această valoare este direct proporțională cu numărul de celule viabile din culturile de celule.

Rezultatele de la testul MTS pentru toate cele trei tipuri de celule utilizate (MG63, HOS și HDMEC) sunt prezentate în figurile VI.2-VI.4.

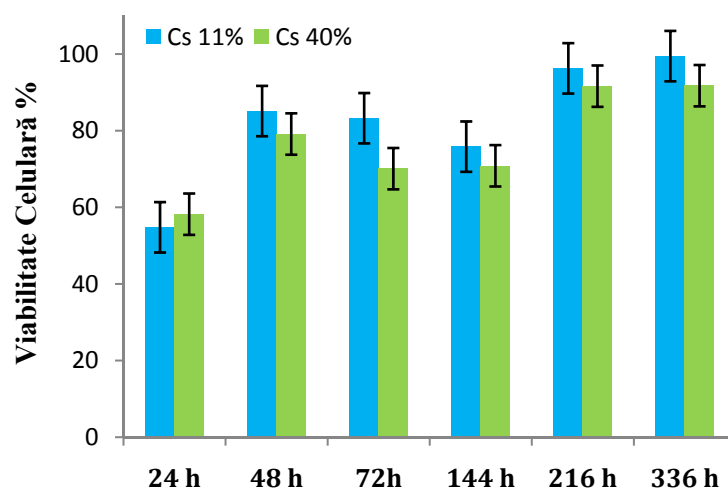


Figura VI.2. Viabilitatea celulară la diferite intervale de timp pentru compozitele Cs-CP în culturi celulare—MG 63. Au fost efectuate trei determinări pentru fiecare compozit, iar valoarea medie a fost luată ca referință $\pm$ s.d.

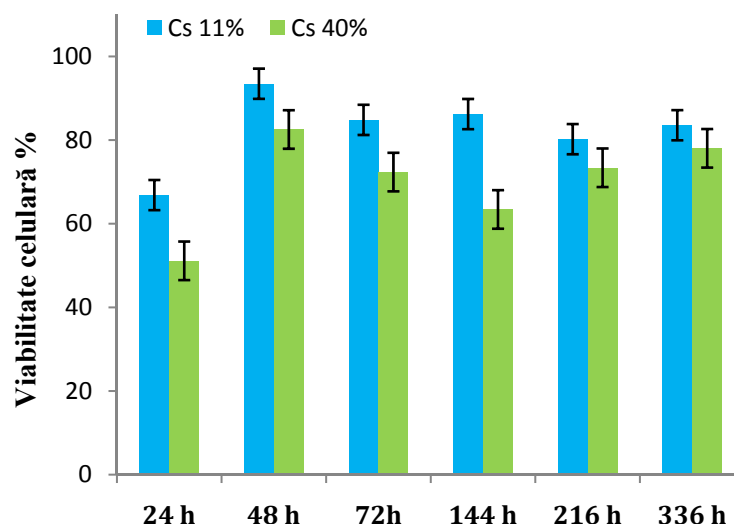


Figura VI.3. Viabilitatea celulară la diferite intervale de timp pentru compozitele Cs-CP în culturi celulare—HOS. Au fost efectuate trei determinări pentru fiecare compozit, iar valoarea medie a fost luată ca referință $\pm$ s.d.

Se poate observa faptul că pentru analizele în care s-au utilizat celule osteoblaste (de linie—MG63 și primare—HOS), viabilitatea celulară este puțin mai ridicată pentru probele ce au în componență o cantitate redusă de Cs (11%), deoarece aceste tipuri de celule sunt direct răspunzătoare de formarea țesutului osos. Acest fapt poate fi datorat conținutului ridicat de CP (89 %), ce este recunoscut de către celulele osteoblaste ca fiind o structură similară cu cea a țesutului osos natural.

Din datele obținute se poate afirma că pentru fiecare tip de celule utilizat, în studiile de viabilitate celulară, rezultatele prezintă aceeași tendință de creștere a viabilității în timp, confirmând astfel posibilitatea utilizării acestor compozite în ingineria tisulară a țesutului osos.

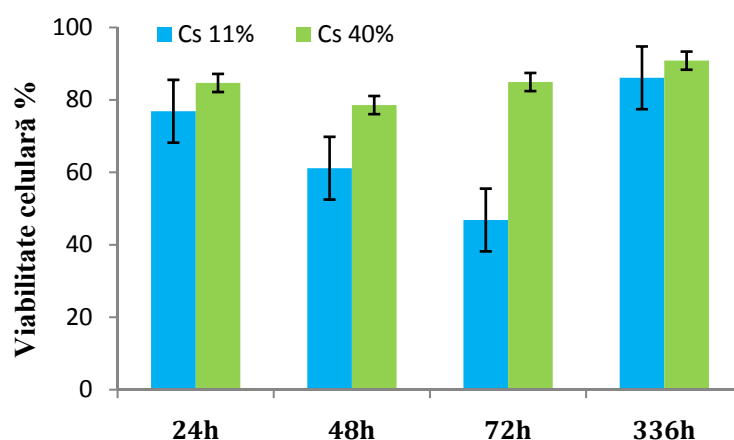


Figura VI4. Viabilitatea celulară la diferite intervale de timp pentru compozitele Cs-CP în culturi celulare—HDMEC. Au fost efectuate trei determinări pentru fiecare compozit, iar valoarea medie a fost luată ca referință $\pm$ s.d.

Rezultatele testelor de viabilitate celulară confirmă că materialele compozite studiate nu sunt citotoxice în comparație cu controlul. Mai mult decât atât, viabilitatea celulară la 336 h după culturile de celule, pentru cele trei tipuri de celule, este mai mare de 80 % ceea ce indică faptul că în timp celulele proliferază pe compozitele utilizate în aceste teste.

VI.3. Evaluarea activității LDH-ului

Această analiză utilizează metoda colorimetrică ce se bazează pe măsurarea cantității de LDH (o enzimă stabilă citosolic) și eliberată în mediul de cultură de către celulele ce prezintă membrana celulară distrusă, rezultând în conversia sării de tetrazoliu în formazan de culoare roșie; intensitatea culorii formate este proporțională cu numărul de celule moarte. Rezultatele obținute pentru densitatea optică la 490 nm, măsură a eliberării LDH la diferite intervale de timp, sunt prezentate în figurile VI.5-VI.7.

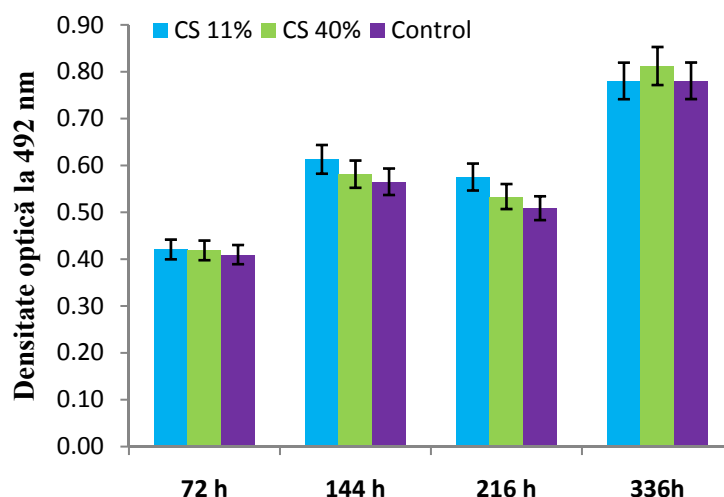


Figura VI.5. Evaluarea eliberării de LDH la diferite intervale de timp pentru compozitele Cs-CP în culturi celulare—MG 63. Au fost efectuate trei determinări pentru fiecare compozit, iar valoarea medie a fost luată ca referință $\pm$ s.d.

După cum se poate observa, valorile de LDH obținute pentru compozitele Cs-CP, la diferite intervale de timp, indiferent de tipul de celule utilizat, sunt ușor mai ridicate în comparație cu controlul. Aceste date evidențiază astfel o citotoxicitate minimă exprimată de celule în culturile celulare pe compozitele Cs-CP, fiind în corelație cu datele obținute anterior la determinarea viabilității celulare prin teste MTS.

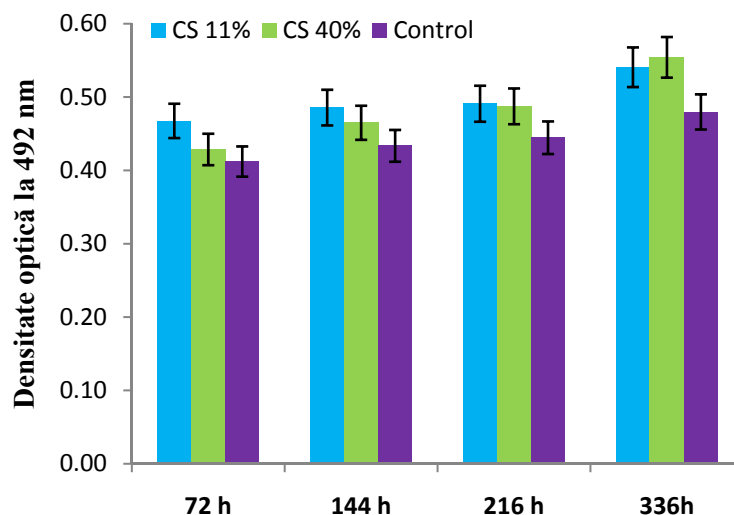


Figura VI.6. Evaluarea eliberării de LDH la diferite intervale de timp pentru compozitele Cs-CP în culturi celulare—HOS. Au fost efectuate trei determinări pentru fiecare compozit, iar valoarea medie a fost luată ca referință $\pm$ s.d.

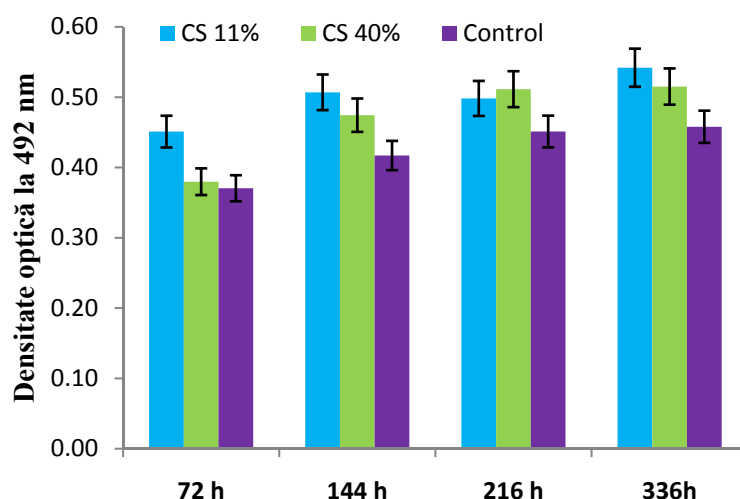


Figura VI.7. Evaluarea eliberării de LDH la diferite intervale de timp pentru compozitele Cs-CP în culturi celulare—HDMEC. Au fost efectuate trei determinări pentru fiecare compozit, iar valoarea medie a fost luată ca referință $\pm$ s.d.

VI.4. Cuantificarea VEGF-ului

Analiza în timp a expresiei de VEGF în mediul de cultură pentru diferite tipuri de celule (MG63, HOS și HDMEC) este prezentată în figura VI.8 și figura VI.9. VEGF este unul dintre factorii de creștere cei mai importanți implicați în procesul de angiogeneză și, de asemenea, este un factor pro-angiogenetic cu acțiuni directe asupra funcțiilor osteoblastelor [276, 277].

Celulele MG63 cultivate pe compozitele Cs-CP prezintă valori similare de VEGF cu controlul (Figura VI.8).

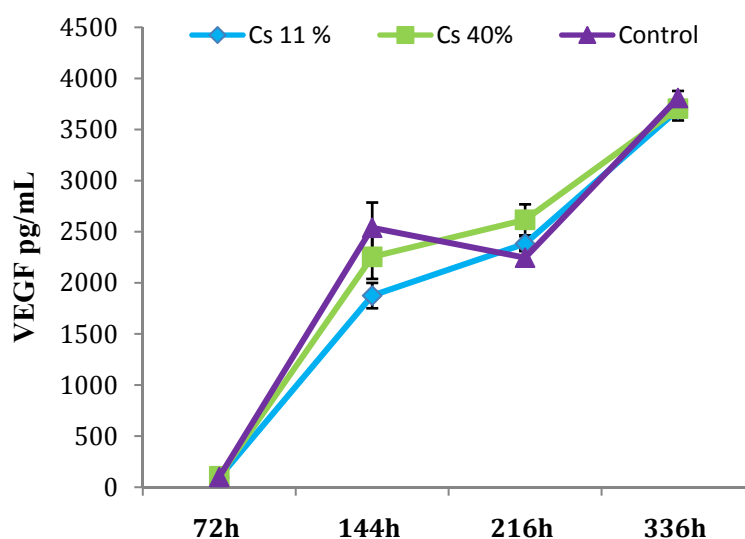


Figura VI.8. Variația de VEGF la diferite intervale de timp pentru compozitele Cs-CP în culturi celulare—MG 63. Au fost efectuate trei determinări pentru fiecare compozit în parte, iar valoarea medie a fost luată ca referință $\pm$ s.d.

Celulele HOS crescute pe același tip de compozite evidențiază valori ale VEGF-ului mult mai ridicate decât cele din control (Figura VI.9). Concentrațiile de VEGF din mediul de cultură a MG63 este de 3-9 ori mai mare decât cele obținute în culturile HOS; în culturile HDMEC nu s-a determinat VEGF.

Datorită faptului că Ob sunt sursa predominantă de VEGF [278], acest fapt explică valorile crescute obținute în culturile cu MG63. Din studiile *in vivo* efectuate [279-281] s-a observat că VEGF este un factor important în monitorizarea biologică și patologică a răspunsului țesuturilor după implantare.

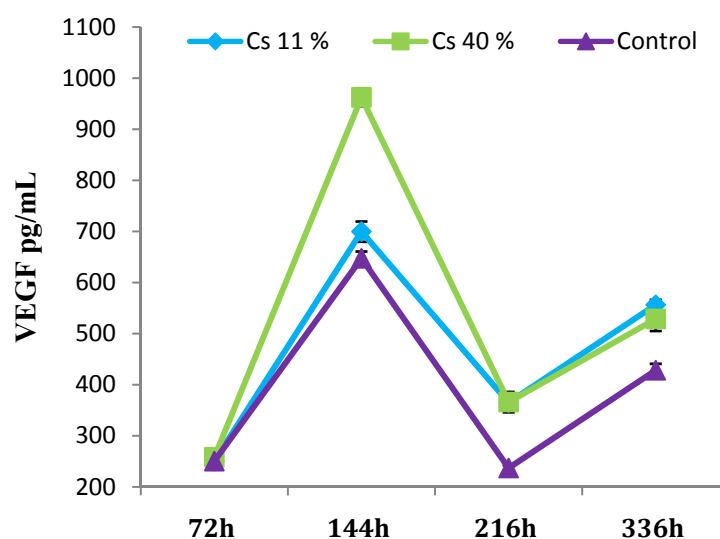


Figura VI.9. Variația de VEGF la diferite intervale de timp pentru compozitele Cs-CP în culturi celulare—HOS. Au fost efectuate trei determinări pentru fiecare compozit, iar valoarea medie a fost luată ca referință $\pm$ s.d.

Creșterea expresiei de VEGF acționează sinergetic *in vivo* cât și *in vitro* [282] sugerând astfel că eventualele teste *in vivo* pentru aceste compozite pe bază de Cs-CP ar putea avea ca rezultat o creștere a vascularizării. De altfel VEGF crește la modificări ale mediului extracelular [283] și este un important factor în remodelarea și diferențierea osteoblastelor [284]. O creșterea a expresiei de VEGF apare înainte de a se realiza o creștere a noului țesut osos format [285].

VI.5. Vizualizarea compozitelor după culturi celulare

Morfologia, viabilitatea și distribuția celulară pentru culturile cu MG63 a fost studiată cu ajutorul microscopiei confocale cu baleiaj laser (figura VI.10).

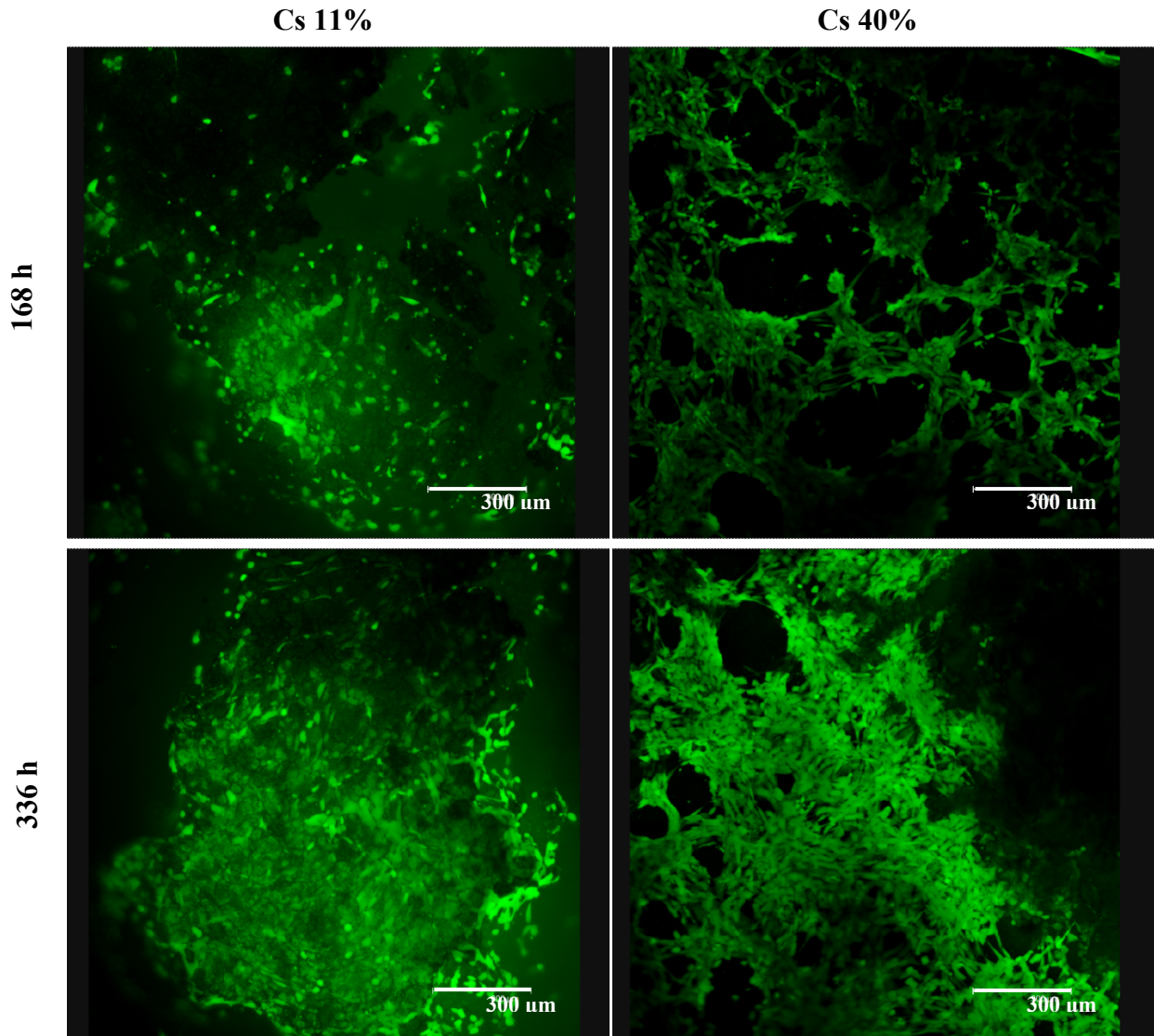


Figura VI.10. Structura celulelor MG63 (microscopie confocală cu baleiaj laser) marcate cu Calcein AM pentru compozitele Cs-CP; imaginile au fost efectuate la 168 h respectiv 336 h după cultivarea celulelor MG63 pe compozite.

Această metodă de evidențiere a structurii și morfologiei celulare este importantă pentru a putea observa dacă celulele proliferate sunt distribuite în întreaga structură a biomaterialelor sau doar în anumite regiuni. După cum este prezentat în figura VI.10, celulele viabile din structura compozitelor Cs-CP au fost evidențiate prin marcarea acestora cu Calcein AM după 168 h, respectiv 336 h de la cultivarea celulară. Se observă că celulele sunt distribuite în toată

structura compozitelor Cs-CP, sunt întinse peste pori și au o morfologie similară cu a celulelor normale.

Același lucru este evidențiat și de marcarea nucleelor celulare. Marcarea nucleelor celulelor MG63 cu DAPI (figura VI.11 A și B), un reactiv care se leagă specific de ADN-ul regiunilor celulare bogate în tiamină, este evidențiată la 336 h de cultură celulară. Nucleele celulelor MG63 sunt marcate în albastru și din datele obținute se poate afirma că celulele cuprind întreaga structură a compozitelor Cs-CP. Rezultatele obținute indică faptul că aceste compozite joacă un rol important în proliferarea și distribuția celulară.

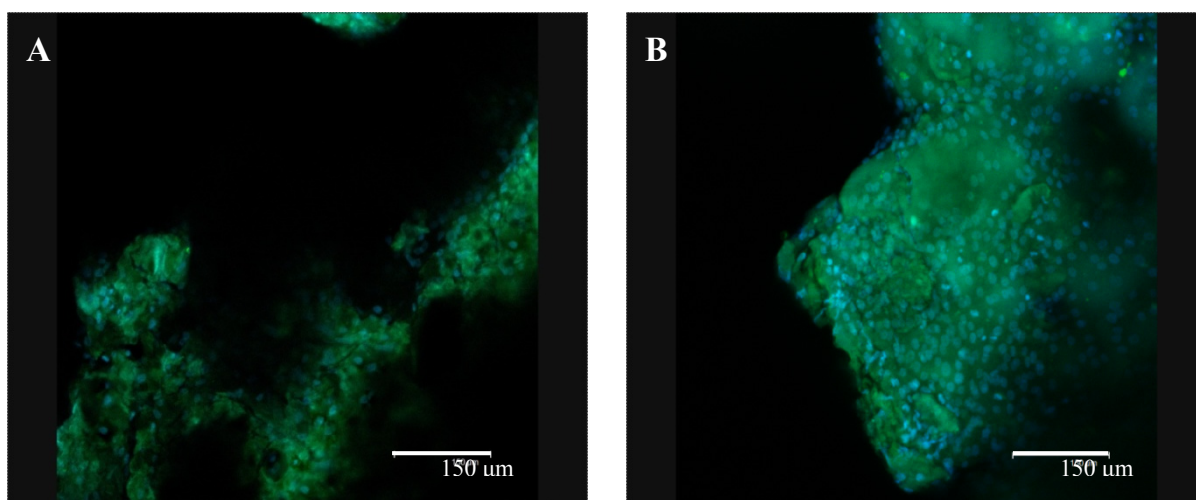


Figura VI.11. Structura nucleelor celulelor MG63 (microscopie confocală cu baleiaj laser) marcate cu DAPI pentru compozitele: A—11% Cs și B—40% Cs; imaginile au fost efectuate la 336 h după cultivarea celulelor MG63 pe compozite.

VI.6. Concluzii

1. Efectuarea unor teste de biocompatibilitate cu diferite tipuri de celule specifice, este necesară pentru materialele ce au ca potențial de aplicabilitate ingineria tisulară. De aceea realizarea unor teste de viabilitate/citotoxicitate celulară precum și a unor teste imunoenzimatică pentru determinarea unor factori de creștere cu rol în procesul de atașare și proliferare celulară este imperios necesară în evaluarea proprietăților materialelor cu aplicații biomedicale.

2. Testele de viabilitate celulară directă nu au evidențiat o scădere a acesteia, după 24 h de la punerea în contact a celulelor cu compozitele studiate, fapt ce demonstrează că materialele nu sunt citotoxice sau nu eliberează substanțe citotoxice care să influențeze morfologia și proliferarea celulară.

3. Rezultatele testelor MTS de viabilitate celulară sunt în corelație cu analizele de evaluare a eliberării LDH-ului de către celule și evidențiază o viabilitate celulară crescută pentru celulele MG63 cât și HOS, respectiv HDMEC, utilizate la intervale de timp de până la 336 h.

4. Din evaluarea expresiei genetice a VEGF-ului se remarcă o tendință de creștere în timp atât pentru culturile celulare de MG63 cât și cu cele de HOS. Această creștere este corelată cu procesul de angiogeneză și în cel de formare de nou țesut osos.

5. Evidențierea structurii celulare și a nucleelor acestora a fost realizată cu ajutorul microscopiei electronice de baleiaj laser, prin marcarea specifică a acestor componente. Prin această tehnică a fost studiată distribuția celulară în toată structura compozitelor Cs-CP.

6. Datele rezultate în urma studiilor de biocompatibilitate a compozitelor Cs-CP indică faptul că acestea joacă un rol important în proliferarea și distribuția celulară, indicând astfel posibilitatea testării *in vivo* a acestor materiale pe animale de experiență. Rezultatele obținute confirmă faptul că materialele compozite au potențial de aplicare în ingineria tisulară a osului.

VII. CONCLUZII GENERALE

Biomaterialele compozite care au în componență biopolimeri și CP au cunoscut o atenție deosebită în studiile teoretice și aplicative care abordează fenomene și tehnologii de realizare a substituenților osoși, ca urmare a caracteristicilor de biocompatibilitate conferite de către macromoleculele naturale și CP. Se pot obține noi compozite conținând o fază organică (polimeri naturali) și o fază anorganică (CP) ca alternativă pentru substituenții osoși tradiționali.

Încadrându-se în preocupările privind valorificarea superioară a caracteristicilor polimerilor naturali și CP, lucrarea aduce noi contribuții în domeniul obținerii de noi biomateriale compozite pe bază de biopolimeri (Cs, Hya, ChS) și CP cu aplicații în ingineria țesutului osos. Cercetările efectuate și rezultatele obținute pot fi concluzionate astfel:

- ◆ Stadiul actual al cercetărilor privind materiale clasice utilizate ca substituenți osoși de autogrefe și alogrefe au relevat unele dezavantaje pe care le prezintă aceste materiale (disponibilitatea limitată a cantității de țesut osos ce poate fi prelevat de la același pacient, necesitatea unei alte intervenție chirurgicale, dureri cronice post-operatorii, risc de infecție, transmiterea diferitelor boli) încât s-a impus necesitatea obținerii de noi materiale natural-sintetice ca alternativă pentru substituția osoasă actuală.
- ◆ Până în prezent o varietate de materiale natural-sintetice au fost studiate ca potențiale produse pentru ingineria tisulară a țesutului osos. Materialele polimerice naturale simple sunt biocompatibile, interacționează bine cu diferite tipuri de celule dar au dezavantajul de a avea proprietăți mecanice neadecvate. O combinație dintre polimerii naturali și CP duc la obținerea în final a unui compozit ce îmbină proprietățile ambelor tipuri de materiale.
- ◆ Strategiile biomimetice sunt inspirate din procesele naturale de mineralizare, unde mineralele sintetizate de către organism sunt combinate de obicei sub formă de compozite cu proteine, polizaharide sau alte forme de minerale în condiții fiziologice de temperatură (37 °C) și pH (7,2—7,4). Aceste condiții permit încorporarea de substanțe bioactive fără compromiterea performanțelor și îmbunătățind funcționalitatea fazei anorganice.
- ◆ S-au obținut compozite pe bază de biopolimeri (Cs, Hya, ChS) și CP prin metode biomimetice, utilizând precursori ai hidroxiapatitei (CaCl_2 și NaH_2PO_4), prin coprecipitarea acestora în soluția de biopolimer în prezența hidroxidului de amoniu, la pH=7,2 și temperatură de 37 °C.

◆ Gradul de deacetilare, hidrofilia și conținutul de Cs sunt factori importanți ce influențează proprietățile noilor materiale. Din comportamentul compozitelor în soluții de interes biologic s-a constatat că o creștere a conținutului de Cs în amestec determină creșterea capacității de absorbție a soluțiilor tampon.

Proprietatea materialelor poroase pe bază de biopolimeri-CP de a reține soluția de PBS sau PBS-albumină umană este atribuită atât hidrofiliei acestora, interacțiunilor chimice cât și structurii tridimensionale și porozității. Cel mai ridicat grad de retenție este observat la compozitele Cs-Hya-CP, fapt datorat în mare măsură caracterului hidrofil al Cs și Hya.

◆ Din studiile de degradare enzimatică se poate observa o degradare lentă a compozitelor biopolimeri-CP, fapt atribuit cristalinității și masei molare ridicate a Cs. Fibrele biopolimerice interacționează puternic cu cristalele de CP, ceea ce împiedică acțiunea în profunzime a enzimei, rezultând astfel o acțiune lentă a acestora asupra matricei polimerice; efectul acestui comportament îl reprezintă degradarea controlată *in vivo* a noilor materiale compozite.

◆ Din analizele de compoziție a fazei anorganice prin XRD, se poate observa obținerea unui amestec de CP prin procedeul biomimetic folosit. Compozitele au în componența lor atât hidroxiapatită cât și diferiți CP: fosfatul dicalcic, brușitul, fosfatul de calciu amorf, octofosfatul de calciu, trifosfatul de calciu, toți aceștia fiind implicați în formarea de nou țesut osos. Din analiza dimensiunilor cristalelor și a cristalinității CP s-a observat că valorile similare cu cele ale apatitelor biologice se regăsesc pentru sistemul Cs-CP, iar adăugarea de Hya și ChS în sistem duce la modificarea acestor caracteristici. Datele obținute la XRD sunt în concordanță cu rezultatele EDX care confirmă prezența diferitelor forme de CP, cu un raport Ca/P ce variază între 1,35 și 1,76.

◆ Morfologia compozitelor pe bază de biopolimeri și fosfați de calciu este în primul rând influențată de cantitatea de biopolimer din compoziția materialelor finale cât și de procedeul de obținere (amestecare-uscare, amestecare-liofilizare). Pentru compozitele obținute prin procedeul amestecare-liofilizare, acestea prezintă o porozitate ridicată cât și o dimensiune a porilor mult mai mare decât pentru compozitele obținute prin amestecare-uscare.

◆ Testarea din punct de vedere mecanic este necesară deoarece aceste materiale configurate ca substituenți ai țesutului osos trebuie să îndeplinească atât caracteristicile fizico-chimice ale acestuia cât și proprietățile sale mecanice. Astfel testele mecanice au evidențiat module de elasticitate la compresiune asemănătoare cu cele ale țesutului osos spongios pentru compozitele Cs-CP. În ceea ce privește influența GAG asupra

proprietăților mecanice, cele mai bune rezultate au fost obținute pentru compozitele ce conțin ChS.

◆ Testele MTS de viabilitate celulară efectuate pe compozitele Cs-CP, sunt în corelație cu analizele de evaluare a eliberării LDH-ului de către celule și evidențiază o viabilitate celulară crescută pentru toate tipurile de celule utilizate (MG63, HOS și HDMEC), la intervale de timp de până la 336h.

◆ Din evaluarea expresiei genetice a VEGF-ului se remarcă o tendință de creștere în timp atât pentru culturile celulare de MG63 cât și cu cele de HOS. Această creștere este corelată cu procesul de angiogeneză și cu cel de formare a noului țesut osos. Testele de citotoxicitate *in vitro* au arătat faptul că materialele compozite realizate nu sunt citotoxice.

◆ Rezultatele obținute indică posibilitatea utilizării compozitelor pe bază de biopolimeri și CP realizate prin procedee biomimetice de co-precipitare, propus în lucrare, în aplicații legate de substituția țesutului osos.

Referințe Bibliografice

- [214] Vallet-Regí M, González-Calbet J.M. Calcium Phosphates as substitution of bone tissue, *Prog Solid State Ch* 32, **2004**, 1-31.
- [229] Rusu VM, Ng CH, Wilke M, Tiersch B, Fratzl P, Peter MG, Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic-inorganic composite materials, *Biomaterials* 26, **2005**, 5414–5426;
- [230] Muller FA, Muller L, Caillard D, Conforto E. Preferred growth orientation of biomimetic apatite crystals. *Journal of Crystal Growth* 304, **2007**, 464–471.
- [235] Xie B, Nancollas GH, How to control the size and morphology of apatite nanocrystals in bone, *PNAS* 107 (52), **2010**, 22369-22370.
- [236] Hartgerink JD, Beniash E, Stupp SI. Self-Assembly and Mineralization of Peptide Amphiphile Nanofibers, *Science* 23 (294), **2001**, 1684 -1688.
- [237] Yamaguchi I, Itoh S, Suzuki M, Osaka A, Tanaka J. The chitosan prepared from crab tendons: II. The chitosan/apatite composites and their application to nerve regeneration *Biomaterials* 24 (19), **2003**, 3285-3292.
- [243] **Tanase CE**, Popa MI, Verestiuc L, Biomimetic Chitosan—Calcium Phosphate Composites with Potential Applications as Bone Substitutes Preparation and Characterization, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* **2011**, in press.
- [247] Lei LJ, Ding T, Shi R, Liu QY, Zhang LQ, Chen DF, Tien W. Synthesis, characterization and in vitro degradation of a novel degradable poly((1,2-propanediol-sebacate)-citrate) bioelastomer. *Polym Degrad Stabil.* 92, **2007**, 389–396.
- [248] Varum, K. M.; Myhr, M. M.; Hjerde, R. J. N.; Smidsrod, In vitro degradation rates of partially N-acetylated chitosans in human serum *O. Carbohydr. Res.* 299, **1997**, 99–101
- [249] Brouwer J, van Leeuwen-Herberts T, Otting-van de Ruit M. Determination of lysozyme in serum, urine, cerebrospinal fluid and feces by enzyme immunoassay. *Clin Chim Acta* 142, **1984**, 21–30.
- [250] Freiera T, Koha HS, Kazaziana K, Shoichet MS, Controlling cell adhesion and degradation of chitosan films by N-acetylation, *Biomaterials* 26, **2005**, 5872–5878.
- [251] Kurita, K. Kaji, Y, Mori. T, Nishiyama, Y., Enzymatic degradation of β -chitin: susceptibility and the influence of deacetylation, *Carbohydrate Polymers* 42 (1), **2000**, 19-21.
- [252] Shigemasa, Y. Saito, K. Sashiwa, H. Saimoto, H., Enzymatic degradation of chitins and partially deacetylated chitins. *Int J Biol Macromol* 16, **1994**, 43–49.
- [253] Pangburn, SH. Trescony, PV. Heller, J., Lysozyme degradation of partially deacetylated chitin, its films and hydrogels. *Biomaterials* 3, **1982**, 105–108.
- [254] Tomihata, K. Ikada, Y., In vitro and in vivo degradation of films of chitin and its deacetylated derivatives. *Biomaterials* 18, **1997**, 567–575.
- [255] Ren, D. Yi, H. Wang, W. Ma, X., The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation, *Carbohydrate Research* 340, **2005**, 2403–2410.
- [256] **Tanase CE**, Popa MI, Verestiuc L, Biomimetic bone scaffolds based on chitosan and calcium phosphates, *Mater Lett* 65, **2011**, 1681-1683.
- [257] Kim K, Yeatts A, Dean D, Fisher JP, Stereolithographic Bone Scaffold Design Parameters: Osteogenic Differentiation and Signal Expression, *Tissue engineering. Part B* 16 (5), **2010**, 523-539.

- [258] Puppi D, Chiellini F, Piras AM, Chiellini E, Polymeric materials for bone and cartilage repair, *Prog Polym Sci* 35, **2010**, 403–440.
- [259] Y Ishikawa, J. Komotori and M. Senna, Properties of Hydroxyapatite – Hyaluronic Acid Nano-Composite Sol and its Interaction with Natural Bones and Collagen Fibers, *Current Nanoscience* 2 (3), **2006**, 1-6.
- [260] Surini Silvia, Akiyama Hidero, Morishita Mariko, Nagai Tsuneji, Takayama Kozo, Release phenomena of insulin from an implantable device composed of a polyion complex of chitosan and sodium hyaluronate, *J Control Release* 90 (3), **2003**, 291-301.
- [261] Slevin M, Kumar S, Gaffney J. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan induce multiple signaling pathways affecting vascular endothelial cell mitogenic and wound healing responses. *J Biol Chem* 277, **2002**, 41046–41059.
- [262] Tanaka K, Goto T, Miyazaki T, Morita Y, Kobayashi S, Takahashi T., Apatite-coated hyaluronan for bone regeneration, *J Dent Res.* 90 (7), **2011**, 906-911
- [263] Rooney P, Wang M, Kumar P, Kumar S. Angiogenic oligosaccharides of hyaluronan enhance the production of collagens by endothelial cells. *J Cell Sci* 105(1), **1993**, 213–218.
- [264] Gao F, Liu Y, He Y, Yang C, Wang Y, Shi X, Wei G. Hyaluronan oligosaccharides promote excisional wound healing through enhanced angiogenesis. *Matrix Biol* 29, **2009**, 107–116.
- [269] Sato S, Rahemtulla F, Prince CW, Omana M, Butler WT, Proteoglycans of adult bovine compact bone, *Connect Tissue Res* 14, **1985**, 65–75.
- [270] Ruoslahti E, Yamaguchi Y, Proteoglycans as modulator of growth factors activities. *Cell* 64, **1991**, 867–869.
- [271] Rhee SH, Tanaka J, Self-assembly phenomenon of hydroxyapatite nanocrystals on chondroitin sulfate, *J Mater Sci: Mater Med* 13, **2002**, 597–600.
- [276] Li G, Cui YX, McIlmurray L, Allen WE, Wang HL., RhBMP-2, rhVEGF(165), rhPTN and thrombin-related peptide, TP508 induce chemotaxis of human osteoblasts and microvascular-endothelial cells, *J Orthop Res* 23 (3), **2005**, 680–685.
- [277] Roy H, Bhardwaj S, Yla-Herttuala S., Biology of vascular endothelial growth factors, *FEBS Lett* 580 (12), **2006**, 2879–2887.
- [278] Clarkin CE, Emery RJ, Pitsillides AA, Wheeler-Jones CP., Evaluation of VEGF mediated signaling in primary human cells reveals a paracrine action for VEGF in osteoblast-mediated crosstalk to endothelial cells, *J Cell Physiol* 214 (2), **2008**, 537–544.
- [279] Peattie RA, Nayate AP, Firpo MA, Shelby J, Fisher RJ și colab., Stimulation of in vivo angiogenesis by cytokine-loaded hyaluronic acid hydrogel implants, *Biomaterials* 25, **2004**, 2789–2798.
- [280] Sanders JE, Wang YN, Malcolm SG, Lamont SE., Biomaterial mesh seeded with vascular remnants from a quail embryo has a significant and fast vascular templating effect on host implant tissue, *Tissue Eng* 9, **2003**, 1271–1279.
- [281] Ascencio D, Hernandez-Pando R, Barrios J, Soriano RE, Perez-Guille B, Villegas F, și colab., Experimental induction of heterotopic bone in abdominal implants, *Wound Repair Regen* 12, **2004**, 643–649.
- [282] Tille JC, Pepper MS, Mesenchymal cells potentiate vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis in vitro, *Exp Cell Res* 280, **2002**, 179-191.

- [283] Spector JA, Mehrara BJ, Greenwald JA, Saadeh PB, Steinbrech DS, Bouletreau PJ, și colab., Osteoblast expression of vascular endothelial growth factor is modulated by the extracellular microenvironment, *Am J Physiol Cell Physiol* 280, **2001**, C72-C80.
- [284] Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, și colab., Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts, *Bone* 30, **2002**, 472-477.
- [285] Kempen DH, Creemers LB, Alblas J, Lu L, Verbout AJ, Yaszemski MJ, și colab., Growth factor interactions in bone regeneration, *Tissue Eng Part B Rev.* 16 (6), **2010**, 551-566.

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

1. **C.E. Tanase**, M.I. Popa, L. Verestiuc, Biomimetic bone scaffolds based on chitosan and calcium phosphates, *Materials Letters* 2011, 65, 1681–1683.
2. **Constantin E. Tanase**, Marcel I. Popa, Liliana Verestiuc, Biomimetic Chitosan—Calcium Phosphate Composites with Potential Applications as Bone Substitutes Preparation and Characterization *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, 2011, in press.
3. **Constantin E. Tanase**, Anne Sartoris, Marcel I. Popa, Liliana Verestiuc, Ronald E. Unger, Charles J. Kirkpatrick, Biomimetic Chitosan-Calcium Phosphate Scaffold For Bone Tissue Regeneration, *Biomaterials* **2011**, trimis spre publicare.

Lucrări publicate la conferințe indexate ISI:

1. **C.E. Tanase**, M.I. Popa, L. Verestiuc, Bone Substitutes Based On Biopolymers and Calcium Phosphates Obtained by Biomimetic Method, *International Conference on e-Health and Bioengineering, EHB 2011*, 24-26 noiembrie 2011-Iași-România.
2. **C.E. Tanase**, M.I. Popa, L. Verestiuc, Chitosan-hydroxyapatite composite obtained by biomimetic method as new bone substitute, *International Symposium on Assistive and Recuperative Technologies for Injured, ill, Pregnant, Elderly and people with Disabilities*, 24-26 iulie 2009-Iasi-Romania.

Lucrări publicate în volume de specialitate

1. **C.E. Tanase**, M.I. Popa, L. Verestiuc, Characterization of Novel Biomimetic Substitutes, Based on Chitosan and Calcium Phosphate, *International Conference of Applied Sciences Chemistry and Chemical Engineering—CISA*, 8 - 11 aprilie 2010, Slănic Moldova – Bacău.

Capitol carte

1. L. Verestiuc, **E.C. Tanase**, “Biodegradable polymers for controlled release of drugs” în *Medical Applications of Polymers*, editori: M. Popa, R.M. Ottenbrite, C.V. Uglea, American Scientific Publishers, USA, 2010.

Lucrări comunicate la Congrese Internaționale

1. **C.E. Tanase**, M.I. Popa, L. Verestiuc, Bone Substitutes Based On Biopolymers and Calcium Phosphates Obtained by Biomimetic Method, International Conference on e-Health and Bioengineering, EHB 2011, 24-26 noiembrie 2011-Iași-România.
2. **C.E.Tanase**, L.Verestiuc, C.Alupei, P.Ruth, M.I.Popa, Bone Substitutes Based on Biopolymers and Calcium Phosphates, Obtained Through Biomimetic Methods, 4th International Conference “Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices” BiomMedD’2010, 23-25 septembrie 2010-Sinaia-România.
3. G. Dodi, D. Hritcu, **C.E.Tanase**, M. I. Popa, Synthesis And Characterization Of Guar-Graft/Crosslinked-Poly(Ethylene Glycol Dimethacrylate) Particles, 4th International Conference “Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices” BiomMedD’2010, 23-25 septembrie 2010-Sinaia-România.
4. **C.E.Tanase**, L.Verestiuc, M.I.Popa, Synthesis and Characterization of New Bone Substitutes Based on Biopolymers-Calcium Phosphate via Biomimetic Method, International Regenerative Medicine Conference, 15-18 iulie 2010-Iasi-Romania.
5. **C.E.Tanase**, M.I.Popa, L.Verestiuc, New Biomimetic Scaffolds Based on Biopolymers and Calcium Phosphates, with Potential Use in Bone Tissue Engineering, 7th International Workshop on Musculoskeletal and Neuronal Interactions, 20-23 mai 2010-Cologne-Germania.
6. **C.E.Tanase**, M.I.Popa, L.Verestiuc, Characterization of Novel Biomimetic Substitutes, Based on Chitosan and Calcium Phosphate, International Conference of Applied Sciences Chemistry and Chemical Engineering—CISA, 8 - 11 aprilie 2010, Slănic Moldova – Bacău.
7. **C.E.Tanase**, M.I.Popa, L.Verestiuc, Biomimetic chitosan-hydroxyapatite composites with potential applications as bone substitutes, 22nd European Conference on Biomaterials-The annual conference of the European Society for Biomaterials, 7-11 septembrie 2009, Lausanne, Elveția.
8. V.Balan, **C.E.Tanase**, M.I.Popa, D.Hritcu, L.Verestiuc, Synthesis and characterization of chitosan-magnetite particles with biomedical applications, 22nd European Conference on Biomaterials-The annual conference of the European Society for Biomaterials, 7-11 septembrie 2009, Lausanne, Elveția.
9. **C.E.Tanase**, M.I.Popa, L.Verestiuc, Chitosan-hydroxyapatite composite obtained by biomimetic method as new bone substitute, International Symposium on Assistive and Recuperative Technologies for Injured, ill, Pregnant, Elderly and people with Disabilities, , 24-26 iulie 2009-Iasi-Romania.

10. **C.E.Tanase**, M.I.Popa, L.Verestiuc, Chitosan-hydroxyapatite scaffolds with potential use in bone tissue engineering, Frontiers in Macromolecular and Supramolecular Science Second Cristofor I. Simionescu Symposium, 2-3 iunie 2009-Iasi-Romania.

11. **C.E.Tanase**, I.Poeata, M.D.Vlad, A.Chiriac, Experimental study regarding hydroxyapatite coated on polymethylmethacrylate plates, for cranioplasty, 3rd International Conference on Biomaterials and Medical Devices BIOMMEDD'2008, 13-16 noiembrie 2008-București-România.

Lucrări comunicate la Congrese Naționale

1. L.Pinghireac, A.Trofaia, L.Verestiuc, M.I.Popa, **C.E.Tanase**, Substituenți osoși pe baza de biopolimeri și fosfați de calciu obținuți prin procedee biomimetice, cu potențiale aplicații în ingineria tisulară a osului, Simpozionul Național de Bioinginerie Medicală pentru Studenți și Tineri Cercetători Editia a XIII-a 17-23 mai 2010-Iasi-România.

2. **Constantin-Edi Tanase**, Ionel Marcel Popa, Liliana Verestiuc, Sinteza și Caracterizarea Unor Noi substituenți Osoși pe Bază de Chitosan—Fosfați de Calciu Obținuți prin Procedee Biomimetice, Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, Editia VI - "Noi frontiere în chimie și inginerie chimică", 18-20 noiembrie 2009-Iași-România.

3. **Constantin Edi Tanase**, Liliana Verestiuc, Adriana Lungu, Marcel Ionel Popa, The influence of hyaluronic acid/chondroitin sulfate on the chitosan –hydroxyapatite composites properties, a VII-a Ediție a Simpozionului Național de Biomateriale "Biomateriale și Aplicații Medico-Chirurgicale", 21-22 octombrie 2009-București-România.

4. **Edi Constantin Tanase**, Marcel Ionel Popa, Liliana Verestiuc, Ion Poeata, Maria Daniela Vlad, Caracterizarea Filmelor de Hidroxiapatită Depuse pe Placute de Polimetilmetacrilat Utilizate în Cranioplastie, Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului Editia a V-a „Materiale și procese inovative”, 19-21 noiembrie 2008- Iași- România.

Premii-burse

1. Bursa „Travel award” obținut la Congresul „7th International Workshop for Musculoskeletal and Neuronal Interactions” 20-23 Mai 2010, Cologne, Germania.

2. Bursa Rudolf Cimdins a Societății Europene de Biomateriale (ESB), obținut la Congresul „22nd European Conference on Biomaterials, The annual conference of the European Society for Biomaterials” 7-11 septembrie 2009, Lausanne, Elveția.