

UNIVERSITATEA TEHNICĂ
"GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI

Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția
Mediului

în cotutelă cu



UNIVERSITÉ de PAU et des PAYS
de l'ADOUR, FRANÇA

IPREM – U.M.R. 5254



COMPATIBILITATEA ȘI COSTRUCTURAREA SISTEMELOR CONȚINÂND SCLEROPROTEINE ȘI POLIZAHARIDE

- Rezumatul tezei de doctorat -

Conducători științifici:

Prof.univ.dr.ing. *dr.h.c.* MARCEL POPA

Prof.dr.ing. *dr.h.c.* JACQUES DESBRIERES

Doctorand:

Bioinginer CRISTINA – MIHAELA IGNAT (LEFTER)

- Iași -

– septembrie 2012 –

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI
RECTORATUL

Către _____

Vă facem cunoscut că în ziua de 26 septembrie 2012 la ora 12, în Sala de Consiliu a Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

**„COMPATIBILITATEA ȘI COSTRUCTURAREA SISTEMELOR CONȚINÂND
SCLEROPROTEINE ȘI POLIZAHARIDE”**

elaborată de doamna **bioing. Cristina-Mihaela Ignat (Lefter)** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

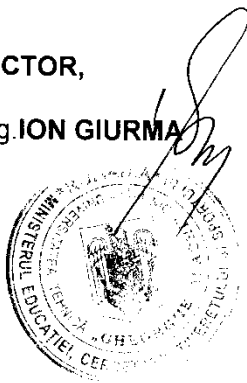
Prof.dr.ing. Teodor Măluțan	președinte
Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași	
Prof.dr.ing. Marcel Popa	conducător de doctorat
Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași	
Prof.dr.ing. Jacques Desbrieres	conducător de doctorat
Université de Pau et des Pays de l'Adour, Franța	în cotutelă
Prof.dr.ing. Jean-François Chailan	referent oficial
Université du Sud Toulon-Var , Franța	
Maître de Conf. Laurent Lebrun	referent oficial
Université de Rouen, Franța	
Conf.dr.ing. Stelian-Sergiu Maier	referent oficial
Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” 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 Nagiț



Teza de doctorat a fost realizată cu sprijinul financiar al proiectului „Burse Doctorale pentru Performanța în Cercetare la Nivel European (EURODOC)”.

Proiectul „Burse Doctorale pentru Performanța în Cercetare la Nivel European (EURODOC)”, POSDRU/88/1.5/S/59410, ID 59410, este un proiect strategic care are ca obiectiv general „Dezvoltarea capitalului uman pentru cercetare prin programe doctorale pentru îmbunătățirea participării, creșterii atractivității și motivației pentru cercetare. Dezvoltarea la nivel european a tinerilor cercetători care să adopte o abordare interdisciplinară în domeniul cercetării, dezvoltării și inovării”.

Proiect finanțat în perioada 2009 - 2012

Finanțare proiect: 18.943.804,97 RON

Beneficiar: Universitatea Tehnică “Gheorghe Asachi” din Iași

Partener: Universitatea „Babeș Bolyai” din Cluj-Napoca

Director proiect: Prof. univ. dr. ing. Mihaela-Luminița LUPU

Responsabil proiect partener: Prof. univ. dr. ing. Alexandru OZUNU



“Pentru fiecare din noi care reușește, există cineva care ne-a arătat calea”

Oprah Winfrey

*Doresc să transmit pe această cale sincere mulțumiri și recunoștință conducătorului științific, domnului **Prof.dr.ing. dr.h.c. Marcel Popa** pentru încrederea, sprijinul și înțelegerea acordată pe parcursul întregii perioade de studiu.*

*În egală măsură aș dori să mulțumesc domnului **Prof.dr.ing. dr.h.c. Jacques Desbrieres** pentru sprijinul și sfaturile acordate pe durata stagiului meu de cercetare în cadrul Universității din Pau, Franța.*

*Deosebite mulțumiri și recunoștință domnului **Conf.dr.ing. Stelian-Sergiu Maier** și doamnei **Șef lucr.dr.ing. Vasilica Maier** pentru timpul acordat, pentru prețioasele sugestii privind realizarea tezei, precum și pentru contribuția domniilor sale la formarea mea ca cercetător.*

*Aș dori să mulțumesc membrilor comisiei, **Prof.dr.ing. Teodor Măluțan, Prof.dr.ing. Jean-François Chailan, Maître de Conf. Laurent Lebrun, Conf.dr.ing. Stelian-Sergiu Maier** pentru amabilitatea de a accepta apartenența în comisia de doctorat și pentru timpul alocat evaluării acestei teze.*

*Alese gânduri de mulțumire adresez doamnei **Conf.dr.ing. Liliana Vereștiuc** care m-a recomandat domnului profesor dr. ing. Marcel Popa și care, cu multă căldură, răbdare și profesionalism, m-a încurajat când am avut nevoie.*

*Sincere mulțumiri doamnei **Șef lucr.dr. Maria Butnaru** pentru ajutorul oferit în realizarea analizelor de biocompatibilitate.*

*Vreau să mulțumesc doamnei **Conf.dr.ing. Constanța Ibănescu** pentru suportul tehnic pe care mi l-au acordat în realizarea testelor reologice.*

*Mulțumesc tuturor colegilor mei **Delia-Mihaela Rață, Anca Niculina Cadinoiu, Dodi Gianina, Catălina Anișoara Peptu, Lăcrămioara Bălăiță, Mihaela Mândru, Simona Băcăiță, Gabriela Andrei, Bogdan Ciobanu, Simona Bețianu și Ancuța Rusu** pentru pentru suportul moral și sprijinul acordat, și, de asemenea, pentru momentele frumoase petrecute de-a lungul anilor de doctorat.*

*Aș dori să mulțumesc **părinților mei**, surorilor mele, **Ramona și Ana-Maria**, pentru înțelegerea, răbdarea și încurajările acordate.*

*Cele mai calde gânduri și mulțumiri soțului meu **Răzvan** pentru dragostea, încurajările, susținerea și echilibrul pe care mi l-a oferit necondiționat pe parcursul acestor ani de studii.*

Cristina

Septembrie 2012

Cuprins:

INTRODUCERE	8
Capitolul I. Aplicațiile biomedicale ale sistemelor collagen – polizaharide	10
I.1. Componenta collagenică	10
I.1.1. Nivelurile de organizare moleculară ale collagenelor fibrilare	13
I.1.1.1. Structura primară.....	14
I.1.1.2. Structura secundară.....	14
I.1.1.3. Structura terțiară.....	15
I.1.1.4. Structura cuaternară.....	15
I.1.2. Biosinteza collagenului.....	16
I.1.3. Clasificarea formelor collagenice	17
I.1.4. Proprietățile fizico-chimice ale formelor collagenice.....	22
I.1.4.1. Proprietățile mecanice ale collagenului	22
I.1.4.2. Proprietățile termice ale collagenului	23
I.1.4.3. Comportamentul de macroion amfoter în soluție apoasă	23
I.1.4.4. Biodegradarea collagenelor	24
I.1.5. Aplicațiile collagenului.....	25
I.1.5.1. Aplicațiile collagenelor în stomatologie	26
I.1.5.2. Aplicațiile materialelor collagenice în oftalmologie	27
I.1.5.3. Aplicațiile collagenului în tratarea arsurilor	27
I.1.5.4. Aplicațiile collagenului în chirurgie.....	27
I.2. Componenta polizaharidică	28
I.2.1. Clasificarea polizaharidelor.....	28
I.2.2. Polizaharide comune.....	29
I.2.2.1. Chitina și Chitosanul.....	29
I.2.2.2. Acidul hialuronic (hialuronat de sodiu, HA).....	31
I.2.2.3. Acidul alginic (alginatul)	32
I.2.2.5. Dextranul	34
I.2.2.6. Pululanul.....	35
I.2.2.7. Xantanul	35
I.2.2.8. Carboximetil celuloza (CMC).....	36
I.3. Modalități de asociere a proteinelor (collagenului) cu polizaharide	37
I.4. Aplicații ale sistemelor proteine – polizaharide	39

Capitolul II. Obținerea de hidrogeluri pe bază de colagen și polizaharide	42
II.1. Introducere.....	42
II.2. Clasificarea hidrogelurilor.....	43
II.3. Polimeri utilizați pentru obținerea hidrogelurilor.....	44
II.4. Metode de obținere a hidrogelurilor	45
II.4.1. Reticularea chimică.....	45
II.4.1.1. Reticularea prin intermediul enzimelor	46
II.4.1.2. Reticulare prin intermediul grupelor funcționale substituente.....	47
II.4.2. Reticularea fizică.....	49
II.4.2.1. Reticulare prin interacții ionice	50
II.4.2.2. Reticularea prin cristalizare	51
II.5. Proprietățile hidrogelurilor	52
II.5.1. Capacitatea de absorbție/încorporare de fluide.....	53
II.5.2. Biocompatibilitatea	53
II.5.3. Proprietățile mecanice.....	53
II.5.4. Biodegradabilitatea hidrogelurilor	54
II.5.5. Echilibrul între proprietăți mecanice și degradare	54
II.5.6. Citotoxicitatea	54
II.5.7. Permeabilitatea	56
II.5.8. Adaptabilitatea la procedurile de sterilizare.....	56
II.6. Aplicațiile biomedicale ale hidrogelurilor	56
II.6.1. Aplicațiile hidrogelurilor în oftalmologie.....	57
II.6.2. Sisteme de eliberare controlată de medicamente	58
II.6.3. Aplicațiile hidrogelurilor ca pansamente pentru răni.....	59
II.6.4. Hidrogeluri pentru ingineria tisulară	59
II.6.5. Hidrogeluri pentru încapsularea de celule.....	60
II.6.6. Aplicațiile hidrogelurilor în agricultură	60
 –Rezultate proprii–	
Capitolul III. Materiale și metode	62
III.1. Materiale și reactivi utilizați.....	62
III.2. Extracția, purificarea și caracterizarea soluției de atelocolagen	66
III.2.1. Obținerea și purificarea atelocolagenului biologic activ	66
III.2.2 Caracterizarea solului de atelocolagen.....	66
III.2.2.1. Substanțe minerale totale, cenușa.....	67
III.2.2.2. Procentul de azot.....	67

III.2.2.3. Determinarea punctului izoelectric al atelocolagenului	69
III.2.2.4. Determinarea masei moleculare a atelocolagenului	70
III.2.2.4.1. Determinarea masei moleculare a atelocolagenului, prin electroforeză.....	70
III.2.2.4.2. Determinarea masei moleculare a atelocolagenului, prin cromatografie pe gel permeabil	72
III.3. Obținerea de hidrogeluri pe bază de collagen și collagen-polizaharide.....	73
III.4. Metode de caracterizare a hidrogelurilor obținute	74
III.4.1. Gradul maxim de umflare - Q_{max} (%)	74
III.4.2. Capacitatea de încărcare a hidrogelurilor cu medicament	75
III.4.3. Capacitatea de eliberare a unui medicament	75
III.4.4. Microscopia Electronică de baleaj (Scanning Electron Microscopy, SEM)	76
III.4.5. Analiza termică.....	77
III.4.5.1. Calorimetria cu scanare diferențială	77
III.4.5.2. Analiza termogravimetrică.....	79
III.4.6. Teste de biocompatibilitate	80
III.4.7. Spectroscopia RAMAN.....	82
III.4.8. Rezonanța electromagnetică nucleară (RMN).....	83
III.4.9. Studiul reologic al hidrogelurilor obținute pe bază de collagen și polizaharide	84
III.5. Studiul echilibrului de fază în soluțiile de collagen și polizaharide	85
III.5.1. Evaluarea turbidimetrică a compatibilității.....	85
III.5.2. Studiul reologic al soluțiilor diluate de collagen și polizaharide	85
III.5.3. Trasarea diagramelor de fază	86
Capitolul IV. Obținerea amestecurilor reproductibile de atelocolagen și polizaharide	89
IV.1. Investigarea turbidimetrică a soluțiilor coloidale de biopolimeri naturali	90
IV.2. Studiul reologic asupra soluțiilor diluate de biopolimeri naturali.....	92
IV.3. Diagramele de fază binare dintre atelocolagen și hialuronat sau gelan.....	98
IV.4. Diagramele ternare ale amestecurilor de atelocolagen, hialuronat de sodiu și gelan	104
Capitolul V. Hidrogeluri cu componentă colagenică reticulate covalent.....	107
V.1. Estimarea reproductibilității hidrogelurilor atelocolagenice reticulate prin caracterizare reologică.....	107
V.2. Studiul reologic asupra hidrogelurilor pe bază de collagen și collagen-hialuronat de sodiu reticulate covalent	109
V.3. Determinarea grupărilor aminice libere din hidrogeluri.....	120
V.4. Analiza structurală a hidrogelurilor formate	121
V.4.1. Caracterizarea prin spectroscopie ^1H -RMN	121
V.5. Analiza termică.....	124

V.6. Caracterizarea morfologică a hidrogelurilor	127
V.7. Gradul maxim de umflare.....	138
V.8. Capacitatea de încărcare a hidrogelurilor cu medicament	129
V.9. Eliberarea <i>in vitro</i> a Levofloxacinei.....	130
Capitolul VI. Studii <i>in vitro</i> asupra biocompatibilității hidrogelurilor.....	133
VI.1. Caracterizarea hidrogelurilor din punct de vedere al activității metabolice	133
VI.2. Studii de proliferare celulară asupra hidrogelurilor realizate.....	44
VI.3. Metoda imunofluorescentă de colorare a materialelor populate	45
Concluzii generale.....	48
Referințe bibliografice	

INTRODUCERE

Pe parcursul ultimului deceniu, obținerea de substraturi cito-prietenose, apte a susține refacerea tisulară, impune utilizarea de biomateriale care poartă domenii de recunoaștere celulară, așa cum sunt scleroproteinele și unele dintre polizaharide. Membrana celulelor specifice țesuturilor conjunctive dispune de mecanisme ce facilitează ancorarea la substraturi solide ori de tip gel în care se regăsesc macromolecule ori fibrile de (atelo)colagen, asociate sau nu cu acid hialuronic. Astfel de substraturi pot fi generate prin tehnici de reasamblare moleculară spontană ordonată (ca în cazul restructurării collagenului cvasi-nativ pentru a forma fibrile), ori indusă fizico-chimic și apoi stabilizată morfologic (ca în cazul preparării hidrogelurilor mixte, atelocolagen – hialuronat de sodiu, divers reticulate și apoi transformate în crio- sau vitri-geluri).

În cadrul prezentei teze, s-a studiat căile de obținere și purificare a precursorilor bio-macromoleculari necesari apoi obținerii de substraturi cito-prietenose, precum și modalitățile de generare și caracterizare a acestora. Metodele de restructurare la care se apelează sunt atât de natură fizico-chimică (coprecipitarea controlată în amestecuri binare și ternare de atelocolagen și hialuronat de sodiu), cât și chimică (reticularea prin punți moleculare cu lungime minimală).

Urmând principiile mai sus citate, se vizează obținerea și caracterizarea fizico-chimică a unor substraturi solide și controlat rehidratabile, cu un nivel al citocompatibilității peste media substraturilor uzuale, în care bio-macromoleculele participă la formarea de rețele semi-interpenetrante, sunt asociate fizico-chimic (co-precipitate), sau reticulate chimic utilizând compuși macromoleculari de sinteză. Speciile chimice implicate și procesele de reticulare la care acestea participă sunt selectate astfel încât randamentele reacțiilor să fie cât se poate de ridicate, iar cantitățile de produși reziduali să fie minimale, respectivii produși fiind slab reactivi și ușor de neutralizat ori de îndepărtat.

Obiectivul principal al tezei de față constă în *Realizarea de substituenți ai matricei extracelulare pe bază de collagen și polizaharide biologic active destinate ingineriei tisulare cu caracter de hidrogel.*

În vederea atingerii acestui obiectiv principal, cercetările s-au desfășurat în mai multe direcții având la bază următoarele obiective specifice:

- studiul modalităților de extracție și purificare a formelor collagenice minimal denaturate și cu reactivitate controlată.
- studiul compatibilității și a stabilității în amestecurile de atelocolagen și polizaharide.
- studiul efectelor amestecării și coprecipitării în sistemele atelocolagen – polizaharide.
- studiul citocompatibilității substraturilor obținute din amestecurile atelocolagen – polizaharide.

Elemente de originalitate al acestei teze constau în:

- abordarea inginerească în formularea amestecurilor de atelocolagen și polizaharide, în vederea obținerii de sisteme coloidale cu compoziție și caracteristici reproductibile.

- tehnica de generare a blendurilor de atelocolagen și polizaharide, prin amestecarea intimă a componentelor, simultan cu inducerea reticulării, în cursul curgerii turbulente prin tuburi cu lumen redus.

- evaluarea fizico-chimică și reologică prin tehnici avansate a caracteristicilor amestecurilor de atelocolagen și polizaharide.

Lucrarea este structurată în 6 capitole, însumând un număr de 168 pagini, ce cuprind 110 figuri, 14 tabele, 16 relații de calcul și formule, 341 indicații bibliografice.

Prima parte a lucrării reprezintă o sinteză a datelor din literatură, desfășurată pe întinderea a două capitole, utilă pentru abordarea cercetării experimentale. Astfel, primul capitol al lucrării are ca scop trecerea în revistă a aplicațiilor biomedicale ale sistemelor colagen-polizaharide, insistând pe prezentarea componentei colagenice (organizare moleculară, biosinteză, proprietăți fizico-chimice), a celei polizaharidice (clasificare, prezentare succintă a celor mai utilizate polizaharide în bioaplicații), și încheindu-se cu discutarea modalităților de asociere a colagenului cu polizaharidele. Cel de al doilea capitol tratează obținerea hidrogelurilor de bază de colagen și polizaharide, insistând pe metodele de sinteză și de caracterizare, proprietățile fizico-chimice și de biomaterial ale acestora, aplicațiile lor biomedicale. Studiul bibliografic a fost întocmit pe baza a 290 referințe bibliografice consultate.

Contribuțiile originale reprezintă a doua parte a tezei, fiind constituită din 4 capitole.

În capitolul III sunt prezentate materialele, metodele de lucru și tehnicile de caracterizare utilizate. O atenție deosebită este acordată descrierii extracției, purificării și caracterizării soluției de atelocolagen obținut din tendonul de bovine tinere. Tehnica utilizată conține numeroase elemente de originalitate, făcând, de altfel, subiectul unei propuneri de invenție în curs de evaluare la OSIM.

Capitolul IV raportează rezultatele obținute prin studiul obținerii amestecurilor, de dorit reproductibile, de atelocolagen și polizaharide. Obiectivul pragmatic a fost de a obține amestecuri fluide stabile pe termen lung ale atelocolagenului cu două polizaharide: hialuronatul de sodiu și gelanul.

Capitolul V abordează studiul obținerii unor hidrogeluri prin reticularea covalentă a atelocolagenului, respectiv a unor amestecuri pe bază de atelocolagen și hialuronat de sodiu, utilizând un reticulant netoxic, cu moleculă suficient de mare pentru a asigura formarea unei rețele laxă și relativ flexibile – 1,4-butandiol diglicidil eter și caracterizarea hidrogelurilor formate din punct de vedere reologic, microscopic, termic, morfologic, capacității de umflare, capacității de încărcare și eliberare a Levofloxacinei.

Capitolul VI prezintă studiile *in vitro* asupra biocompatibilității hidrogelurilor obținute după 24, respectiv 48 ore de incubare a hidrogelurilor cu fibroblaste de șoarece.

Lucrarea se încheie cu concluziile generale și referințele bibliografice.

Rezumatul tezei de doctorat respectă denumirea capitolelor, numerotarea figurilor, tabelelor și a referințelor bibliografice din teză.

Capitolul I. Aplicațiile biomedicale ale sistemelor collagen – polizaharide

Colagenul a fost întotdeauna considerat a fi o proteină importantă [10–12], numită și scleroproteină [13], datorită abundenței sale în organismul uman și aplicațiilor sale comerciale [14, 15]. El reprezintă principalul component al tendoanelor [16] și ligamentelor [17], fiind prezent în piele [18], artere, cartilaj [19], și în majoritatea matricelor extracelulare [20] în proporție de aproximativ 25 – 30% din totalul masei proteice [21–23].

Existența unei unități monomerice de construcție pentru fibre de collagen a fost acceptată de Gross [5] fiind numită tropocolagen [26].

Această unitate proteică (referindu-ne la o moleculă de collagen), este alcătuită din trei lanțuri polipeptidice α , două lanțuri identice, numite $\alpha 1(I)$ și un lanț, numit $\alpha 2(I)$ [27, 28], care conțin secvențe repetate de (Glicină-X-Y)_n [29, 30], unde X este reprezentat de prolină și Y de hidroxiprolină [31, 32] (figura 3). Repetarea acestei secvențe de aminoacizi duce la formarea triplului helix, care constituie caracteristica structurală a superfamiliei de collagen [33]. Fiecare lanț polipeptidic este compus din aproximativ 1050 resturi de aminoacizi, cu un conținut de aproximativ 33% glicină [34], 25% prolină și 25% hidroxiprolină [35].

Colagenul poate fi prelucrat într-un număr mare de forme, cum ar fi foi, tuburi [79], bureți [80], pulberi, soluții injectabile și dispersii [73]; toate acestea și-au găsit utilizarea în domenii ca oftalmologie, leziuni și pansament pentru răni (îmbunătățește penetrarea celulară și vindecarea plăgilor) [72], inginerie tisulară [22, 69], industria alimentară [81], cosmetică, culturi de celule [79], regenerarea oaselor și dezvoltarea de materiale de acoperire pentru grefe vasculare sau valve cardiace [75].

Pe parcursul ultimului deceniu, membranele obținute prin combinarea proteinelor (de exemplu, proteine din soia, collagen, și gelatină), cu un biopolimer natural (de exemplu, celuloză, chitosan) au fost dezvoltate în încercarea de a furniza noi materiale pentru repararea pielii ca pansamente în tratamentul plăgilor provocate de arsuri [171].

Datorită capacității ridicate de reținere a apei, acidul hialuronic este folosit cu succes în aplicațiile medicale, cum ar fi în produsele cosmetice ca biomaterial vâscoelastic, dar și în sistemele de eliberare de medicamente datorită biodegradabilității sale [10]. Acidul hialuronic este implicat în migrarea și diferențierea celulelor, și este prima macromolecula care apare în timpul regenerării țesutului [200].

De asemenea, s-a demonstrat că adăugarea de acid hialuronic promovează diviziunea celulară în fibroblastele umane, că este un regulator critic al mai multor fenomene biologice, inclusiv dezvoltarea embrionară, organizarea țesutului, vindecarea rănilor și angieneză; este extrem de biocompatibil [203] și poate fi obținut din mai multe surse, inclusiv fermentație bacteriană. În consecință, este sintetizat în cantități mari pentru utilizarea clinică [135, 204].

Lin și Liu [205] au constatat că pentru un amestec de bureți care conțin collagen și hialuronan, rezistența mecanică și biostabilitatea sunt mai mari decât la componentele amestecului luate individual.

De asemenea, Pietrucha a arătat că, implantarea unei matrici compusă din colagen și hialuronan în afecțiuni craniene la șobolani, demonstrează o bună biocompatibilitate și probează un mai mare potențial osteoconductiv [206].

Capitolul II. Obținerea de hidrogeluri pe bază de collagen și polizaharide

II.1. Introducere

Încă de la începutul anilor '50 [207], de la lucrarea de pionierat a lui Wichterle și Lim [208] din 1960, hidrogelurile au fost un subiect de cercetare extins în ultimele decenii, iar datorită proprietăților cum ar fi controlul posibil asupra cineticii de umflare și conținutul ridicat de apă le face foarte atractive pentru aplicații biomedicale [209, 210].

Hidrogelurile sunt rețele homopolimere sau copolimere [209] hidrofile [211, 212] care au capacitatea de a se absorbi cantități considerabile de apă [213, 214] sau fluid biologic [213, 144] de la 10-20% [215] până la 80-90% față de masa lor uscată (figura 29), fără dizolvarea [150] sau pierderea de structură tridimensională [216], ceea ce le oferă caracteristici fizice similare cu țesuturilor moi [217, 218].

Hidrogelurile au fost întotdeauna considerate o clasă promițătoare de biomateriale, datorită capacității de a fi ușor adaptate pentru a manifesta proprietățile mecanice și chimice dorite care sunt asemănătoare cu cele ale matricei extracelulare native și pot prezenta permeabilitate mare pentru nutrienți, oxigen și alți metaboliți solubili în apă [222].

În general, hidrogelurile prezintă o bună biocompatibilitate, porozitate și elasticitate [223], proprietăți similare cu ale țesuturilor naturale [224]. Datorită acestui fapt, aceste materiale sunt utilizate cu succes în domeniile biomedicale, biotehnologice și farmaceutice. De asemenea, pot fi folosite ca matrici pentru sprijinirea și promovarea regenerării țesuturilor în domeniul ingineriei tisulare [225].

Datorită capacității lor de a reține o cantitate semnificativă de apă [270], hidrogelurile sunt destul de asemănătoare cu țesuturile naturale vii, ceea ce le face utile pentru o gamă largă de aplicații biomedicale [144],: sisteme de eliberare controlată de medicamente [271], inginerie tisulară [220], lentile de contact [227], implanturi corneene [218], acoperiri sintetice pentru îngrijirea plăgilor [234], biosenzori [272], materiale dentare, implanturi, sisteme injectabile polimerice, organe de tip hibrid (încapsulare celule vii) [233].

Astfel de hidrogeluri au fost deja raportate folosind dextran, hialuronan, pululan sau alți derivați de polizaharide. Gelurile care conțin hialuronan pot fi folosite ca pansamente pentru răni, proteze de acoperire, aplicații ortopedice, sau agenți de hidratare în compoziția produselor cosmetice [216]. O serie de studii clinice care folosesc chitosan au raportat utilizarea hidrogelurilor sub formă de celule „scaffold” în cadrul ingineriei tisulare, și de asemenea, în regenerarea cartilajului. Datorită activităților sale imunostimulatoare, acțiunilor antimicrobiene și antifungice, proprietăților anticoagulante și datorită acțiunii sale ca promotor de vindecare a rănilor, în domeniul chirurgiei, hidrogelurile pe bază de chitosan au fost folosite pe scară largă ca un biomaterial [222].

Capitolul III. Materiale și metode

III.1. Materiale și reactivi utilizați

Materialele folosite pentru realizarea lucrării de față au fost achiziționate de la firme specializate în producerea lor. În ceea ce urmează se vor prezenta câteva din cele mai importante materiale folosite pentru atingerea scopurilor propuse.

Atelocolagenul – drept sursă tisulară în obținerea soluției de atelocolagen s-a utilizat tendonul de bovine tinere.

Pentru a obține soluția standard de atelocolagen cu un conținut în substanță uscată de 1 g/L, soluția coloidală inițială a fost supusă diafiltrării cu unsprezece volume de HCl 0,001 N la temperatura de 15 °C (pentru eliminarea completă a sărurilor) fiind apoi supusă liofilizării. Forma solidă obținută a fost redizolvată în HCl 0,001 N și centrifugată timp de 30 de minute la temperatura de 4 °C la o viteză de 3600 rotații/minut. Supernatantul a fost recuperat și ultrafiltrat printr-o membrană de 100 kDa, iar apoi diafiltrat împotriva a unsprezece volume de HCl 0,001 N la 15 °C. În final, soluția coloidală de atelocolagen a fost concentrat la 1 g/L substanță uscată, prin ultrafiltrare, printr-o membrană de 100 kDa.

1,4-butandiol diglicidil eter ($C_{10}H_{18}O_4$, Masa moleculară=202,25052 g/mol) obținut de la firma Sigma, CAS 2425-79-8 (figura 38).

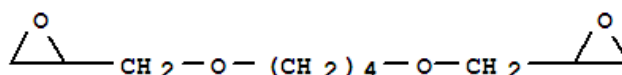


Figura 38. Formula structurală a reticulantului.

Compușii epoxidici au fost utilizați pe scară largă în ultimul deceniu pentru stabilizarea materialelor pe bază de collagen. Reacția collagenului cu compusul dioxiranic se realizează în principal prin intermediul grupărilor amino, în mediu bazic, așa cum se arată în figura 39 (a) [292]. În mediu acid collagenul reacționează cu reticulantul prin intermediul grupărilor carboxil (figura 39 (b)) cu formarea de legături esterice, deoarece în aceste condiții de pH grupările amino sunt protonate [293].

Figura 39. Reprezentarea schematică a reacției de reticulare dintre 1,4-butandiol diglicidileter cu collagenul, în mediu bazic (a) și mediu acid (b).

Hialuronanul (acid hialuronic, HA)

Hialuronanul este o polizaharida liniară cu masă moleculară ridicată, unitățile repetitive din structura macromoleculelor constând din acid D-glucuronic și N-acetil-D-glucosamină legate alternativ prin punți β -(1 $\rightarrow$ 3) și β -(1 $\rightarrow$ 4) glicozidice (figura 40). Alte caracteristici importante ale acidului hialuronic au fost prezentate în Capitolul I.2.2.2.

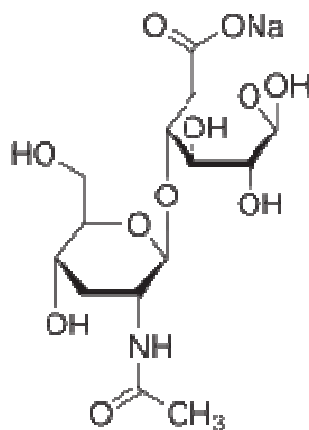


Figura 40. Formula structurală a hialuronanului de sodiu.

Acidul hialuronic a fost achiziționat de la firma Sigma ($C_{14}H_{20}NNaO_{11}$, CAS: 9067-32-7, masa moleculară: 403,31 g/mol) sub formă de sare de sodiu a acidului hialuronic.

Înainte de a fi utilizat, acesta a fost dizolvat lent în apă bidistilată la temperatura camerei, iar soluția rezultată a fost supusă filtrării printr-o membrană de ultrafiltrare de 0,2 microni, după care a fost diafiltrată împotriva a cinci volume de apă bidistilată. Soluția diluată a fost înghețată și liofilizată, iar pulberea rezultată a fost redizolvată în apă bidistilată, apoi supusă ultrafiltrării printr-o membrană de 100 kDa, urmată de o diafiltrare împotriva a unsprezece volume de apă bidistilată. Soluția finală a fost centrifugată timp de 30 de minute la 3600 rotații/min, iar supernatantul a fost concentrat până la o concentrație de 1 g/L substanță uscată prin ultrafiltrare printr-o membrană de 100 kDa. Masa moleculară echivalentă a hialuronatului în soluția finală a fost determinată prin SEC (M_w 1303 kg/mol, indice de polidispersitate de 1,96).

Gelanul

Gelanul (figura 41) este o heteropolizaharidă extracelulară produsă de *Pseudomonas elodea*. Unitatea repetitivă din structura macromoleculelor conține patru unități zaharidice (glucoză - acid glucuronic - glucoză - ramnoză). Alte caracteristici importante ale gelanului au fost prezentate în Capitolul I.2.2.4.

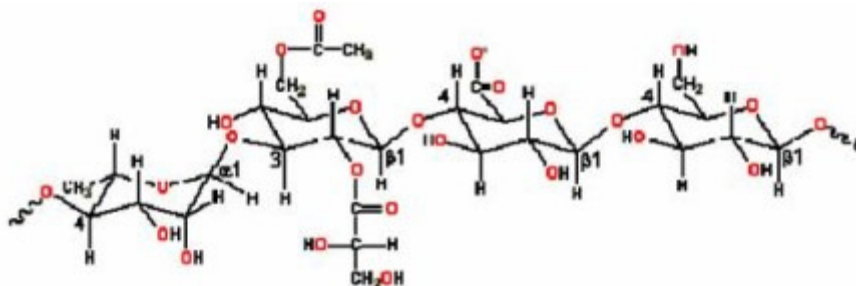


Figura 41. Formula structurală a gelanului.

Achiziționarea gelanului s-a făcut de la firma Fluka, CAS 71010-52-1.

Înainte de utilizare, gelanul a fost dizolvat în apă bidistilată, pe baie de apă fierbinte, iar soluția diluată a fost răcită la 25 °C. Soluția rezultată a fost filtrată printr-o membrană de ultrafiltrare cu porozitate de 0,2 microni, după care a fost supusă diafiltrării împotriva a

unsprezece volume de soluție de trietilamină în apă bidistilată de 12,5% g/L. Soluția rezultată a fost uscată prin liofilizare, iar forma solidă obținută a fost dizolvată încet în apă bidistilată la 25°C, pentru a obține un sistem coloidal. După centrifugare timp de 30 de minute la 3600 rotații/min, supernatantul a fost ultrafiltrat printr-o membrană de 100 kDa, și apoi diafiltrat împotriva a unsprezece volume de apă bidistilată, la 25 °C. Soluția obținută a fost centrifugată din nou în aceleași condiții, iar supernatantul a fost în cele din urmă concentrat la 1 g/L substanță uscată, prin ultrafiltrare printr-o membrană de 100 kDa. Masa moleculară echivalentă a gelanului nativ în soluția finală a fost determinată prin SEC (M_w 3428 kg/mol prin extrapolare, cu un indice de polidispersitate de 1,79).

Procesele de ultrafiltrare și diafiltrare au fost efectuate prin regimul de curgere tangențial, folosind un sistem Vivaflow 200 (Sartorius).

III.3. Obținerea de hidrogeluri pe bază de collagen și collagen-polizaharide

În vederea obținerii hidrogelurilor, soluția de atelocollagen cu concentrația de 6 mg/mL se prepară din collagen liofilizat, prin dizolvarea acestuia în soluție 0,1 M NaOH, adăugată în picături, urmărindu-se ca pH-ul soluției să se situeze în jurul valorii de 10,2. Soluția de atelocollagen se introduce apoi în sistemul de seringi S1-S2 și se pompează alternativ, energic, de circa 20-30 de ori (instalația utilizată se prezintă în figura 50). Prin intermediul seringii S3, în sistem se introduce agentul de reticulare, format prin amestecarea 1,4-butandiol diglicidil eterului cu un tensioactiv cationic, bromura de tetrabutil amoniu. Seringile transportoare sunt legate prin intermediul unui tub care este imersat într-o baie de apă cu gheață, pentru a proteja gruparea oxiranică (epoxi), a cărei reactivitate crește mult odată cu temperatura. Lucrul la temperaturi joase asigură reacția lentă a ciclului oxiranic cu grupările aminici și acide laterale, conducând la o mai bună uniformitate a hidrogelului obținut. Amestecul format este apoi extras din sistemul de pompare – dozare prin intermediul seringii S4 și este termostatat, timp de 90 de minute, la temperatura de 32 °C, după care se menține în frigider, peste noapte (circa 12 ore).

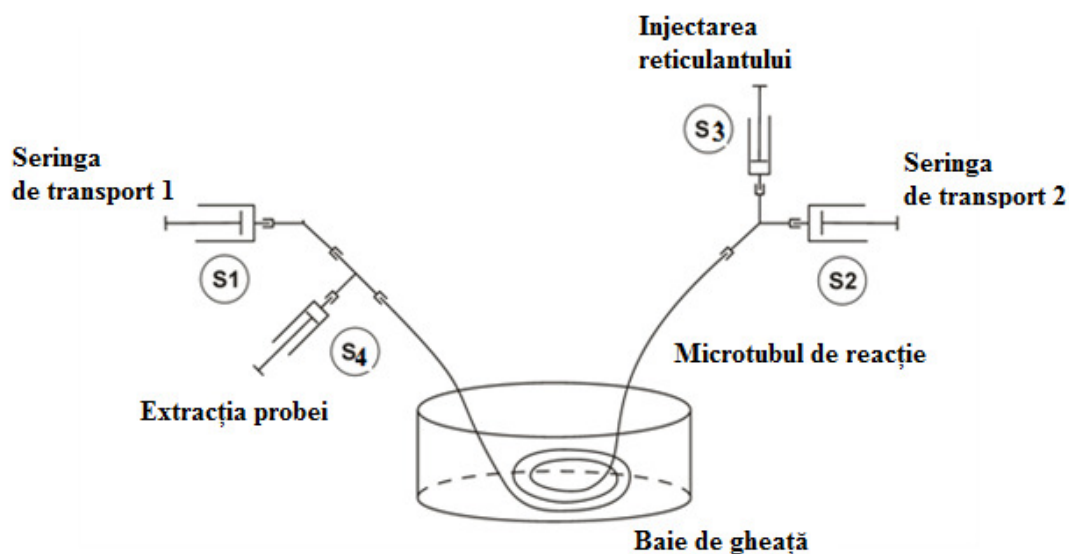


Figura 50. Sistemul de pompare – dozare utilizat pentru prepararea hidrogelurilor.

În vederea obținerii hidrogelurilor binare, atelocolagen și hialuronat de sodiu, s-a preparat o soluție coloidală de atelocolagen cu aceleași caracteristici ca și în cazul hidrogelurilor pe bază de collagen. Peste soluția astfel preparată se presară o cantitate de hialuronat, iar sistemul se lasă să se umecteze uniform. După completa umectare a hialuronatului, compoziția se amestecă lent, evitând formarea bulelor de aer. Amestecul rezultat se lasă spre maturare timp de 3 ore, la 4 °C, după care este introdus în sistemul de seringi S₁-S₂ și se aplică apoi metodologia de amestecare și reticulare descrisă pentru obținerea hidrogelurilor atelocolagenice.

III.4. Metode de caracterizare a hidrogelurilor obținute

Hidrogelurile obținute au fost caracterizate din punct de vedere fizico-chimic utilizând următoarele metode:

- III.4.1. Gradul maxim de umflare - $Q_{\max}$ (%)
- III.4.2. Capacitatea de încărcare a hidrogelurilor cu medicament
- III.4.3. Capacitatea de eliberare a unui medicament
- III.4.4. Microscopia Electronică de baleaj (Scanning Electron Microscopy, SEM)
- III.4.5. Analiza termică
 - III.4.5.1. Calorimetria cu scanare diferențială
 - III.4.5.2. Analiza termogravimetrică
- III.4.6. Teste de biocompatibilitate
- III.4.7. Spectroscopia RAMAN
- III.4.8. Rezonanța electromagnetică nucleară (¹H-RMN)
- III.4.9. Studiul reologic al soluțiilor de collagen și polizaharide și al hidrogelurilor obținute
 - III.4.9.1. Studiul reologic al soluțiilor diluate de collagen și polizaharide
 - III.4.9.2. Studiul reologic al hidrogelurilor obținute pe bază de collagen și polizaharide
- III.4.10. Studiul echilibrelor de fază în soluțiile de collagen și polizaharide
 - III.4.10.1. Evaluarea turbidimetrică a compatibilității
 - III.4.10.2. Trasarea diagramelor de fază

Capitolul IV. Obținerea amestecurilor reproductibile de atelocolagen și polizaharide

În scopul de a prepara amestecuri stabile și reproductibile pe termen lung, atât rețetele cât și procedurile de pregătire a amestecurilor diluate inițiale trebuie să fie studiate. În ceea ce urmează voi prezenta câteva tehnici care să furnizeze condițiile de formare a amestecurilor, precum și parametrii de lucru ai acestor procese.

Reproductibilitatea reprezintă una dintre principalele probleme în inginerie. În cazul special al biomaterialelor și „scaffold”, aceasta asigură reactivitatea reproductibilă și morfologia internă, deținând un loc important în agenda cercetărilor. Biomateriale sintetice oferă capacitatea de a proiecta în mod riguros și *ex-vivo* substraturi care să prezinte proprietăți reproductibile fizico-chimice și structurale [306], dar asemănările cu matricea extracelulară naturală este încă modestă în comparație cu materialele de origine biologică. Acesta este motivul pentru care biopolimerii naturali care poartă domenii de celule de recunoaștere sunt preferați [307]; colagenul fibrilar fiind unul dintre ele [308]. Un important dezavantaj al biopolimerilor naturali (în special proteine, polizaharide și conjugății acestora), constă în compatibilitatea reciprocă limitată în amestecurile apoase coloidale, peste o anumită concentrație. Fie separarea segregativă sau asociativă are loc într-un mod necontrolat, din cauza incompatibilității termodinamice, sau a procesului de coacervare condusă electrostatic [178]. Ca o consecință, reproductibilitatea caracteristicilor de compoziție ale amestecurilor de biopolimeri naturali și previzibilitatea acestor caracteristici trebuie să fie investigată, înainte de a efectua studii asupra dispersiilor coloidale, amestecurilor sau compozitelor formate.

Scopul a fost descrierea unui set de tehnici simple, în măsură să furnizeze rapoartele de greutate posibile de biopolimeri naturali care pot fi amestecați, împreună cu parametrii de amestecare, pentru de a asigura un amestec intim și reproductibil, înainte de orice prelucrare ulterioară a amestecurilor. Obiectivul pragmatic a fost obținerea amestecurilor fluide stabile pe termen lung ale unei scleroproteine cvasi-native, atelocolagenul (aK), împreună cu două tipuri de polizaharide: sarea de sodiu a acidului hialuronic (NaHyal), și gelanul nativ (Gellan).

IV.1. Investigarea turbidimetrică a soluțiilor coloidale de biopolimeri naturali

Primul pas în îndeplinirea primului obiectiv propus a fost investigarea turbidimetrică a soluțiilor coloidale de biopolimeri naturali. În soluții coloidale apoase, biopolimerii (atelocolagen, hialuronat de sodiu și gelan) prezintă atât auto-cât și inter-asocieri la nivel molecular, datorită modificărilor de temperatură, pH și compoziție chimică [131, 312, 313]. Atunci când, ca o consecință a asocierii, structurile supramoleculare precise sunt generate, procesul poartă denumirea de auto-asamblare [314], în timp ce în cazul în care apar structuri aleatorii, acest proces este numit complexare [314–316]. Procesele de agregare pot fi investigate prin măsurători turbidimetrice, sau prin absorbția luminii la lungimi de undă specifice [317].

Aceste studii s-au realizat prin titrare turbidimetrică a soluțiilor de atelocolagen, hialuronat de sodiu și gelan standardizate. Toate determinările s-au realizat la temperatura camerei cu ajutorul unui titrator automat (DMS Titrino716, Metrohm) și un turbidimetru cu fibră optică (PC 900, Brinkmann). Pentru procesul de titrare s-au folosit soluții de hidroxid de sodiu și acid clorhidric 0,1N pornind de la pH-ul soluției coloidale până la pH 2 și respectiv 12.

În figura 62 sunt prezentate curbele de titrare turbidimetrică pentru biopolimerii studiați atât în mediu acid cât și în cel bazic.

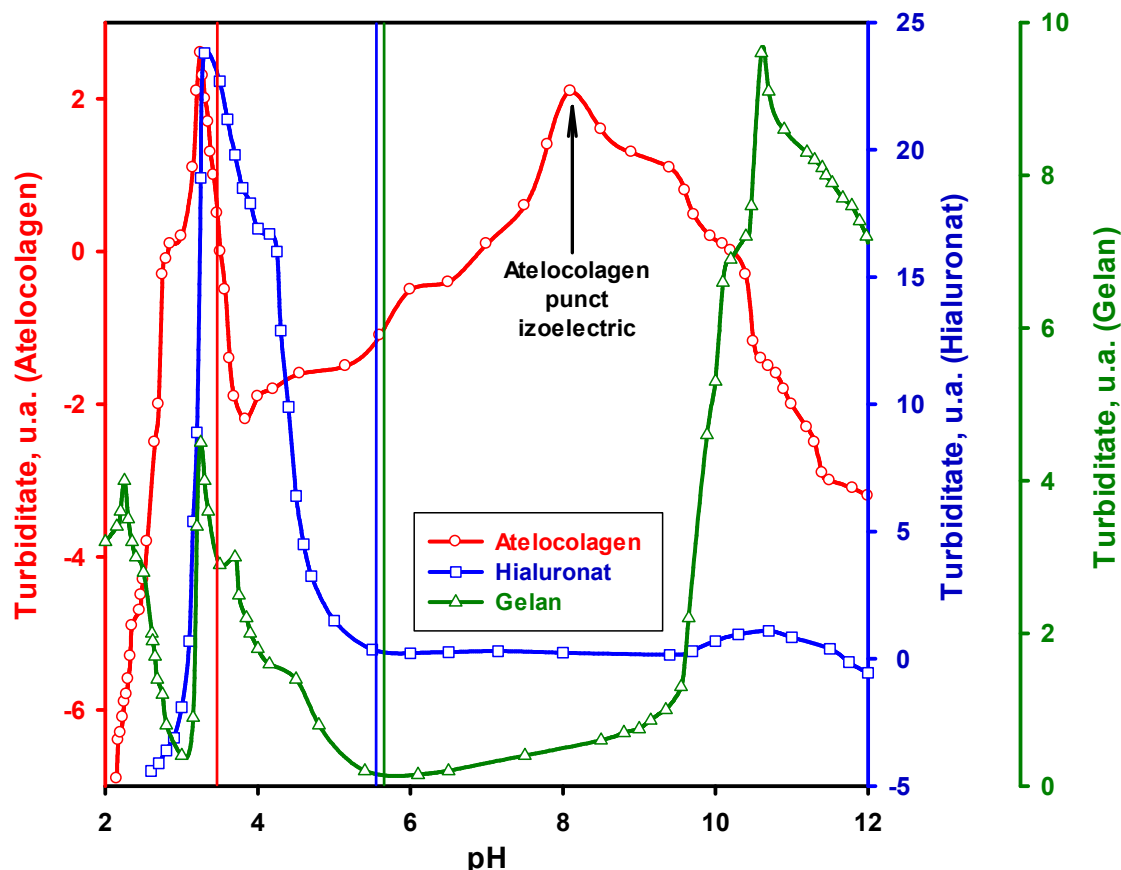


Figura 62. Reprezentarea curbelor de titrare pentru atelocolagen, hialuronat de sodiu și gelan. Liniile verticale reprezintă valoarea inițială a pH-ului fiecărei soluții.

Amplitudinea variațiilor de turbiditate diferă în mod semnificativ între cei trei biopolimeri naturali studiați. O creștere importantă a fost înregistrată în cazul hialuronatului de sodiu, în jurul valorii de pH=4. În schimb, atelocolagenul prezintă o evoluție așteptată de turbiditate, creșterile fiind asociate cu domeniile de pH cu solubilitate scăzută (cum ar fi gama izoelectrică). Surprinzător, trei domenii de creștere au fost puse în evidență în evoluția turbidimetrică a soluției de gelan în timpul titrării. Această ultimă observație ar putea fi asociată modurilor diferite de împachetare a lanțurilor de gelan nativ, în corelație directă cu gradul de hidratare a agregatelor.

În scopul de a asigura un amestec intim al atelocolagenului cu hialuronatul de sodiu și/sau gelan, trebuie să fie alese domeniile de pH care prezintă atât solubilitate individuală mare cât și solubilitate reciprocă corelată.

Gelanul este componenta care impune cele mai mari constrângeri, având în vedere intervalul de solubilitate limitat (acesta este solubil la valori ale pH-ului mai mari de 5, în apă bidistilată sau în tamponate organice, dar nu în tamponate salin). Domeniile excesive de gelificare ale gelanului (deasupra valorii de pH 10) trebuie să fie, de asemenea, evitate.

Comparând curbele de titrare reprezentate în figura 62, se constată că, gama de pH cuprinsă între 5 și 9 pare a fi cea mai fezabilă. Datorită faptului că în apropierea punctului izoelectric al atelocolagenului procesul de auto-asociere poate fi promovat, domeniul de pH cuprins între 8 până la 9 rămâne a fi cel mai fezabil, dacă se dorește ca în produsul final să se obțină o morfologie fibrilară.

IV.2. Studiul reologic asupra soluțiilor diluate de biopolimeri naturali

Un al doilea pas a fost studiul reologic asupra soluțiilor diluate de biopolimeri naturali, cu scopul de a determina domeniul de concentrație fezabil amestecării acestora.

Măsurătorile vâscozimetrice s-au efectuat utilizând vâscozimetrul Ubbelohde (figura 59) tipurile 0A, Ia, IIa și III (cu un volum de $7,7 \pm 0,1$ mL și cu o lungime a capilarului de 90 mm), plasat în baie de termostatare, la diferite temperaturi, menținute constante pe toată durata măsurătorii. Timpii de scurgere ai soluțiilor au fost determinați, de fiecare dată, după 10 minute de termostatare.

Pentru aceste determinări s-au preparat soluții stoc cu o concentrație de 0,40 g/dl pornind de la soluțiile standardizate de atelocolagen, hialuronat de sodiu și gelan, utilizându-se pentru aceste măsurători o serie de diluții de 0,32, 0,26, 0,22, 0,18, 0,14, 0,10, 0,06, 0,02, 0,01 g/dl preparate prin adăugare de apă bidistilată. Toate soluțiile diluate au fost supuse maturării timp de 12 ore, la 2 °C, după care au fost separate și supuse termostatării la temperatura de 15 °C. Măsurătorile s-au realizat la temperaturile de 17, 20, 25, 30 și 35 °C. Pentru soluțiile de atelocolagen diluate, măsurătorile au fost realizate și la 40 °C, pentru a pune în evidență efectul de denaturare termică.

Figurile 70 și 71 identifică și precizează intervalele de concentrații fezabile care asigură amestecarea favorabilă a atelocolagenului cu hialuronat de sodiu sau gelan.

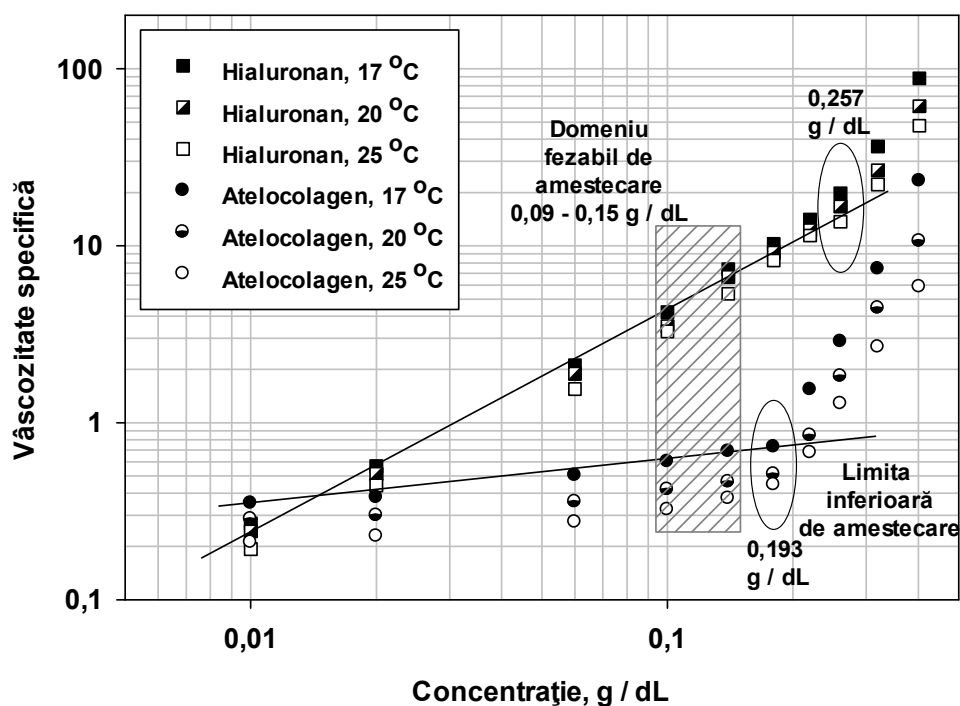


Figura 70. Domeniul de concentrație fezabil pentru amestecarea omogenă a soluțiilor de atelocolagen și hialuronat de sodiu.

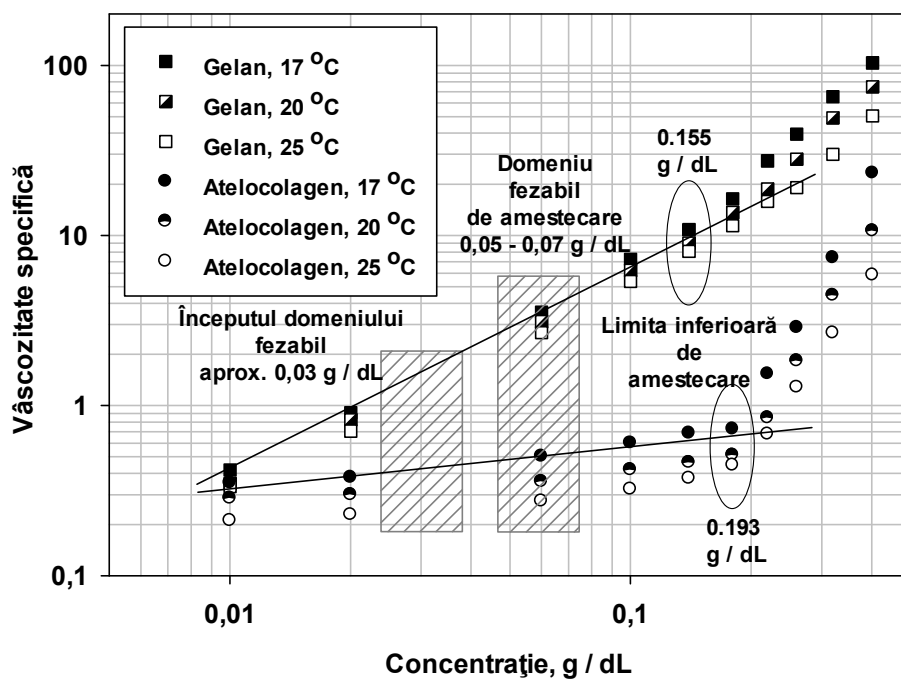


Figura 71. Domeniul de concentrație fezabil pentru amestecarea omogenă a soluțiilor de atelocolagen și gelan.

Din reprezentările grafice se poate observa că cel mai reproductibil interval de amestecare în cazul atelocolagenului cu hialuronatul de sodiu este cuprins între 0,09–0,15 g/dl, iar pentru atelocolagen și gelan de 0,05–0,07 d/dl.

Tot prin studii reologice au fost estimate și conformația lanțurilor macromoleculare și rigiditatea acestora [319]. Figura 66 prezintă comparativ dependența vâscozității intrinseci în funcție de temperatură. Sistemul de coordonate folosit ($\ln[\eta]$ față de $1/T$), permite estimarea flexibilității lanțurilor de macromolecule pe diferite intervale de temperatură [320].

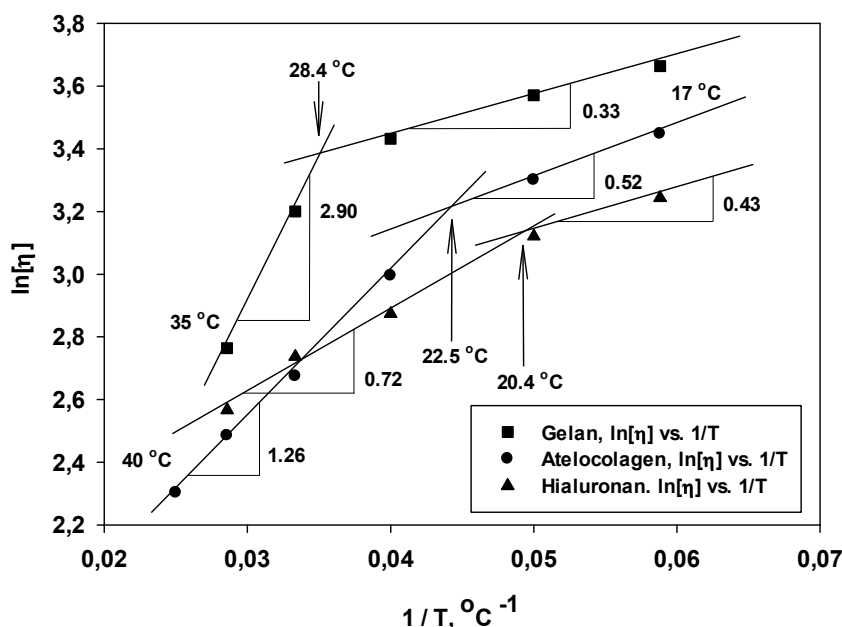


Figura 66. Variația $\ln[\eta]$ pentru soluțiile diluate de atelocolagen, hialuronat de sodiu și gelan în funcție de temperatură.

Panta liniilor poate fi corelată cu flexibilitatea macromoleculelor de atelocolagen, hialuronat de sodiu și gelan în soluțiile coloidale diluate, la o temperatură dată. Pantele mari corespund lanțurilor mai flexibile. Două domenii diferite de flexibilitate sunt evidente, pragul mediu fiind diferit pentru cei trei biopolimeri investigați. Gelanul prezintă cea mai mare discrepanță (pentru o pantă normală de 0,33, la temperaturi sub 28 °C la una de 2,9 la temperaturi deasupra pragului; o creștere de aproximativ nouă ori). Hialuronatul de sodiu prezintă cea mai mică variație a flexibilității lanțurilor în funcție de temperatură (o creștere de aproximativ 1,7 ori, în jurul valorii de 20 °C), în timp ce atelocolagenul este plasat într-o gamă intermediară de 2,4 ori, cu un prag în jurul valorii de 22 °C.

Pentru a obține amestecuri intime în stare coloidală, flexibilitatea lanțurilor macromoleculelor componentelor trebuie să fie cât mai asemănătoare cu puțință, și variația în funcție de temperatură trebuie să fie, de asemenea, similară. Acesta este motivul pentru care, în cazul amestecurilor de atelocolagen cu hialuronat de sodiu și/sau gelan, temperatura de lucru ar trebui să fie menținută într-un domeniu mai mic de 20 °C.

IV.3. Diagramele de fază binare dintre atelocolagen și hialuronat sau gelan

Plecând de la informațiile obținute în studiile anterioare, următorul pas important a fost trasarea diagramelor de fază. Aceste diagrame de fază sunt utile pentru a descrie grafic "soarta" amestecurilor, prin furnizarea gamei de concentrații a componentelor care generează sisteme

stabile termodinamic și fizic omogene, sau, dimpotrivă, prezintă separări, ca fază sau compoziție. Suplimentar, acestea oferă informații valoroase cu privire la compozițiile specifice și raportul de separare a componentelor din care rezultă sistemele eterogene.

În cazul studiului nostru, s-au efectuat trei tipuri de experimente, diferite din punct de vedere a manipulării pH-ului în timpul pregătirii amestecurilor, astfel:

1. în lipsa unui reglator de pH (acesta fiind impus de disocierea atelocolagenului, hialuronatului de sodiu și gelanului) și adăugarea unei cantități mică de sare (NaCl) pentru a furniza contraioni;
2. prin ajustarea pH-ului soluțiilor la valoarea apei bidistilate, înainte de a fi amestecate;
3. prin dizolvarea fiecărei componente a amestecului într-o soluție tampon la o valoare a pH-ului care asigură un domeniu comun de solubilitate și cu o tendință de aglomerare mică (stabilit anterior prin turbidimetrie).

Amestecurile de atelocolagen și hialuronat de sodiu sau gelan au fost realizate în tuburi de centrifugare cu o greutate totală a sistemului de 5 g. O soluție de 10 g/dl NaCl, sau apă bidistilată, sau o soluție tampon (în funcție de tipul de experiment), este adăugată într-o sumă echivalentă cu 0,01% g/g, referitoare la greutatea totală a sistemului. După amestecare adecvată, sistemul obținut este maturat timp de 18 ore (6 ore la temperatura camerei, și de 12 ore la 2 °C), apoi supus centrifugării (4000 rotații/min, 30 min, 4 °C), recuperându-se supernatantul. Atelocolagenul și polizaharidele au fost determinate cantitativ.

Cantitățile biopolimerilor naturali au fost evaluate spectrofotometric, folosind kitul Sircol (Biocolor Ltd.), în cazul atelocolagenului; prin metoda cu carbazol pentru hialuronatul de sodiu, și folosind kitul Blyscan (Biocolor Ltd.) în cazul gelanului. În cazul atelocolagenului și al gelanului lungimile de undă folosite au fost de 540 și respectiv 656 nm. În cazul hialuronatului de sodiu, deoarece metoda cu carbazol necesită soluții de acide, măsurătorile au fost realizate cu ajutorul unui spectrofotometru Boeco S22, în cuve de unică folosință, la lungimea de undă de 530 nm.

Regulile după care s-au preparat aceste amestecuri binare sunt prezentate în ecuațiile următoare:

$$x \text{ Atelocolagen} + y \text{ Polizaharide} + 0,01 \text{ Sare} = z + 0,01 \text{ Sare} = \text{max. } 0,1 \text{ g/g substanță uscată} \quad (13)$$

$$q \text{ Atelocolagen} + p \text{ Polizaharide} + 0,01 \text{ Sare} = z \text{ g/g substanță uscată} \quad (14)$$

$$x \text{ Atelocolagen} + y \text{ Polizaharide} + 0,01 \text{ Solvent} = z + 0,01 \text{ Solvent} = \text{max. } 0,1 \text{ g/g substanță uscată} \quad (13')$$

$$q \text{ Atelocolagen} + p \text{ Polizaharide} + 0,01 \text{ Solvent} = z \text{ g/g substanță uscată} \quad (14')$$

În figurile 74, 75 și 76 sunt prezentate diagramele de fază obținute în abordările experimentale de succes. Poziția punctelor de testare folosite pentru a trasa linii de legătură au

fost stabilite luând în considerare curba binodală. Liniile de legătură care definesc punctele rezultă din analiza fazelelor separate din amestecuri preparate pe baza relațiilor (14) și (14'), ce confirmă curbele binodale trase pe baza regulilor generate de relațiile (13) și (13').

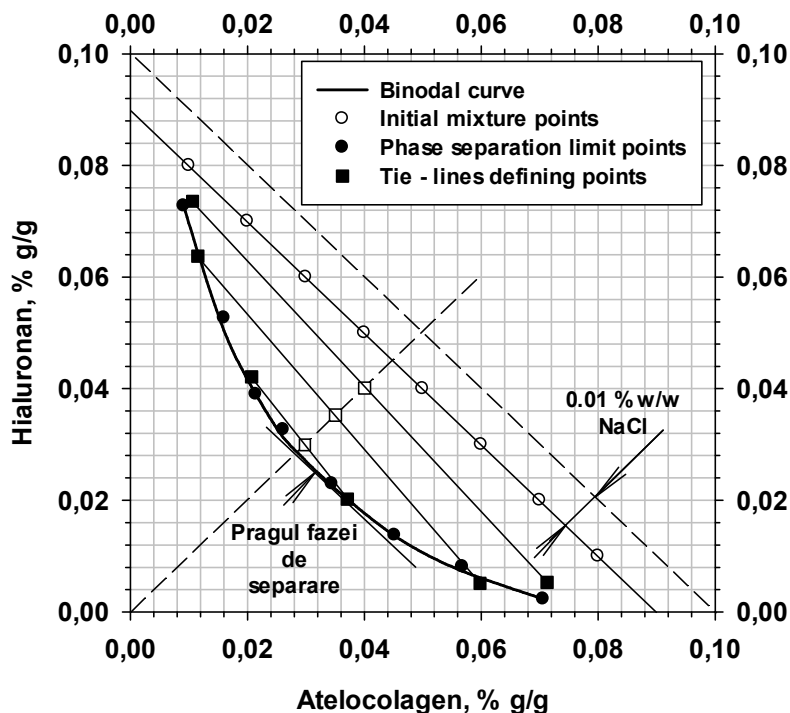


Figura 74. Diagrama de fază a amestecului atelocolagen–hialuronat de sodiu, la pH de 3,4, în lipsa sistemului tampon.

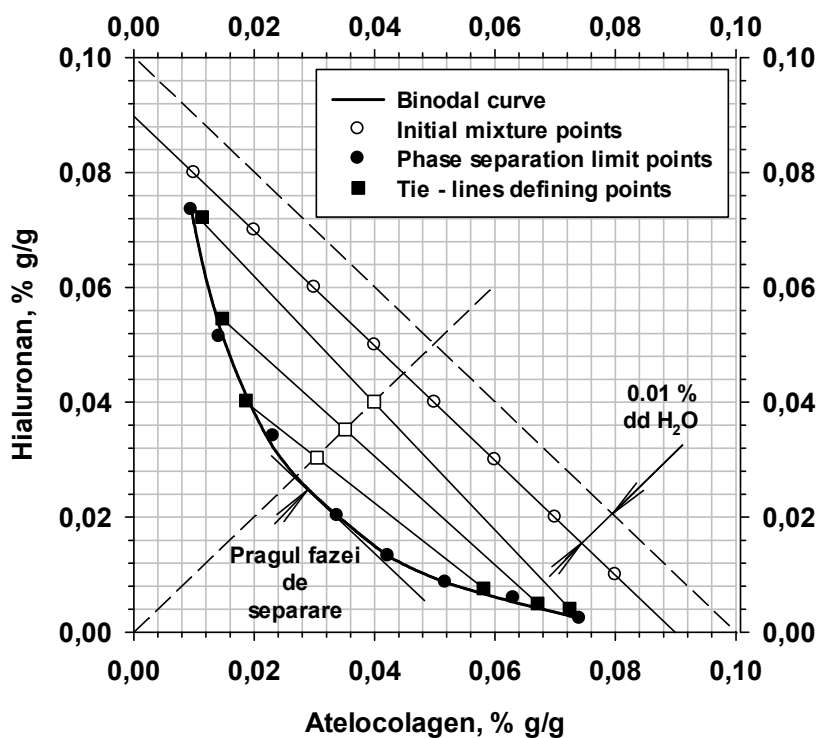


Figura 75. Diagrama de fază a amestecului atelocolagen–hialuronat de sodiu, la pH de 5,5, în lipsa sistemului tampon, cu pH-ul soluției de atelocolagen corectat la valoarea de 5,5 înainte de amestecare.

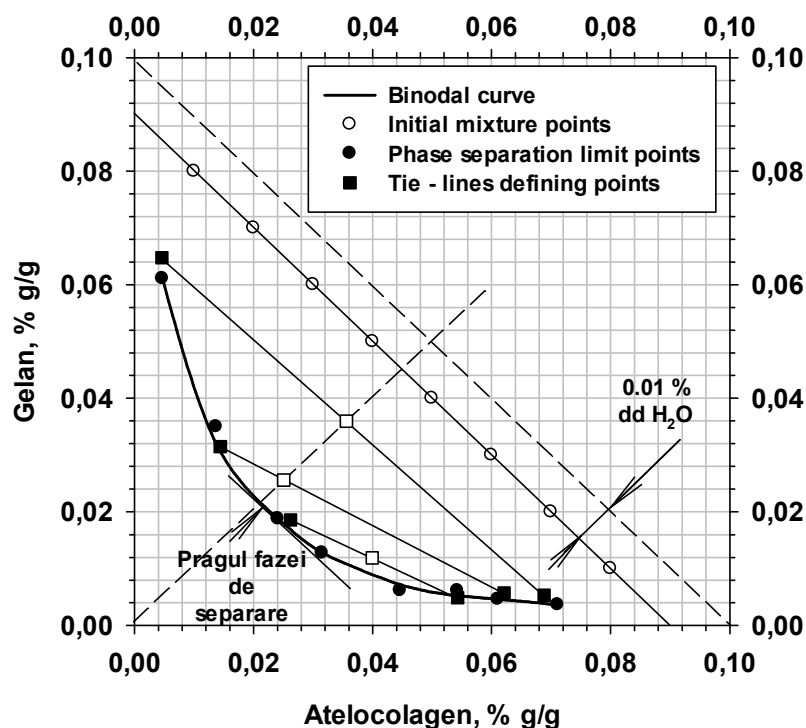


Figura 76. Diagrama de fază a amestecului atelocolagen–gelan, la pH de 5,5, în lipsa sistemului tampon, cu pH-ul soluției de atelocolagen corectat la valoarea de 5,5 înainte de amestecare.

Asimetria binodală poate fi corelată cu diferențele dintre hidrofilia componentelor individuale [325]. Deosebirea perechii atelocolagen–gelan pare să fie mai mare în comparație cu perechea atelocolagen–hialuronat de sodiu, gelanul fiind cel mai receptiv la apă. Maxima de co-solubilitate a partenerilor amestecurilor poate fi stabilită prin plasarea pragului de separare a fazelor pe diagrama de fază [326], care corespunde concentrației totale minime de parteneri necesari pentru separarea fazelor. Coordonatele punctelor de prag de pe diagramele de fază ale amestecurilor investigate au fost: 0,032% g/g atelocolagen / 0,025% g/g hialuronat de sodiu în figura 74, 0,028% g/g atelocolagen / 0,025% g/g hialuronat de sodiu în figura 75, și 0,022% g/g atelocolagen / 0,020% g/g gelan în figura 76.

Cele trei tipuri de experimente efectuate au arătat că valori mici nerestricționate ale pH-ului, precum și valori mari ale soluțiilor tampon, sunt capabile să inducă gelifierea în amestecurile studiate, mai ales dacă gelanul este una dintre componente. Potrivit referinței [327], "echilibru dintre faze nu este realizabil atunci când faza de separare este însoțită de gelifiere". Acesta este motivul pentru care ambele rețete (definirea rapoartelor inițiale ale componentelor), precum și procedurile de pregătire (constând în parametrii de amestecare), sunt critice în pregătirea amestecurilor omogene și compozițional reproductibile de atelocolagen cu hialuronat sau gelan.

IV.4. Diagramele ternare ale amestecurilor de atelocolagen, hialuronat de sodiu și gelan

Având în vedere dificultățile întâmpinate în caracterizarea amestecurilor binare, pentru amestecurile de atelocolagen–hialuronat–gelan, au fost studiate diagrame ternare de compoziție obișnuite ale amestecurilor. Aceste diagrame au fost trasate pe baza ecuației 15:

$$x \text{ Atelocolagen} + y \text{ Hialuronat} + z \text{ Gelan} + 0,02 \text{ Solvent} = 0,1 \text{ g/g substanță uscată} \quad (15)$$

unde, valoarea coeficientului x variază între 0,00 și 0,06% g/g substanță uscată, și valorile coeficienților y și z între 0,01 și 0,07 % g/g substanță uscată.

În figurile 78 și 79 sunt reprezentate diagramele ternare pentru amestecurile atelocolagen-hialuronat-gelan.

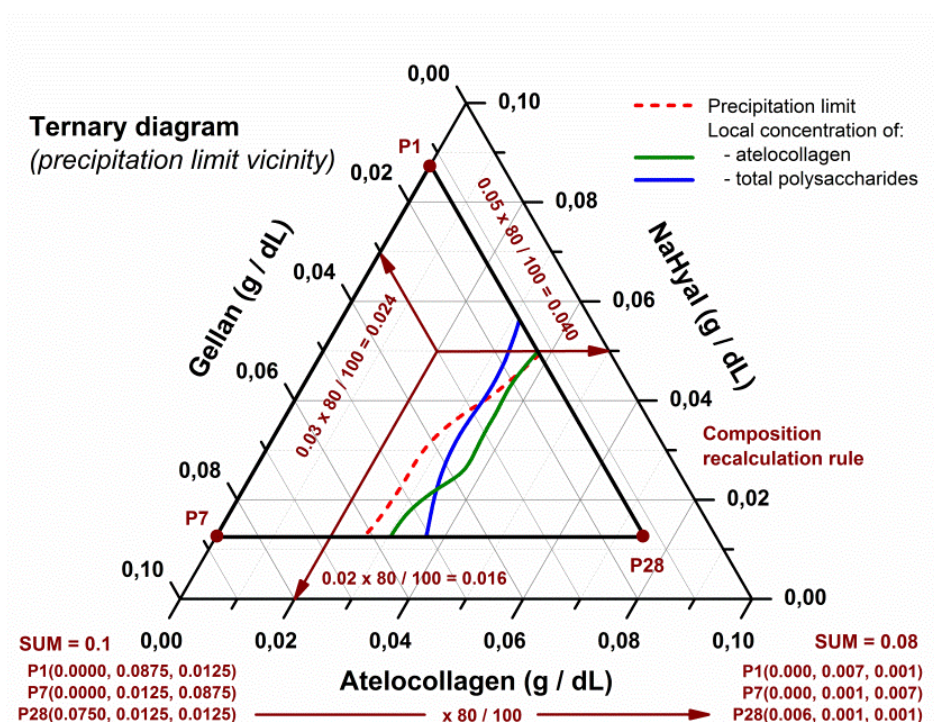


Figura 78. Diagrama ternară exprimă consecințele separării fazelor în amestecurile de biopolimer, la pH 5,5, în lipsa sistemului tampon, cu pH-ul soluției de atelocolagen corectat la 5,5 înainte de amestecare.

de atelocolagen). Potrivit figurii 78, sisteme ternare pot fi obținute pornind de la 0,032 g/dl atelocolagen, asociat în amestecurile inițiale, cu, de exemplu, 0,040 g/dl hialuronat de sodiu, și 0,008 g/dl gelan, pentru a ajunge la o concentrație de 0,08 g/dl substanță uscată, așa cum se prevede prin restricția (15).

Capitolul V. Hidrogeluri cu componentă colagenică reticulate covalent

Deși tentant în termeni de disponibilitate, reproductibilitate, precum și a capacității de a fi proiectate chimic, polimerii sintetici sunt încă limitați în aplicarea lor în domeniul “scaffold”. În schimb, biomacromoleculele sunt tot mai preferate pentru a genera matrici extracelulare (MEC) înlocuitoare [328], mai ales pentru că sunt purtători nativi de domenii de recunoaștere, care ghidează viața și evoluția celulelor.

Esențial în ingineria tisulară este de a imita treptat chemo-, morfo-și bio-particularitățile matricii extracelulare. Pentru a oferi un nivel ridicat de chemo-mimetism, este de dorit ca pentru realizarea rețelelor “scaffold” să se utilizeze biomacromolecule native organotipice, precum și, dacă este cazul, utilizarea unor cantități cât mai scăzute de polimeri sintetici.

Scleroproteinele și glicanii sunt candidatele preferate în producerea de înlocuitori ai MEC de tip conjugat [329], mai ales dacă reticulantul este o moleculă bifuncțională cu catenă scurtă. Două biomacromolecule precursorare, atelocolagenul (aK) și hialuronatul de sodiu (NaHyal), ambele în stare cvasi-nativă, posed o serie de particularități care le fac candidatele ideale pentru mimarea MEC. Atelocolagenul prezintă domenii de recunoaștere a celulelor, GFOGER [330, 331], și este singura formă colagenică disponibilă în cantități suficient de mari. Acidul hialuronic este omniprezent în țesuturile conjunctive animale, este implicat în homeostazia apei la nivelul MEC [332], și acționează atât în calitate de moleculă structurală cât și de semnalizare [333].

V.2. Studiul reologic asupra hidrogelurilor pe bază de collagen și collagen-hialuronat de sodiu reticulate covalent

Este bine cunoscut faptul că, mediile pentru dezvoltarea țesuturilor vii sunt de tip hidrogel, respectiv rețele tridimensionale laxe cu ochiuri mari, motiv pentru care ne-am propus reticularea hidrogelurilor pe bază de collagen și respectiv collagen și hialuronat de sodiu cu un agent de reticulare cu catenă suficient de lungă, biocompatibil, netoxic, respectiv 1,4-butanediol diglicidic eter (BDDGE). Acesta este un reticulant bifuncțional, capabil să “lucreze” la rapoarte molare mici [334] la temperaturi scăzute sau ambiantă. Pentru a ajuta dispersarea BDDGE în apă, la temperaturi scăzute, tetra-n-butil bromură de amoniu (TBAB) poate fi folosit ca agent tensioactiv.

Pentru realizarea acestor hidrogeluri s-a folosit metoda descrisă în Capitolul III.3. Chimismul reacției de obținere a hidrogelurilor pe bază de collagen și collagen-hialuronat de sodiu este prezentat în figura 81 și 82.

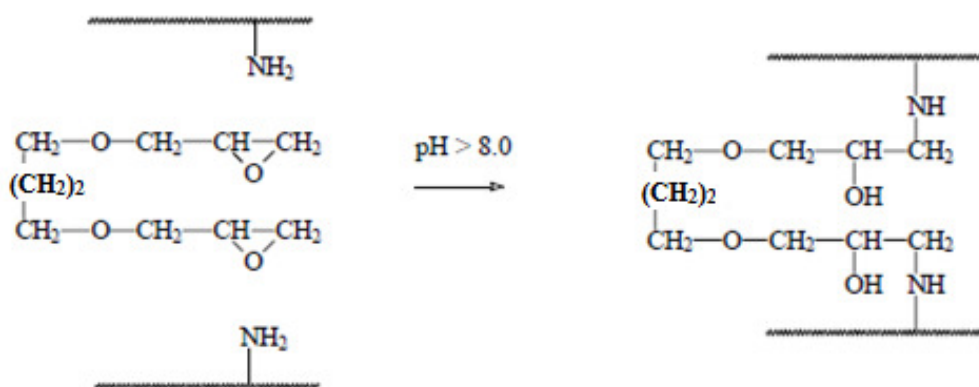


Figura 81. Schema reacției de formare a hidrogelurilor pe bază de collagen reticulate covalent.

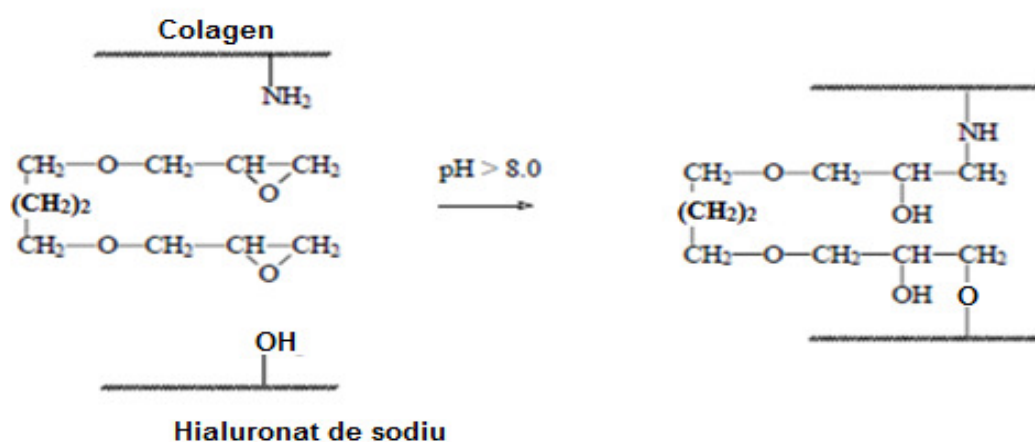


Figura 82. Schema reacției de formare a hidrogelurilor pe bază de collagen și hialuronat de sodiu reticulate covalent.

Planurile experimentale pentru obținerea hidrogelurilor reticulate covalent pe bază de collagen, collagen-hialuronat de sodiu raport 1:1 și collagen-hialuronat de sodiu raport 5:1 sunt prezentate în tabelele 7, 8 și 9. Cantitățile prezentate în tabele sunt calculate pentru 5 mL soluție de collagen de concentrație 6 mg/mL substanță uscată și $0,70 \pm 0,016$ moli/g grupe aminice libere. Pentru prepararea hidrogelurilor s-au folosit diferite rapoarte molare între agentul de reticulare și conținutul de grupări α -aminice libere pentru fiecare proba în parte. Amestecul de precursori și de reticulare a fost realizat pe baie de gheață (între 4 și 8 °C). Pentru a facilita o dispersie adecvată a BDDGE în amestecul vâscos de precursori, acesta a fost în primul rând dizolvat în 0,3 ml apă bidistilată, la 4°C, împreună cu 1:0,3 v/w TBAB.

Tabelul 7. Planul de lucru pentru obținerea hidrogelurilor reticulate covalent pe bază de collagen.

Cod probă	Raport molar α -NH ₂ :BDDGE	mg collagen liofilizat	μ L BDDGE	mg TBAB
P1-0	1:0	30	0	0
P1-1	1:0,25	30	4,25	2
P1-2	1:1	30	17,75	8
P1-3	1:2,5	30	45	8
P1-4	1:5	30	85,5	8

Tabelul 8. Planul de lucru pentru obținerea hidrogelurilor binare reticulate covalent pe bază de collagen și hialuronat de sodiu, raport molar 1:1.

Cod probă	Raport molar α -NH ₂ :BDDGE	mg collagen liofilizat	mg NaHyal	μ L DDGE	mg TBAB
P2-0	1:0	30	30	0	0
P2-1	1:0,25	30	30	6,5	3
P2-2	1:1	30	30	26,25	9
P2-3	1:2,5	30	30	66,25	9
P2-4	1:5	30	30	128	9

Tabelul 9. Planul de lucru pentru obținerea hidrogelurilor binare reticulate covalent pe bază de collagen și hialuronat de sodiu, raport molar 5:1.

Cod probă	Raport molar α -NH ₂ :BDDGE	mg collagen liofilizat	mg NaHyal	μ L BDDGE	mg TBAB
P3-0	1:0	30	6	0	0
P3-1	1:0,25	30	6	4,7	2
P3-2	1:1	30	6	19,5	8
P3-3	1:2,5	30	6	49,25	8
P3-4	1:5	30	6	94	8

Studiul reologic al hidrogelurilor a fost realizat cu ajutorul unui reometru modular Anton Paar, Physica MCR 501 prevăzut cu un sistem Peltier de reglare a temperaturii, care asigură funcționarea pe un domeniu de temperaturi cuprins între -20 și 200 °C. Măsurătorile s-au efectuat cu o geometrie plan-plan. Atât placa superioară, cât și cea inferioară sunt confecționate din oțel inoxidabil și sunt rugoase pentru a împiedica alunecarea hidrogelurilor. S-au utilizat plăci cu diametrul de 50 mm. Distanța dintre plăci a fost stabilită între 1 și 3 mm.

Toate hidrogelurile obținute au fost baleiate în amplitudine cu o frecvență constantă, de 20 rad/sec, și deformații cuprinse între 0,1 % - 100 %, pentru identificarea domeniului vâscoelastic

liniar (LVE). Baleaiagele în frecvență s-au realizat pe un domeniu de viteze unghiulare cuprins între 0,1 și 100 rad/sec, la o amplitudine a deformației de 5%, în funcție de limitele domeniului de vâscoelasticitate liniară stabilite pentru fiecare probă în parte. Temperatura la care s-a lucrat a fost de 25 °C.

Caracteristicile vâscoelastice ale materialelor pot fi eficient evaluate cu ajutorul testelor oscilatorii, determinând următoarele mărimi reologice:

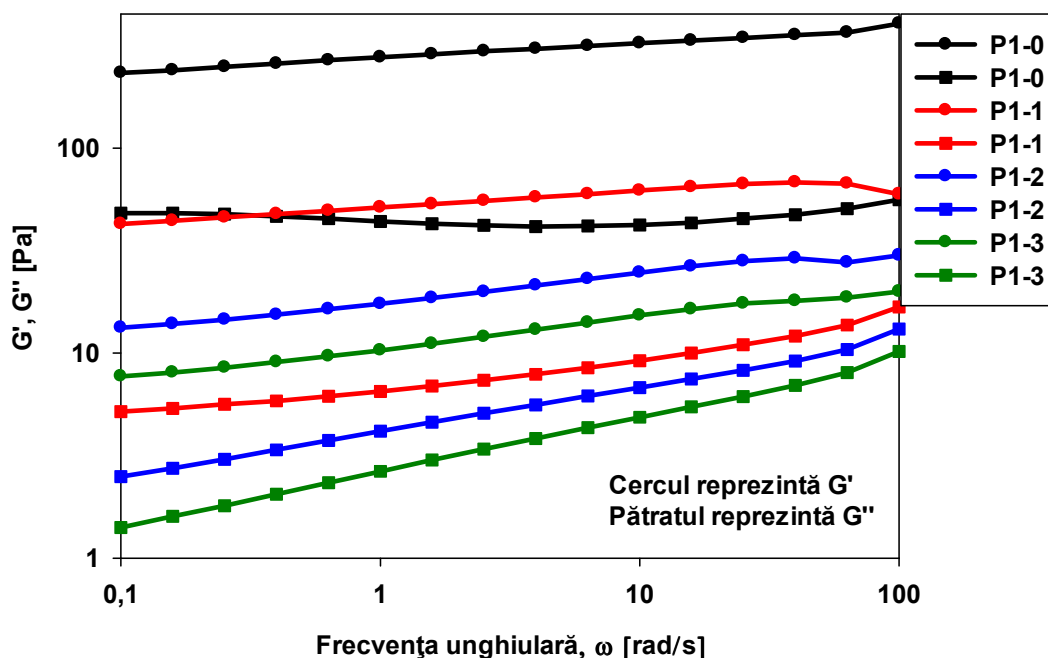
a) modulul de acumulare (G'), care este o măsură a energiei de deformare acumulată în probă în cursul procesului de forfecare; după îndepărtarea solicitării această energie este disponibilă, acționând ca forță motoare a procesului de revenire; așadar, G' caracterizează comportamentul elastic al materialului analizat;

b) modulul de pierderi (G''), care este o măsură a energiei de deformare disipată în probă, în cursul procesului de forfecare, energie complet pierdută la îndepărtarea solicitării; așadar, G'' caracterizează comportamentul vâscos al materialului;

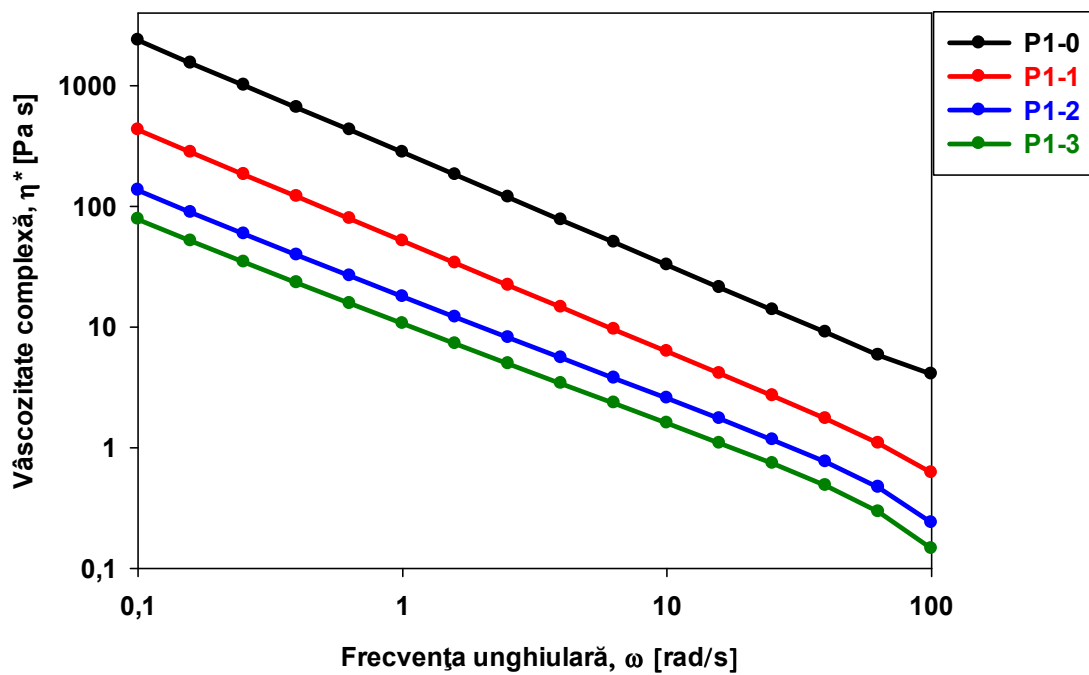
c) factorul de pierderi, $\tan(\delta) = G''/G'$, ce caracterizează raportul contribuțiilor elastice și vâscoase în comportamentul global al probei analizate; în general, pentru starea lichidă, $\tan(\delta) > 1$ ($G'' > G'$), pentru starea de gel (solidă), $\tan(\delta) < 1$ ($G' > G''$), iar pentru punctul de tranziție (de gelifiere), $\tan(\delta) = 1$ ($G'' = G'$);

d) vâscozitatea complexă, η^* .

În figurile 83, 84 și 85 a și b sunt redată evoluțiile modulelor G' și G'' , precum și a vâscozităților complexe, în regim oscilatoriu, în funcție de frecvență, la 25 °C, pentru amestecurile preparate conform tabelelor 7, 8 și 9.

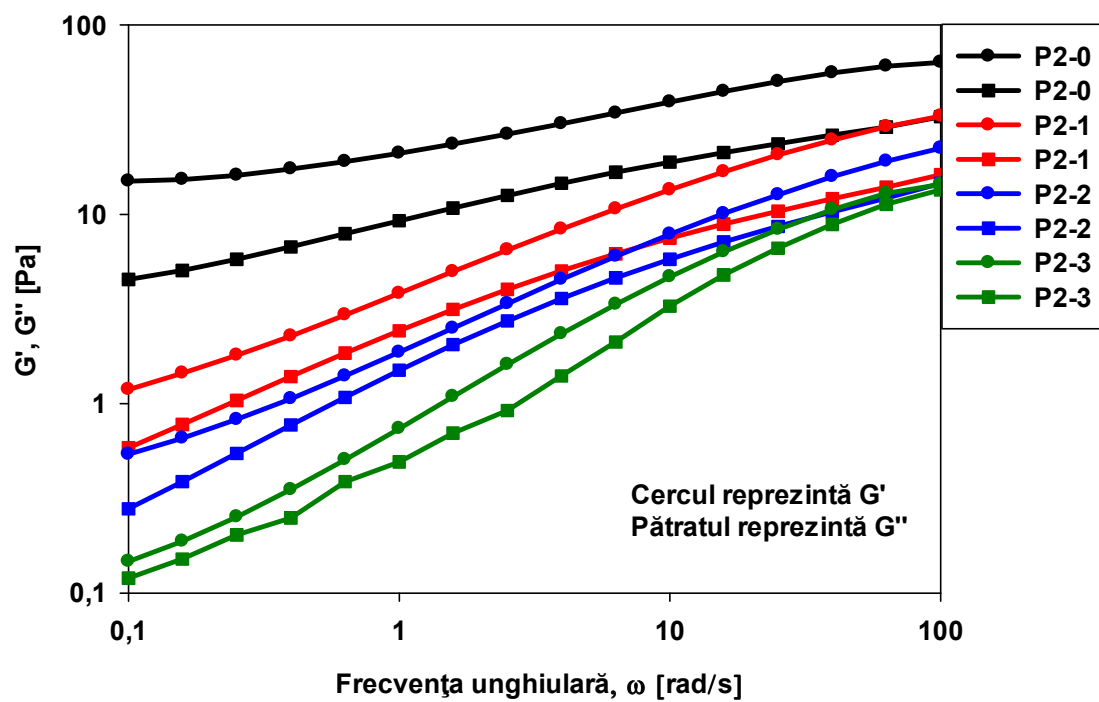


(a) – modulele de acumulare și de pierderi

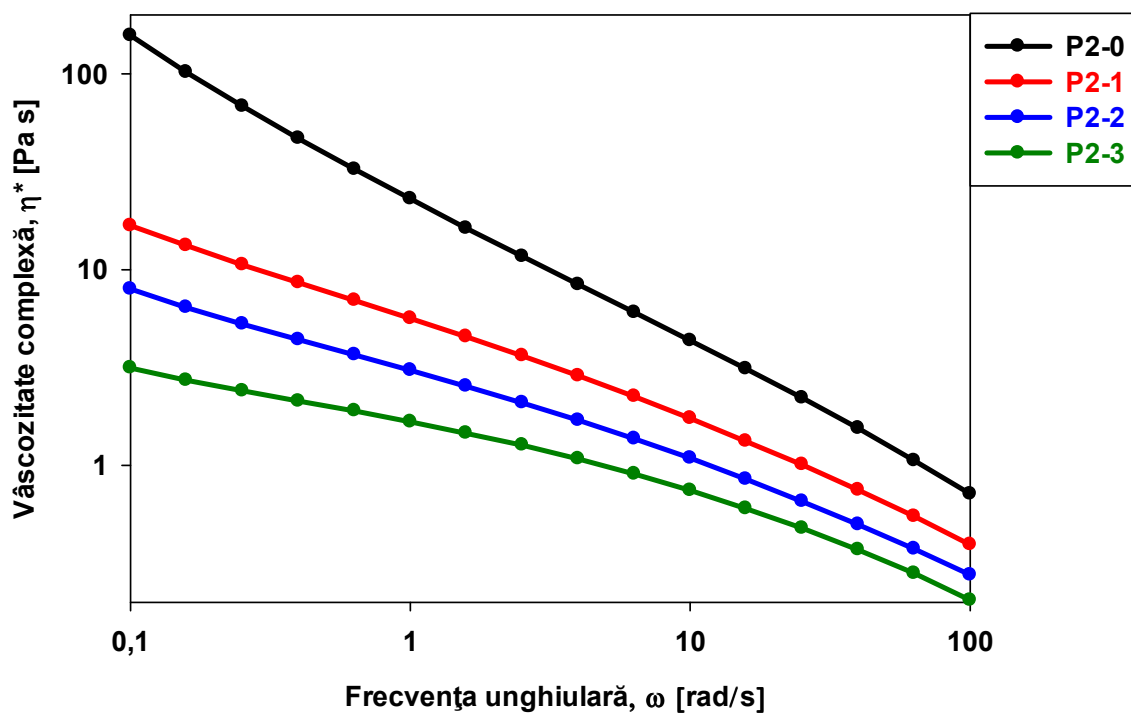


(b) – vâscozitatea complexă

Figura 83. Caracteristicile reologice ale hidrogelurilor reticulate covalent pe bază de collagen, determinate la 25 °C.

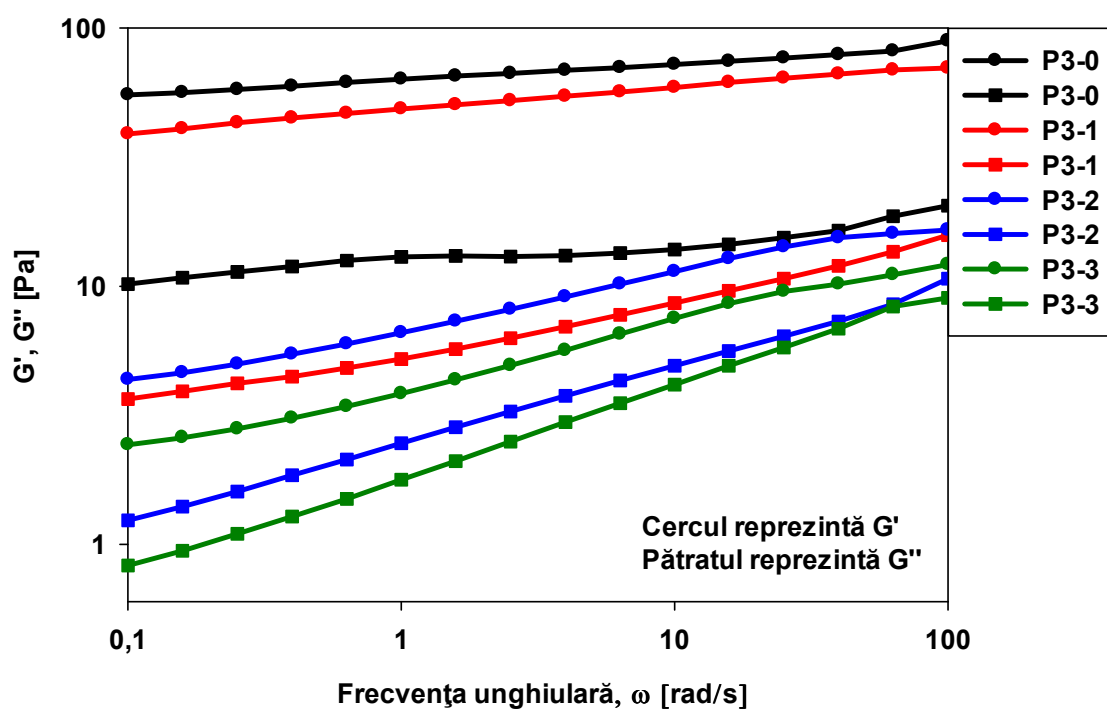


(a) – modulele de acumulare și de pierderi

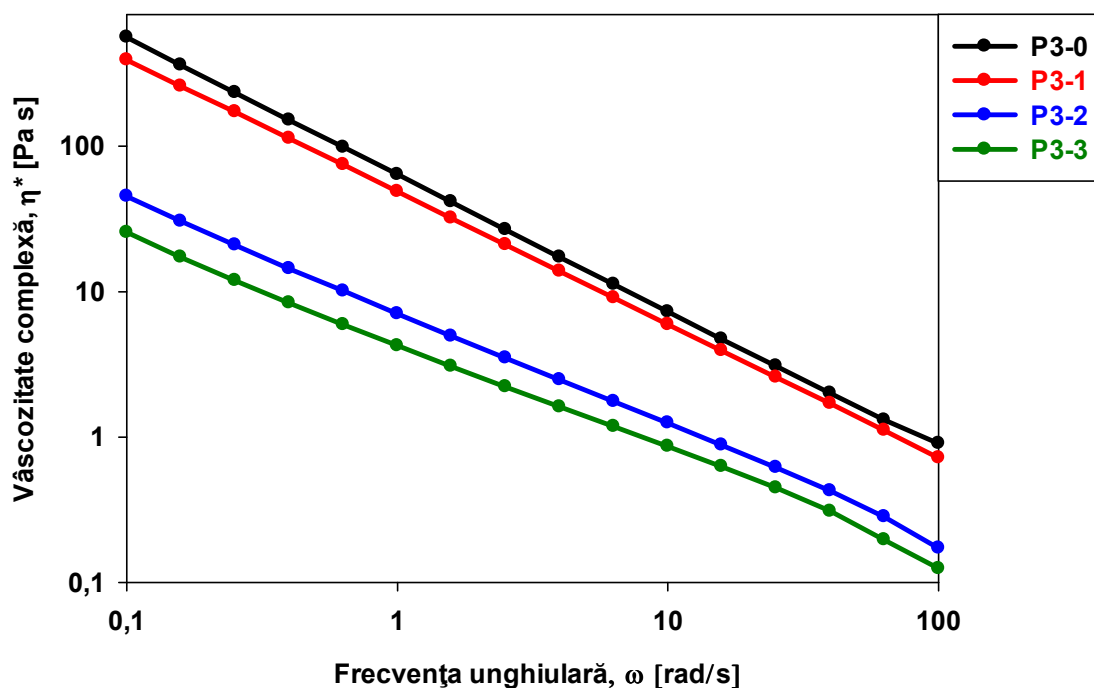


(b) – vâscozitatea complexă

Figura 84. Caracteristicile reologice ale hidrogelurilor reticulate covalent pe bază de collagen și hialuronat de sodiu (raport 1:1 aK:NaHyal), determinate la 25 °C.



(a) – modulele de acumulare și de pierderi



(b) – vâscozitatea complexă

Figura 85. Caracteristicile reologice ale hidrogelurilor reticulate covalent pe bază de collagen și hialuronat de sodiu (raport 5:1 aK:NaHyal), determinate la 25 °C.

Figurile 83, 84, 85 a indică faptul că pe întreaga gamă de frecvențe baleiate, modulul de acumulare are valori mai mari decât modulul de pierderi, confirmând comportamentul reologic de gel, pentru toate compozițiile studiate.

Pentru toate amestecurile binare, valorile modulelor G' și G'' sunt inferioare celor corespunzătoare hidrogelurilor atelocolagenice, probabil ca urmare a formării de punți de reticulare suplimentare, cu participarea grupărilor reactive ale hialuronatului.

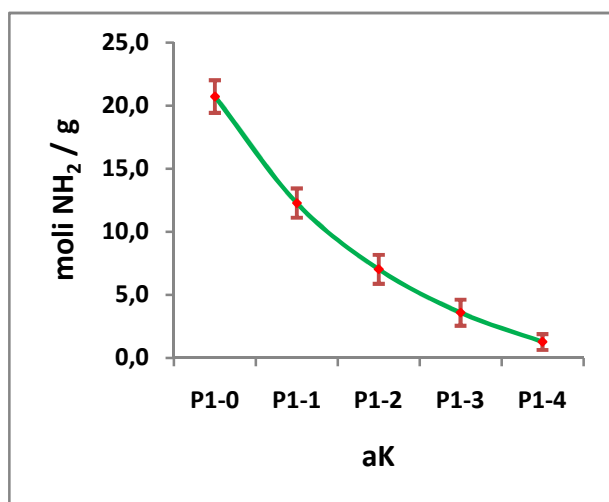
Ca o particularitate remarcabilă, parametrii reologici au valori descrescând odată cu creșterea gradului de reticulare, pentru toate rapoartele de amestecare între atelocolagen și hialuronat. De asemenea, parametrii reologici scad, ca valoare, odată cu creșterea fracției de polizaharid în amestec.

În figurile 83, 84 și 85 b se observă că, vâscozitățile complexe scad odată cu creșterea cantității de reticulant, și, de asemenea, scad ca valoare, odată cu creșterea cantității de hialuronat de sodiu.

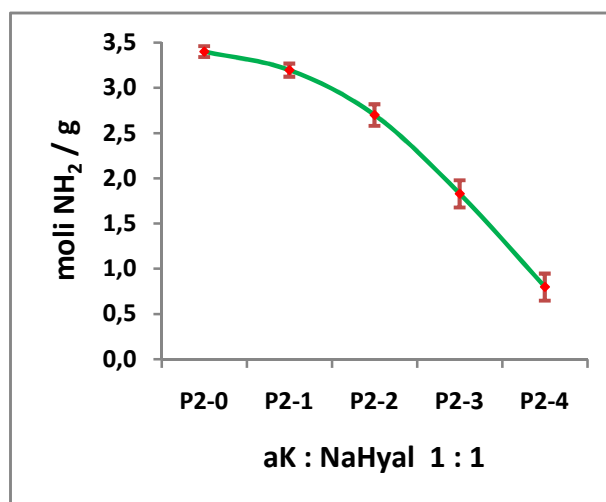
V.3. Determinarea grupărilor aminice libere din hidrogeluri

Pentru estimarea evoluției procesului de reticulare, cantitatea de grupări α -aminice libere de atelocolagen a fost determinată. Grupările α -NH₂ libere s-au realizat pe 5 mg hidrogel liofilizat din seria hidrogelurilor pe bază de collagen și collagen-hialuronat de sodiu raport 5:1. Asupra probelor cântărite s-a adăugat 1 mL NaHCO₃ 4%, după care amestecul se agită ușor și lăsat pentru 30 de minute în repaus. Peste proba obținută se adăugă 1 mL soluție TNBS 0,5%. Probele rezultate au fost supuse termostatării timp de 2h la 40 °C. După reacția cu TNBS,

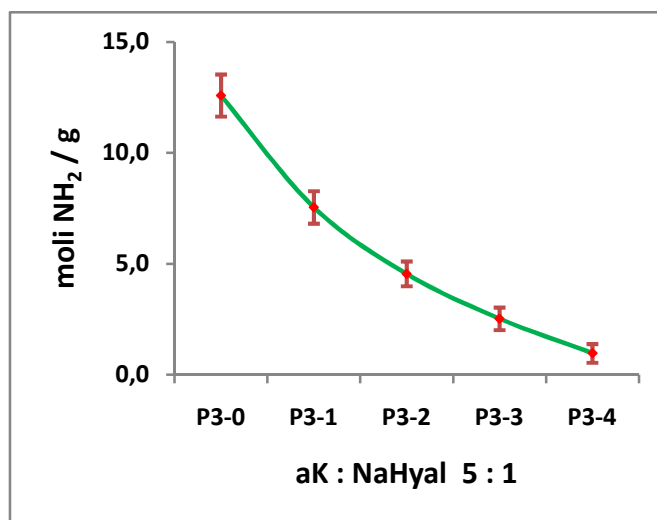
probele au fost scurse bine, iar hidrogelurile recuperate au fost spălate de trei ori cu dietil eter și supuse apoi liofilizării. În continuare, probele au fost supuse procesului de hidroliză utilizând câte 3 mL HCl 6M, la 60°C timp de 90 de minute. Absorbanța soluțiilor rezultate a fost măsurată spectrofotometric, la o lungime de undă de 345 nm, având ca referință HCl 6M [337, 338]. Variația cantităților de grupări α -NH₂ libere din hidrogelurile realizate sunt reprezentate în figura 92.



Hidrogeluri pe bază de collagen



Hidrogeluri pe bază de collagen și hialuronat de sodiu raport molar 1:1



Hidrogeluri pe bază de collagen și hialuronat de sodiu raport molar 5:1

Figura 92. Variația grupărilor aminice libere din hidrogelurile pe bază de collagen și collagen-hialuronat de sodiu.

Din reprezentările grafice se observă faptul că, odată cu creșterea gradului de reticulare și a cantității de hialuronat de sodiu, grupările α -NH₂ libere scad, ceea ce era de așteptat.

V.4. Analiza structurală a hidrogelurilor formate

V.4.1. Caracterizarea prin spectroscopie ^1H -RMN

Considerând ca standard extern acetatul de trimetilsilil propionat (TMS) ($\delta = 0,0$ ppm), sau înregistrat spectrele corespunzătoare collagenului nemodificat, hialuronatului de sodiu, și a hidrogelurilor realizate la temperatura de 25°C , în soluție de apă deuterată (D_2O).

În figurile 93 și 94 sunt prezentate spectrele ^1H -RMN pentru collagenul pur și hialuronatul de sodiu.

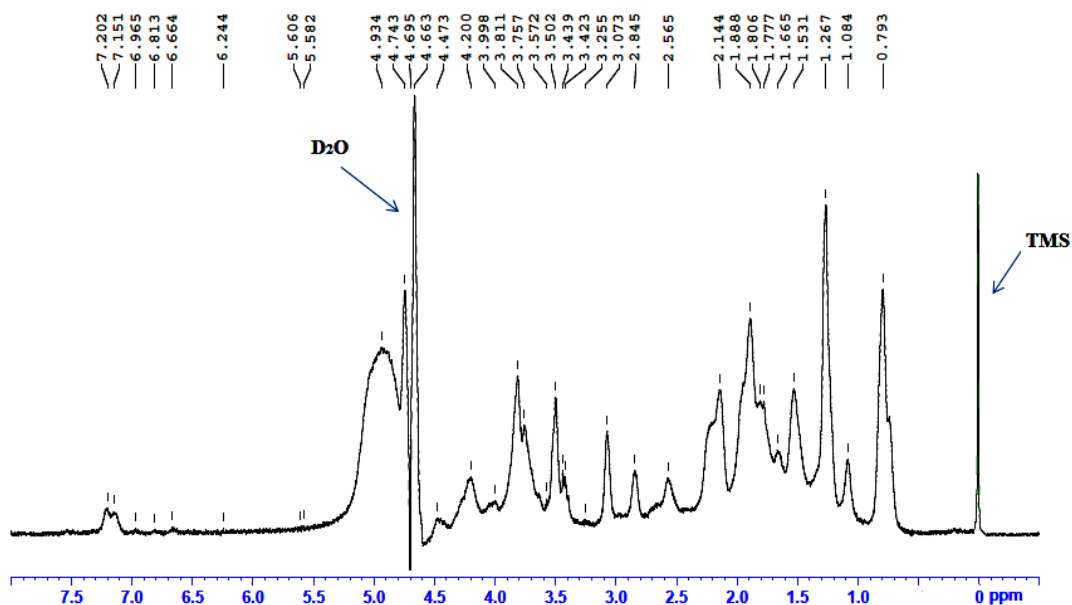


Figura 93. Spectrul ^1H -RMN înregistrat pentru collagenul pur.

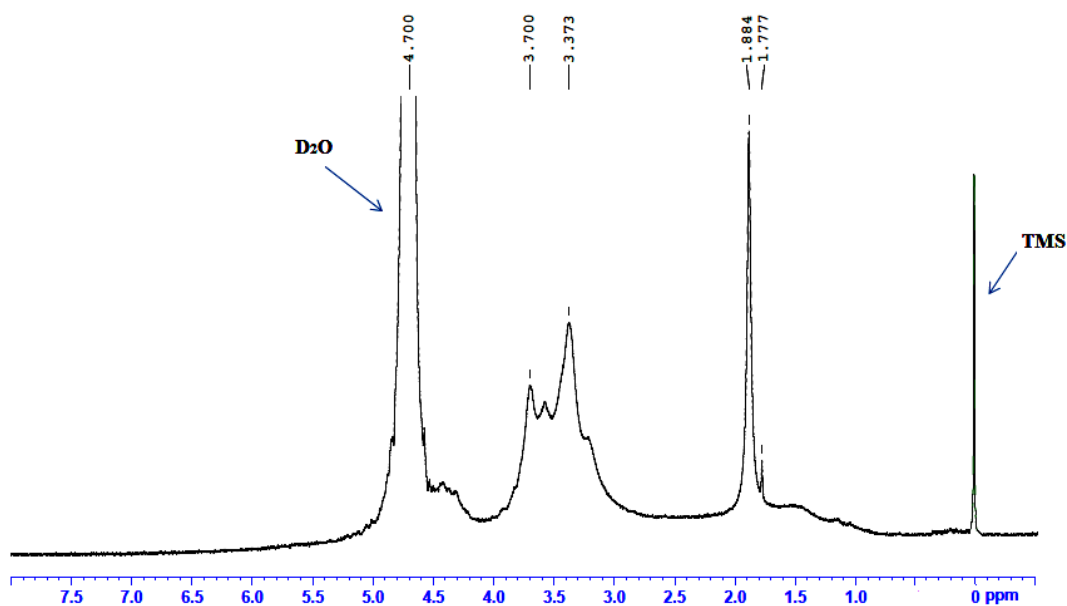


Figura 94. Spectrul ^1H -RMN înregistrat pentru hialuronatul de sodiu.

Din datele de literatura cunoaștem faptul că, protonii din aminele secundare apar în intervalul 0,8-3 ppm, interval ce coincide și cu apariția protonilor alifatici. Acest lucru îngreunează interpretarea spectrelor din cazul de față. Din spectrele înregistrate în figura 93 și 94 se observă că, grupările caracteristice collagenului pur și a hialuronatului de sodiu se cam suprapun.

Spectrul obținut în urma analizei hidrogelului pe bază de collagen (raport molar 1:1 α -NH₂:BDDGE) este prezentat în figura 95. Comparând cu spectrul înregistrat pentru collagenul pur, se evidențiază dispariția picului de la $\delta = 0,793$ ppm, iar amplitudinea picurilor de la $\delta = 1,18$ -1,21 ppm este mult mai mare spre deosebire de picul caracteristic collagenului pur, ceea ce ne demonstrează faptul că, reacția de reticulare a avut loc.

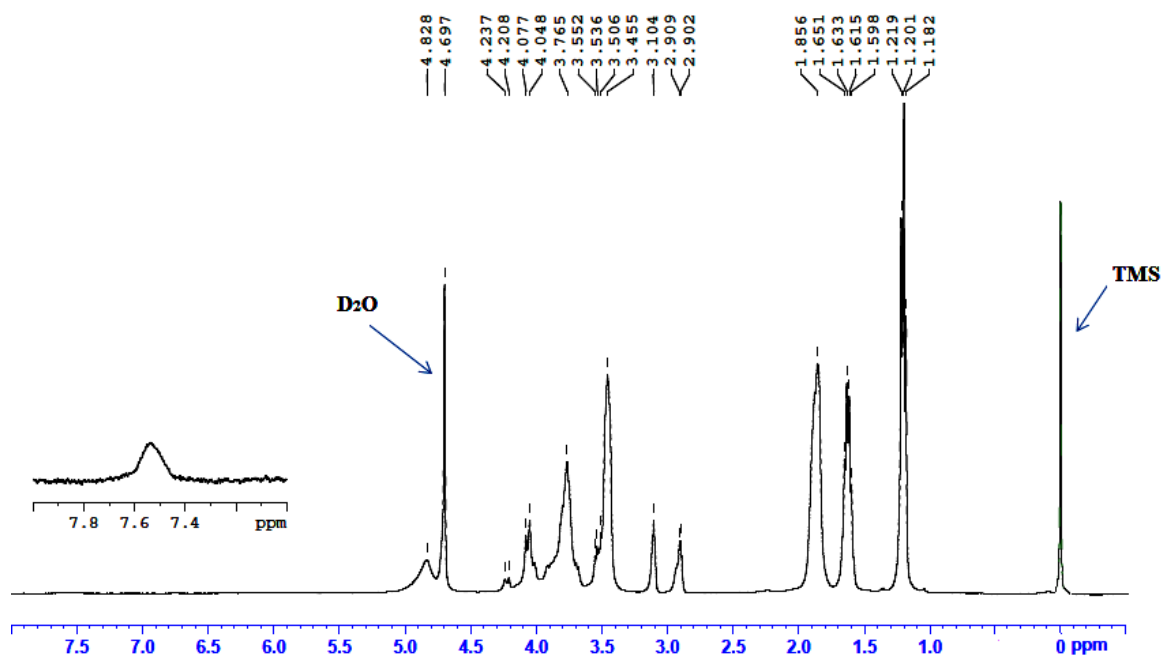


Figura 95. Spectrul ¹H-RMN înregistrat pentru hidrogelul pe bază de collagen (raport molar 1:1 α -NH₂:BDDGE).

Ca și în cazul hidrogelurilor collagenice, același lucru se întâmplă și în cazul hidrogelurilor binare (figura 96 și 97).

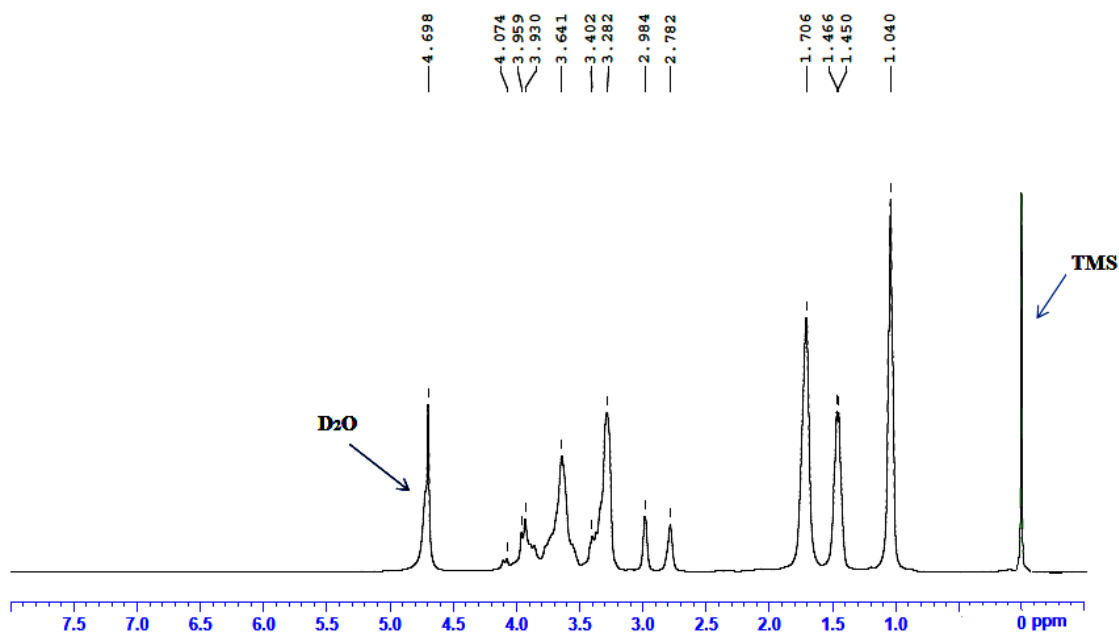


Figura 96. Spectrul ^1H -RMN înregistrat pentru hidrogelul pe bază de collagen și hialuronat de sodiu (raport aK:NaHyal 1:1).

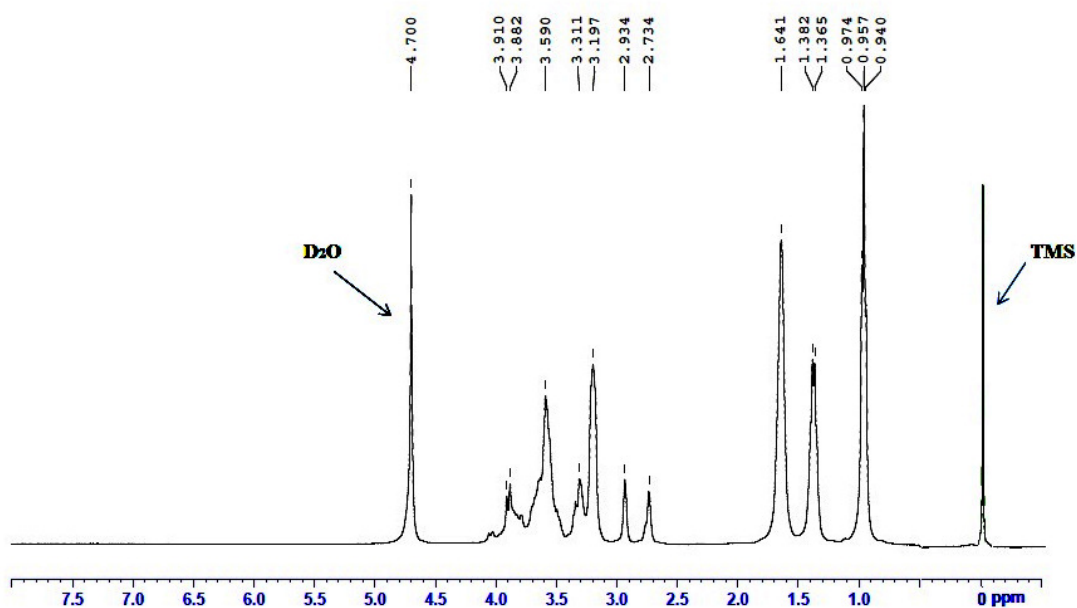


Figura 97. Spectrul ^1H -RMN înregistrat pentru hidrogelul pe bază de collagen și hialuronat de sodiu (raport aK:NaHyal 5:1).

Picurile care confirmă faptului că procesul de reticulare a avut loc în cazul hidrogelurilor binare sunt de $\delta = 1,04$ pentru raportul aK:NaHyal 1:1 și $\delta = 0,94-0,974$ pentru raportul aK:NaHyal 5:1.

V.5. Analiza termică

De asemenea, hidrogelurile au fost studiate din punct de vedere termic prin calorimetrie cu scanare diferențială (DSC).

Tranzițiile de fază au fost studiate prin calorimetrie cu scanare diferențială, utilizând un echipament TA Instrument Q100, în curent de azot (50 ml/min). Probele (cu masa de aproximativ 10 mg) au fost plasate în creuzete din aluminiu închise ermetic, și încălzite până la 120 °C, cu o pantă de 10 °C/min. Rezultatele prelucrate cu aplicația software Universal Analysis (TA Instrument, v 4.4A) sunt prezentate în figurile 100 și 101.

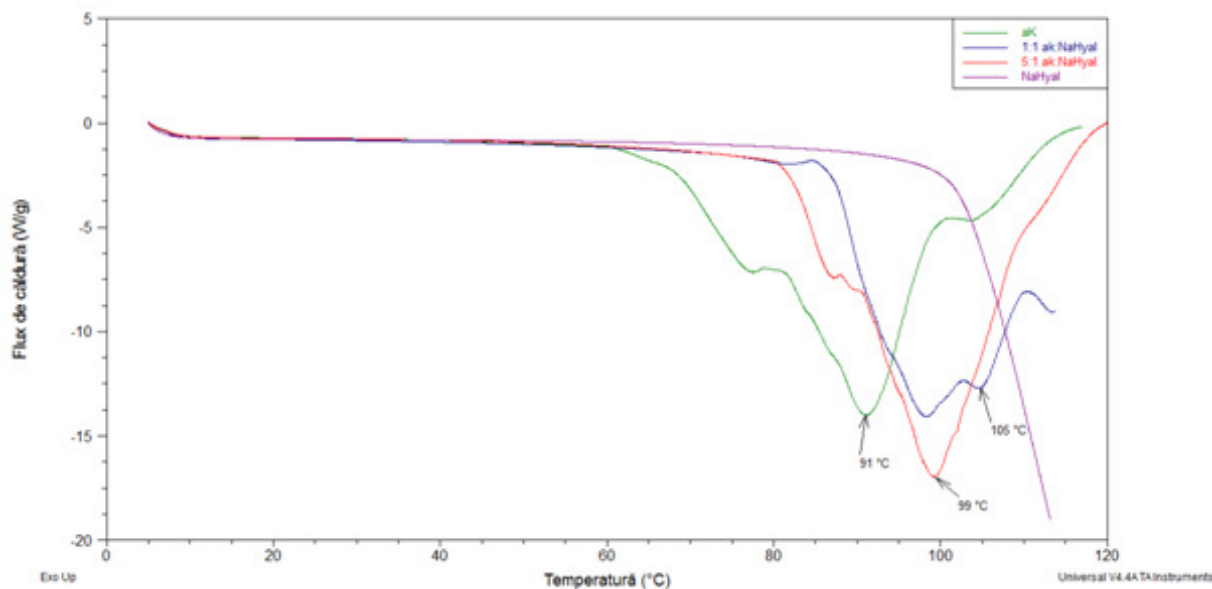


Figura 100. Curbele DSC pentru hidrogelurile slab reticulate.

Este evident faptul că, valoarea temperaturii influențează în mod semnificativ structura hidrogelurilor, iar creșterea cantității agentului de reticulare conduce la o scădere a temperaturii de denaturare a collagenului, cu excepția raportului de amestecare de 5 : 1. Pierderea de masă a collagenului devine semnificativă la temperaturi de peste 30°C. Comparativ, hidrogelurile binare reticulate sunt mai stabile termic decât hidrogelurile atelocolagenice reticulate.

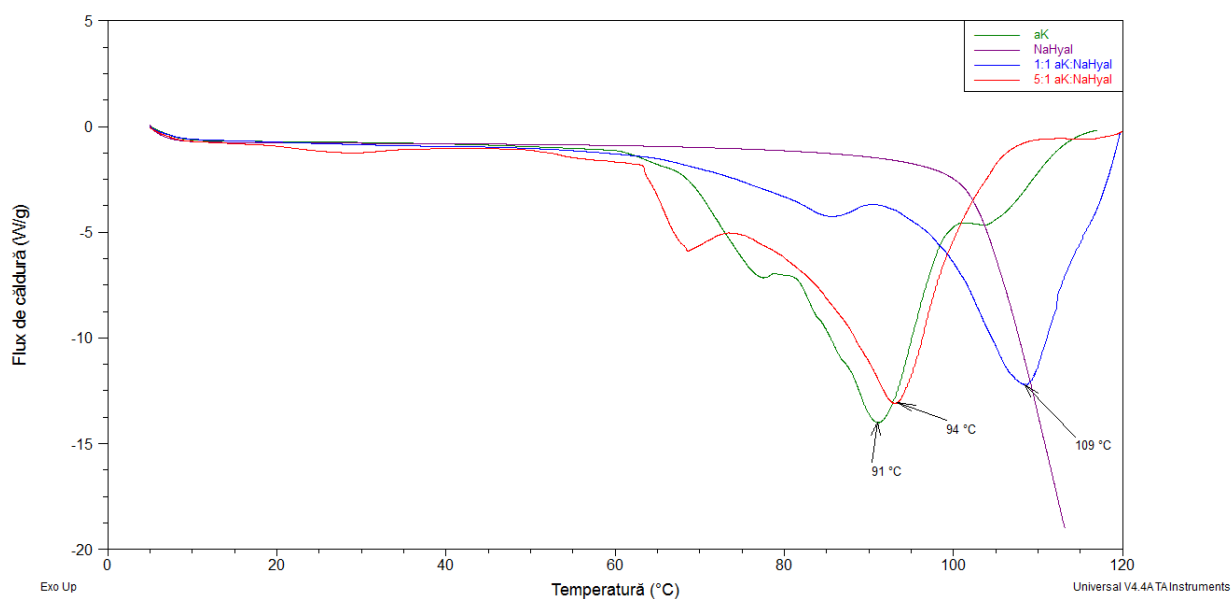


Figura 101. Curbele DSC pentru hidrogelurile puternic reticulate.

În tabelele 12 și 13 sunt sumarizate cele mai importante caracteristici termogravimetrice ale collagenului pur, hidrogelurilor realizate și a hialuronatului de sodiu.

Tabelul 12. Caracteristici termogravimetrice ale collagenului și hidrogelurilor obținute.

Raport molar 1:1 α-NH₂ : BDDGE			
Cod probă	T_{onset} (°C)^a	T_{peak} (°C)^b	T_{offset} (°C)^c
aK	61	91	100
1:1 aK:NaHyal	80	99	116
5:1 aK:NaHyal	86	105	110

^atemperatura la care începe degradarea termică;

^btemperatura ce corespunde gradului maxim de degradare;

^ctemperatura la care etapa de degradare ia sfârșit.

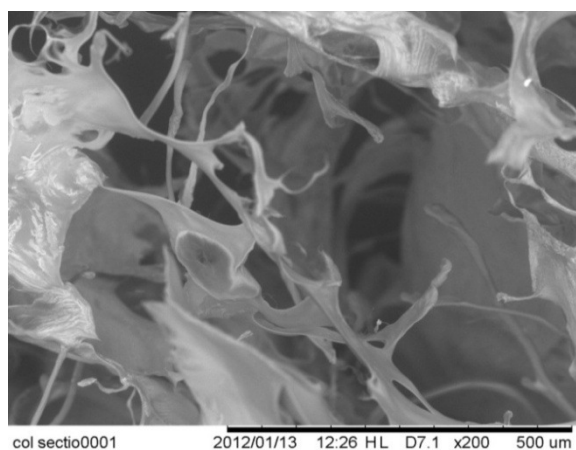
Tabelul 13. Caracteristici termogravimetrice ale collagenului și hidrogelurilor obținute.

Raport molar 5:1 α-NH₂ : BDDGE			
Cod probă	T_{onset} (°C)^a	T_{peak} (°C)^b	T_{offset} (°C)^c
aK	61	91	100
1:1 aK:NaHyal	63	94	107
5:1 aK:NaHyal	63	109	119

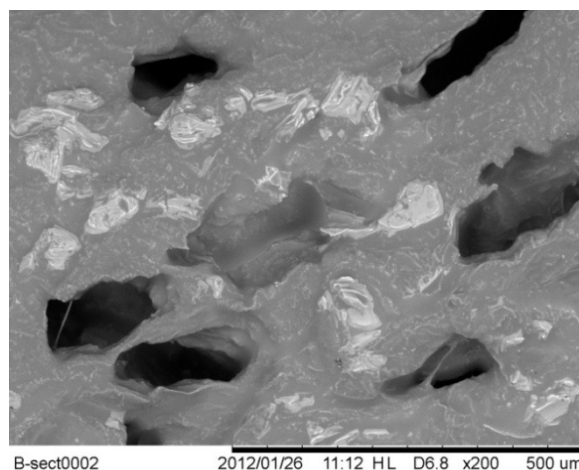
V.6. Caracterizarea morfologică a hidrogelurilor

Imaginile de microscopie electronică de baleiaj (SEM) permit caracterizarea morfologică a hidrogelurilor obținute. În vederea observării microscopice, hidrogelurile au fost liofilizate și secționate în condiții identice, pentru a asigura reproductibilitatea probelor. Imaginile obținute sunt prezentate în figura 102.

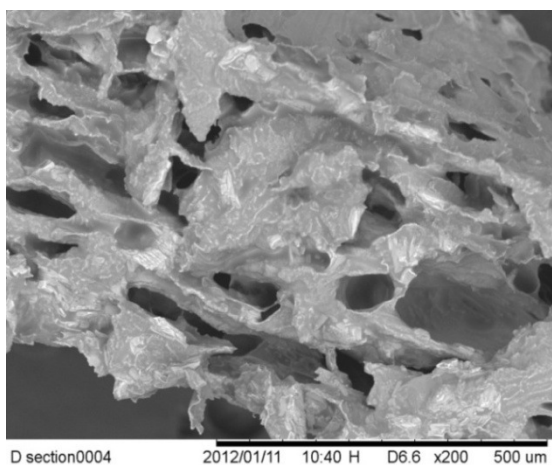
Microscopia electronică de baleiaj relevă faptul că apar diferențe semnificative între collagenul liofilizat (a), hidrogelurile collagenice reticulate (b) și cele care conțin amestecuri reticulate de collagen și hialuronan (c, d). Acestea din urmă prezintă o structură poroasă mai uniformă, cu pori interconectați. În cazul hidrogelurilor mai puternic reticulate și în al celor cu fracții masice de hialuronat mai mari, dimensiunea porilor este mai mică, probabil datorită compactării sporite a amestecului.



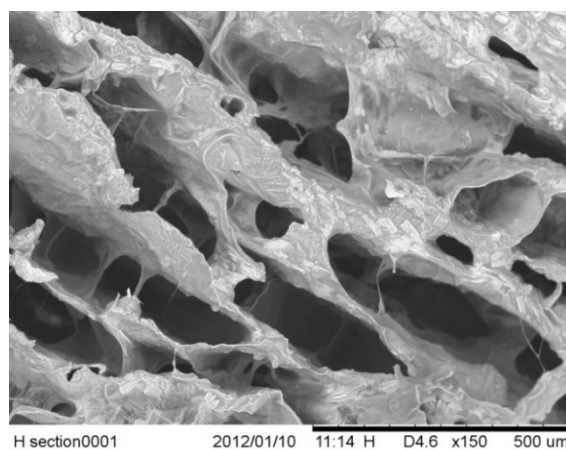
(a) – collagen liofilizat



(b) – collagen reticulat



(c) – hidrogel 1:1 collagen : hialuronan



(d) – hidrogel 5:1 collagen : hialuronan

Figura 102. Morfologia criogelurilor obținute pornind de la hidrogelurile studiate.

V.7. Gradul maxim de umflare

Hidrogelurile au fost caracterizate din punct de vedere al unor proprietati specifice, respectiv gradul maxim de umflare în medii fiziologice.

Studiul capacității de umflare a hidrogelurilor în mediu apos s-a realizat termogravimetric așa cum s-a precizat în Capitolul III.4.1. Pentru aceste determinări s-au folosit hidrogeluri pe bază de collagen reticulate covalent cu diferite grade de reticulare.

Hidrogelurile cântărite în prealabil au fost imersate în soluție tampon fosfat de pH 7,4 și la intervale de timp bine stabilite s-au realizat măsurători. Studiul cineticii de umflare a hidrogelurilor este reprezentat în figura 103. Din reprezentarea grafică se poate observa că hidrogelurile se umflă foarte mult în primele minute datorită structurii morfologice a acestora, urmată apoi de o creștere lentă până la aproximativ 3-4 ore, după care instalându-se un echilibru. Se mai poate observa că, hidrogelurile cu grad de reticulare mai mic se umflă mai mult față de cele cu grad de reticulare mare.

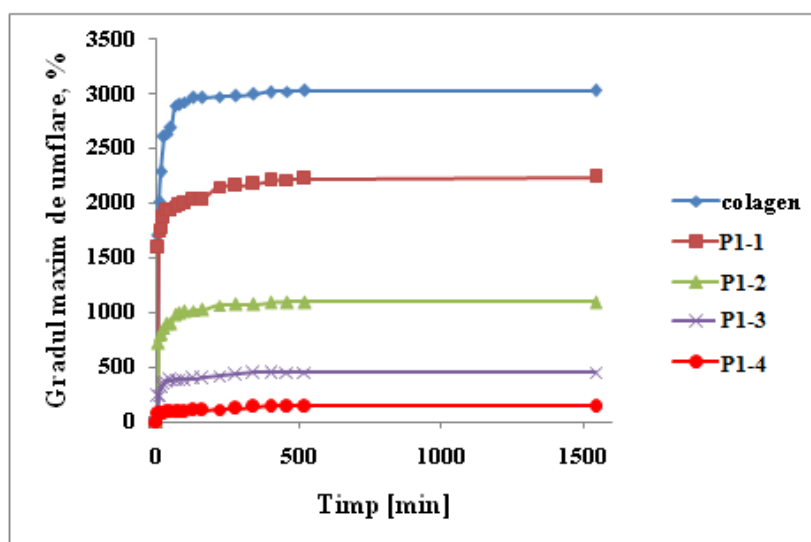


Figura 103. Curbele cineticii de umflare a hidrogelurilor pe bază de collagen în tampon fosfat (pH=7,4).

Gradul de umflare al hidrogelurilor se află în intervalul de 150-3050 % observându-se că este puternic influențat de gradul de reticulare.

În aceleași condiții de lucru s-au realizat și studiile de umflare a hidrogelurilor pe bază de collagen și hialuronat de sodiu reticulare covalent, seria 5:1 aK:NaHyal (figura 104).

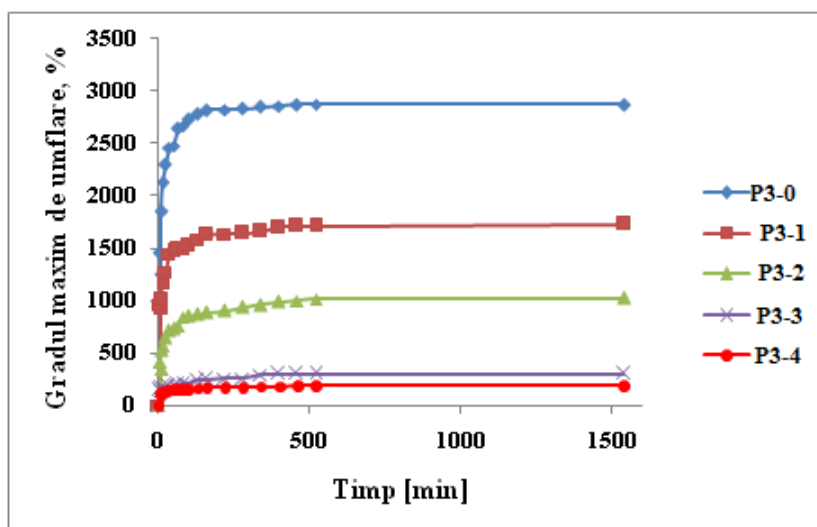


Figura 104. Curbele cineticii de umflare a hidrogelurilor pe bază de collagen și hialuronat de sodiu în tampon fosfat (pH=7,4).

Din reprezentarea grafică se observă că, gradul de umflare al hidrogelurilor scade odată cu creșterea gradului de reticulare, situându-se între 185–2880 %.

Spre deosebire de hidrogelurile pe bază numai de collagen, hidrogelurilor pe bază de collagen și hialuronat de sodiu prezintă un grad de umflare un pic mai scăzut datorită introducerea în sistem a polizaharidului.

V.8. Capacitatea de încărcare a hidrogelurilor cu medicament

O altă aplicație medicală pe lângă suporturi ale matricei extracelulare ar fi ca suporturi de medicamente. Acesta a fost motivul pentru care au fost realizate studiile de încărcare și eliberare de medicamente.

Pentru efectuarea acestor studii s-au utilizat aceleași set de probe ca și în cazul studiului gradului maxim de umflare. Modul de lucru a fost prezentat în Capitolul III.4.2.

Pentru aceste studii s-a ales ca medicament Levofloxacină (LVF - sare de sodiu). Probele cântărite în prealabil au fost imersate în 10 ml soluție de levofloxacin în tampon acetat (50 mg/ml) și lăsate 24 ore pentru definitivarea procesului de difuzie, sub agitare ușoară. Atât pentru studiile de încărcare și eliberare este necesară curba de calibrare (figura 105).

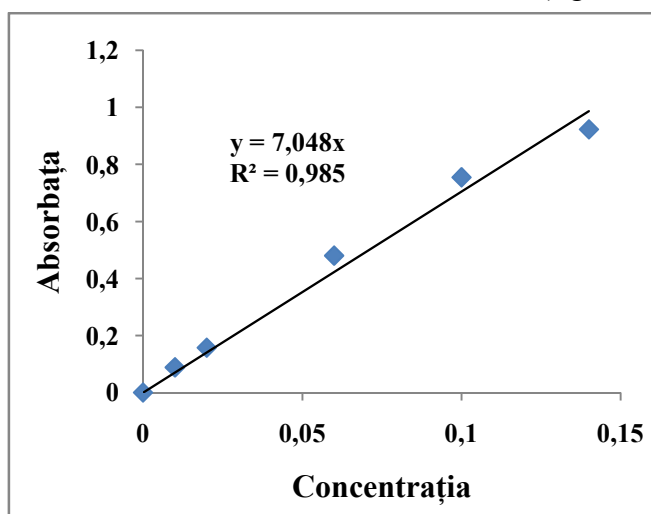


Figura 105. Curba de etalonare a novofloxacinului în tampon acetat.

Cantitatea maximă de novofloxacină după 12 ore a fost calculată spectrofotometric la lungimea de undă de 294 nm.

Cantitatea de LVF încărcată în hidrogeluri pe bază de collagen scade odată cu creșterea gradului de reticulare, acesta corelându-se cu gradul de umflare. Din tabelul 14 se poate observa că, hidrogelurile prezintă o capacitate crescută de încărcare a medicamentului (raportul masic medicament/hidrogel este mai mare decât 1, cu excepția probei 4). Același lucru se observă și în cazul hidrogelurilor pe bază de collagen și hialuronat de sodiu.

Tabelul 14. Rezultatele procesului de încărcare a hidrogelurilor cu levofloxacină.

Cod probă		LVF/hidrogel, mg/mg
P1-1	pe bază de collagen	3,07
P1-2		1,84
P1-3		1,50
P1-4		0,63
P3-1	pe bază de collagen și hialuronat de sodiu (seria 5:1 aK:NaHyal)	3,60
P3-2		3,36
P3-3		2,52
P3-4		0,69

V.9. Eliberarea *in vitro* a Levofloxacinii

Procesul de eliberare s-a realizat în soluție de tampon fosfat (pH=7,4) așa cum este indicat în Capitolul III.4.3. Studiile de eliberare ale LVF din hidrogeluri au fost monitorizate prin măsurători spectroscopice UV-VIS. Fiecare probă încărcată cu LVF a fost introdusă în câte o membrană de dializă, care a fost apoi plasată într-un mediu apos (100 ml de tampon fosfat). Acest sistem a fost menținut la temperatura constantă de 37 °C sub agitare magnetică constantă, la 120 rpm. Eficiența de eliberare a LVF ($E_{ef}\%$) a fost calculată după cum urmează:

$$E_{ef}\% = \frac{m_r}{m_l} \times 100$$

unde:

m_r = cantitatea de LVF eliberată din hidrogeluri (mg);

m_l = cantitatea de LVF încărcată în hidrogeluri (mg).

Curbele de eliberare ale LVF din hidrogelurile pe bază de collagen și pe bază de collagen și hialuronat de sodiu (raport 5:1 aK:NaHyal) în mediu apos (pH = 7.4) sunt prezentate în figurile 106 și 107. Eliberarea LVF din hidrogel este controlată de procesul de difuzie. Rezultatele privind eliberarea LVF sunt în concordanță cu comportamentul observat la umflare.

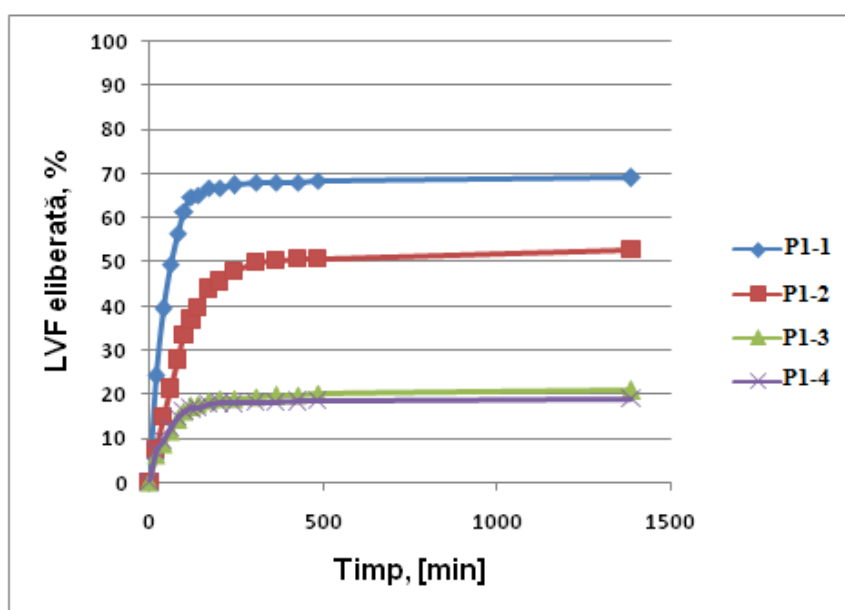


Figura 106. Curbele de eliberare *in vitro* a LVF din hidrogeluri în soluție de tampon fosfat (pH = 7,4).

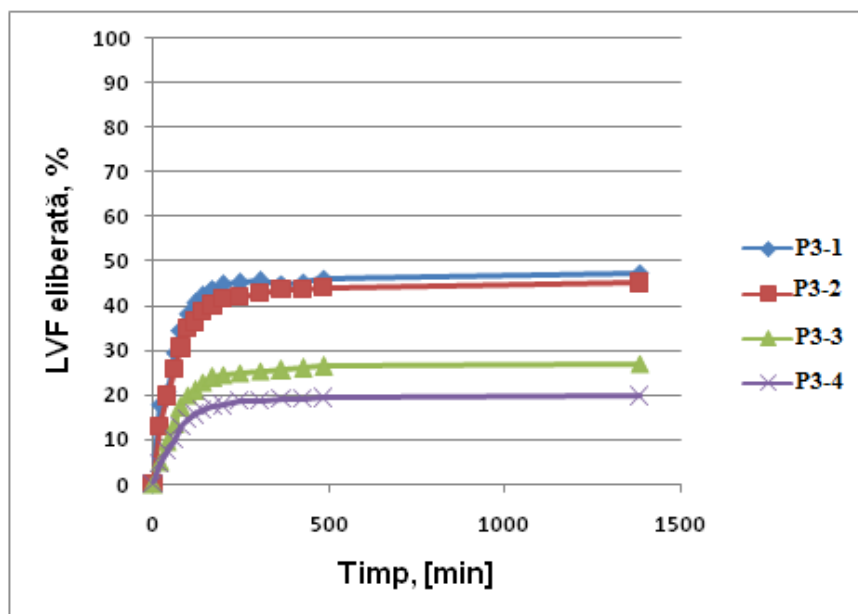


Figura 107. Curbele de eliberare *in vitro* a LVF din hidrogelurile binare în soluție de tampon fosfat (pH = 7,4).

Rezultatele arată că eficiența de eliberare a LVF în mediu alcalin este între 19% și 64% pentru hidrogeluri pe bază de collagen și între 19% și 41% pentru cele binare. Este evident faptul că, gradul de reticulare are un rol foarte important în ceea ce privește eliberarea medicamentului din hidrogel. O altă observație este că, în primele ore are loc o eliberare rapidă a LVF din hidrogeluri („burst” effect) și apoi o eliberare lentă până la echilibru.

Capitolul VI. Studii *in vitro* asupra biocompatibilității hidrogelurilor

VI.1. Caracterizarea hidrogelurilor din punct de vedere al activității metabolice

Pentru a fi folosite cu succes în aplicațiile bimedice, hidrogelurile trebuie să nu inducă organismului o reacție adversă.

Standardele ASTM (ASTM F813-07 [339]) și ISO (ISO 10993-5) stipulează necesitatea și orientările generale pentru a evalua *in vitro* potențialul citotoxic al tuturor substraturilor, care vor fi plasate în contact cu țesuturile, prin intermediul celulelor culturii de evaluare. În acest sens, testele de viabilitate și de proliferare a fibroblastelor 3T3 au fost efectuate pe probe de conjugați, prin tehnicile AlamarBlue [340] și PicoGreen [341], ușor modificate pentru a se adapta la probele poroase ca vitrigelurile. Metoda de lucru după care s-au realizat aceste studii a fost prezentată în Capitolul III.4.6.

Pentru aceste studii s-au folosit 3 tipuri de hidrogeluri: unul pe bază de collagen reticulat covalent și 2 hidrogeluri pe bază de collagen și hialuronat de sodiu în raport de 1:1 și respectiv 5:1.

Inițial, probele au fost sterilizate cu alcool etilic 70 % timp de 15 min, după care spălate de 4-5 ori în soluție HBSS sterilă (Hank's balanced salt solution – Sigma-Aldrich). Materialele astfel pregătite au fost lăsate la umflat în condiții de 37°C, 5 % CO₂ și 95 % umiditate pentru cel puțin 48 de ore, până la obținerea unui hidrogel uniform.

Pentru fiecare probă, probele foarte hidratate au fost scufundate într-o suspensie de $3 \cdot 10^4$ fibroblastele 3T3 în mediu Dulbecco Eagle modificat (MDEM, Sigma-Aldrich), cu 0,584 mg/L L-glutamină și 110 mg/L clorhidrat de piridoxină, suplimentat cu 10% ser fetal bovin (BFS, Sigma-Aldrich) și cu 1% g/v amestec de penicilină și streptomycină (P/S, Sigma-Aldrich), înainte de utilizare. După hidratare, probele au fost incubate pentru 24 și, respectiv 48 de ore, la 37 °C, într-o atmosferă de 95% umiditate și 5% CO₂. După perioada de incubare, mediul de cultură cu celulele neviabile (în suspensie) din fiecare godeu, a fost înlăturat prin aspirare. Cultura celulară aderată de fundul fiecărui godeu, precum și cea de pe materialul testat, au fost spălate de două ori cu soluție sterilă HBSS, iar apoi incubate cu un volum de 1 ml soluție 10% reagent Alamar blue (Invitrogen) în HBSS, pentru 3 ore, la 37°C, 5% CO₂ și 95 % umiditate. După incubare, câte 100 μl de soluție Alamar blue din fiecare godeu au fost transferați într-o placă de 96 godeuri, în care s-a citit fluorescența emisă de soluție cu ajutorul spectrofotometrului cititor de plăci (Varioskan FLASH (Thermo Scientific) la o lungime de undă de excitație de 560 nm. și cea de emisie egală cu 590 nm pentru a estima activitatea metabolică a celulelor 3T3. Activitatea metabolică a acestor celule este reprezentată în figura 108.

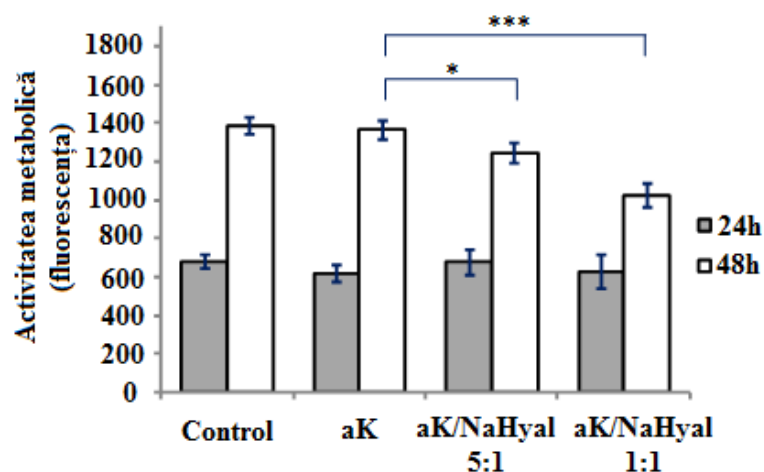


Figura 108. Activitatea metabolică a hidrogelurilor la 24 și 48 de ore.

Din reprezentarea grafică se observă faptul că, activitatea metabolică după 24 de ore de incubare este aproximativ egală cu cea a controlului. La 48 ore se observă că, activitatea metabolică a hidrogelului pe bază numai de collagen este egală cu cea a controlului. În cazul hidrogelului pe bază de collagen și hialuronat de sodiu (raport collagen:NaHyal de 5:1) activitatea metabolică este de peste 90% față de control, iar pentru hidrogelul pe bază de collagen și hialuronat de sodiu (raport collagen:NaHyal de 1:1) aceasta este de peste 70%. În concluzie, putem spune că hidrogelul pe bază de collagen și cel pe bază de collagen și hialuronat de sodiu (raport collagen:NaHyal de 5:1) sunt netoxice. În urma experimentului, se constată că, cantitatea de collagen din amestecuri joacă un rol important. Cu cât cantitatea de collagen este mai mare, crește și activitatea metabolică a produșilor.

VI.2. Studii de proliferare celulară asupra hidrogelurilor realizate

O altă metodă de determinare a biocompatibilității este metoda de proliferare celulară. Aceasta se realizează utilizând reactivul PicoGreen (Quant-iT™ PicoGreen® dsDNA Reagent and Kits, Invitrogen) pentru determinarea cantitativă a ADN-ului dublu catenar din soluție, descris în Capitolul III.4.6.

În mare, protocolul a constatat în adăugarea unui volum de soluție PicoGreen 0,5% peste un volum egal de soluție experimentală sau ADN standard, incubată la temperatura camerei pentru 3-5 min și apoi citirea spectrofotometrică în spectru UV, folosind $\lambda = 480$ nm ca lungime de undă de excitație și $\lambda = 520$ nm ca lungime de undă de emisie, utilizând cititorul de plăci Varioskan FLASH (Thermo Scientific). Ca referință s-a utilizat un control pentru fiecare interval de timp. Pentru control celulele au fost cultivate în godeuri goale în condiții similare cu probele studiate.

În figura 109 sunt prezentate testele de proliferare celulară a hidrogelurilor la 24 și 48 ore.

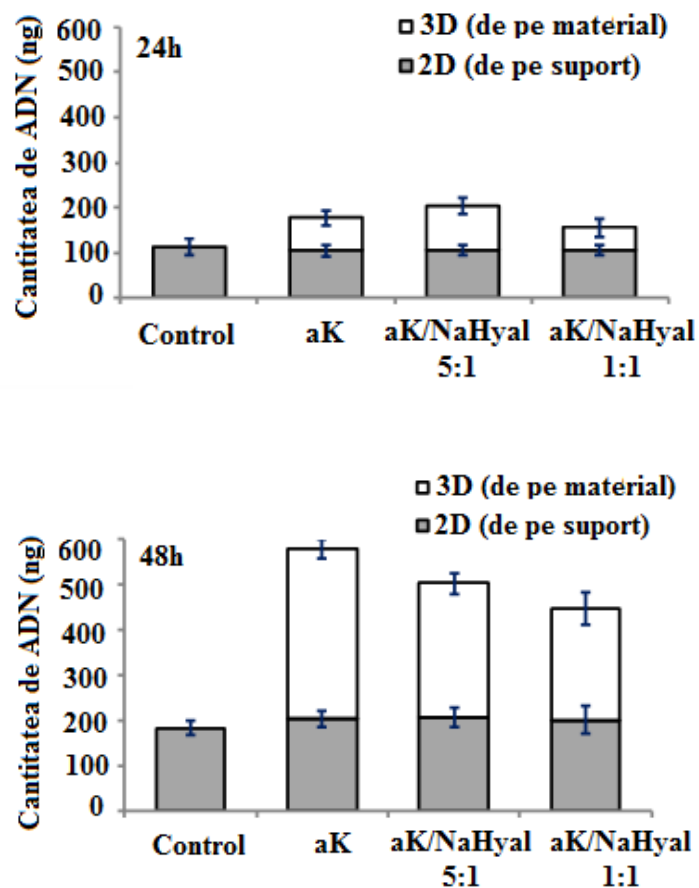


Figura 109. Proliferarea celulară a hidrogelurilor la 24 și 48 de ore.

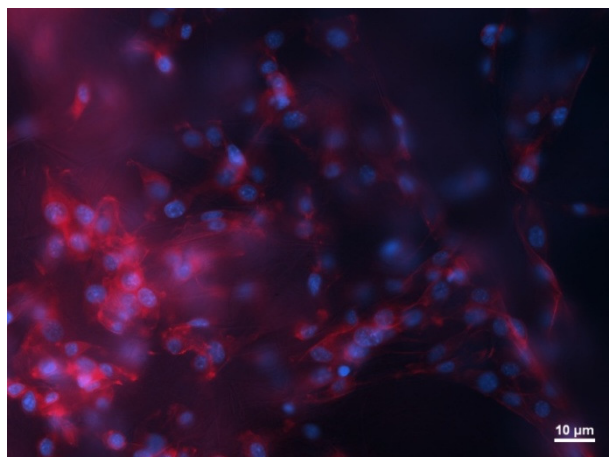
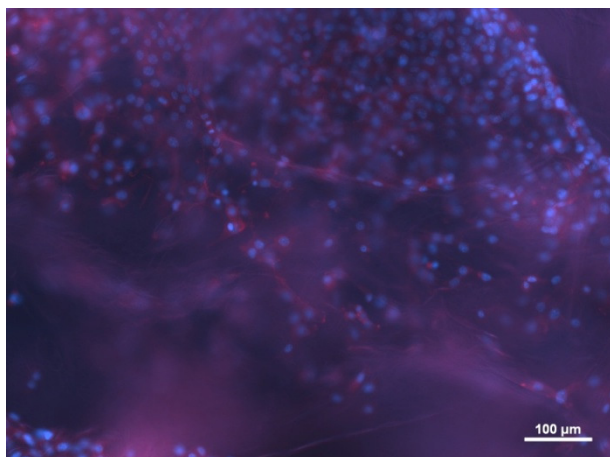
Din reprezentarea grafică, se observă că, spre deosebire de măsurătorile de la 24h, gradul de proliferare este mult mai mare la 48h, ceea ce semnifică faptul că celulele aderă și proliferază în interiorul materialului. Ca și în cazul studiilor privind activitatea metabolică, se observă faptul că, cantitatea de collagen din sistem joacă un rol important în proliferarea celulară.

VI.3. Metoda imunofluorescentă de colorare a materialelor populate

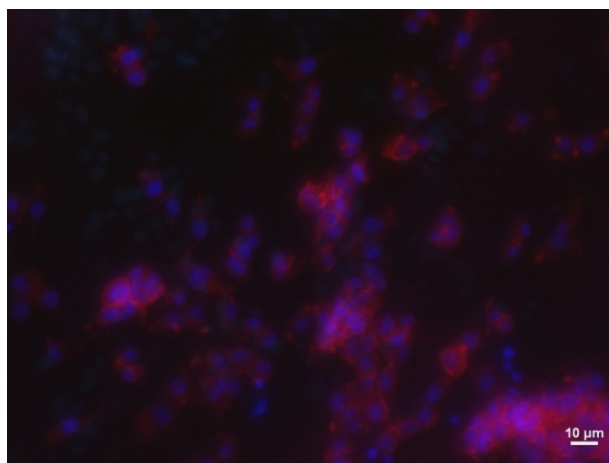
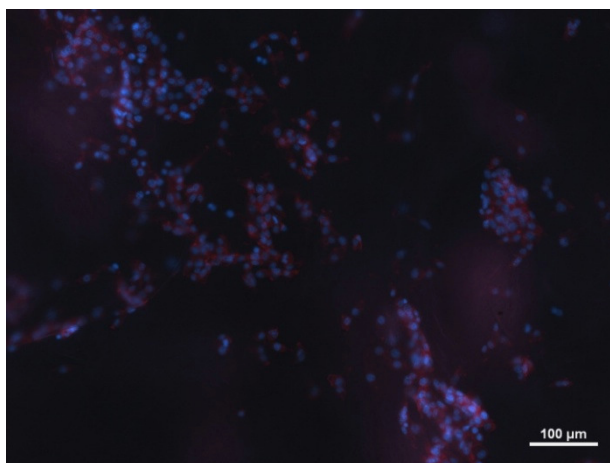
După perioada de incubare de 48 de ore materialele au fost extrase din godeurile inițiale și transferate pe o altă placă de cultură, cu mediu de cultură proaspăt. Astfel însămânțate, materialele au fost incubate pentru o perioadă de încă 5 zile (în total 7 zile de incubare). La finalul perioadei de incubare, materialele populate cu celule au fost spălate de 2 ori cu HBSS, fixate, colorate și supuse analizei microscopice în fluorescență, conform metodei descrise în continuare.

Materialele populate cu celule timp de 7 zile au fost analizate prin metoda de microscopie în fluorescență. Astfel, ansamblul material + celule de cultură a fost fixat în soluție de paraformaldehidă 4% timp de 1 oră la temperatura camerei, apoi permeabilizat timp de 30 min la +4°C cu ajutorul soluției detergente Triton X-100, 10%. După tratamentele de fixare și permeabilizare, materialele au fost colorate prin metoda imunofluorescentă, aplicând tehnica dublă de colorare, descrisă pe larg în literatura de specialitate. Astfel, Phalloidin-Rhodamine a

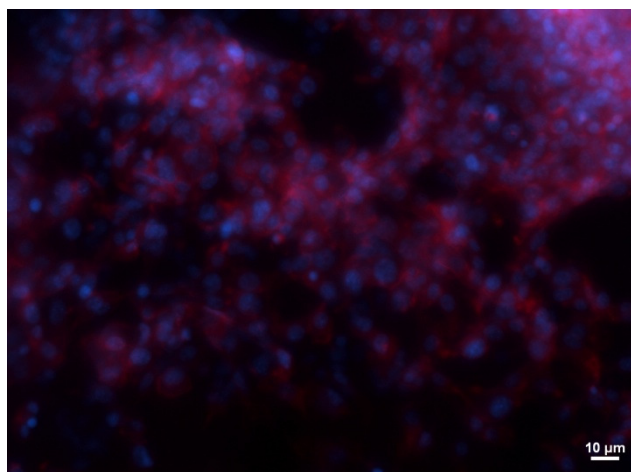
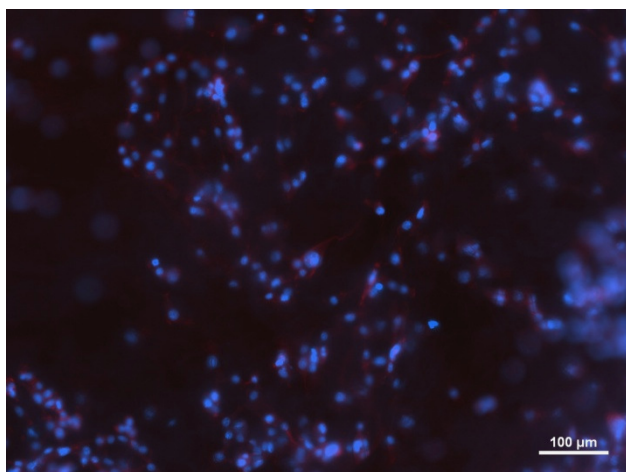
fost folosit pentru evidențierea filamentelor de actină (în roșu) și DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) – pentru evidențierea nucleilor celulari (în albastru) (figura 110).



Hidrogel pe bază de collagen



Hidrogel pe bază de collagen și hialuronat (raport 1:1)



Hidrogel pe bază de collagen și hialuronat (raport 5:1)

Figura 110. Imaginile de microscopie celulară a hidrogelurilor.

Pe lângă faptul că, testele de activitate metabolică și de proliferare celulară au fost favorabile, din analiza imaginilor se observă că, nucleii celulelor (colorați în albastru) au formă

rotundă și sunt nealterați, iar filamentele de actină (colorație roșie) s-au dezvoltat uniform pe toată suprafața materialului.

În urma acestor teste se constată că, hidrogelurile formate pot fi utilizate cu succes în aplicațiile biomedicale, fiind biocompatibile și având capacitatea de a susține și favoriza proliferarea celulară.

Concluzii generale

Încadrându-se în preocupările privind valorificarea superioară a proprietăților polimerilor naturali, cercetarea întreprinsă și-a propus să aducă contribuții în domeniul realizării de noi biomateriale cu componentă colagenică (colagen, hialuronat de sodiu, gelan) cu aplicații biomedicale, studiile efectuate permițând sistematizarea următoarelor concluzii generale:

1. Datorită biocompatibilității și biodegradabilității excelente, a structurii bine definite, a caracteristicilor fizico-chimice și biologice unice, colagenul reprezintă unul dintre cele mai utilizate biomateriale. Colagenul este un biopolimer cu caracteristici favorabile pentru utilizarea în regenerarea rapidă a pielii și ca substituent al matricei extracelulare. Principalele dezavantaje ale utilizării colagenelor în aplicații biomedicale sunt reprezentate de gradul mare de biodegradabilitate și stabilitatea mecanică scăzută. Aceste neajunsuri pot fi depășite prin multiple metode de procesare raportate în literatura de specialitate, cum sunt: reticularea fizică și chimică, amestecarea cu alți polimeri naturali sau sintetici sau prin încorporarea unor compuși exogeni.
2. În scopul de a asigura un amestec intim al atelocolagenului cu hialuronatul de sodiu și/sau gelan, trebuie să fie alese domeniile de pH care prezintă atât solubilitate individuală mare cât și solubilitate reciprocă corelată. Domeniul cel mai fezabil pare a fi cel cuprins între 5 și 9, dar, datorită faptului că în apropierea punctului izoelectric al atelocolagenului procesul de auto-asociere poate fi promovat, domeniul de pH cuprins între 8 până la 9 rămâne a fi cel mai fezabil, dacă se dorește ca în produsul final să se obțină o morfologie fibrilară.
3. Prin măsurători reologice asupra soluțiilor diluate de biopolimeri s-a constatat faptul că, concentrația totală maximă posibilă pentru amestecuri binare dintre atelocolagen și polizaharide, este de 0,150 g/dl, iar, flexibilitatea lanțurilor macromoleculelor componentelor trebuie să fie cât mai asemănătoare cu puțință, și variația în funcție de temperatură trebuie să fie, de asemenea, similară. Acesta este motivul pentru care, în cazul amestecurilor de atelocolagen cu hialuronat de sodiu și/sau gelan, temperatura de lucru ar trebui să fie menținută într-un domeniu mai mic de 20°C. Tot prin vâscozimetrie s-a observat că cel mai reproductibil interval de amestecare în cazul atelocolagenului cu hialuronatul de sodiu este cuprins între 0,09–0,15 g/dl, iar pentru atelocolagen și gelan de 0,05–0,07 d/dl.
4. O importanță deosebită în realizarea diagramelor de fază binare o are hidrofilia componentelor. Deosebirea perechii atelocolagen–gelan pare să fie mai mare în comparație cu perechea atelocolagen–hialuronat de sodiu, gelanul fiind cel mai receptiv la apă. Maxima de solubilitate a partenerilor amestecurilor poate fi stabilită prin plasarea pragului de separare a fazelor pe diagrama de fază. Coordonatele punctelor de prag de pe diagramele de fază ale amestecurilor investigate au fost: 0,032% g/g atelocolagen / 0,025% g/g hialuronat de sodiu în

figura 74, 0,028% g/g atelocolagen / 0,025% g/g hialuronat de sodiu în figura 75, și 0,022% g/g atelocolagen / 0,020% g/g gelan.

5. Obținerea diagramelor ternare este posibilă prin folosirea componentelor cât mai aproape de starea lor nativă și cu un conținut de sare redus. Amestecarea celor trei biopolimeri studiați a fost posibilă doar în mediu ușor acid și în cazul utilizării unui sistem tampon organic ușor alcalin. Diagramele ternare pot fi obținute pornind de la amestecuri inițiale conținând 0,032 g/dl atelocolagen, asociat cu, de exemplu, 0,040 g/dl hialuronat de sodiu, și 0,008 g/dl gelan.

6. Un alt pas important în realizarea obiectivelor propuse a realizarea de hidrogeluri pe bază de collagen și polizaharide (hialuronat de sodiu). Procesul de reticulare a avut loc cu un compus diepoxi, netoxic, cu moleculă suficient de mare pentru a asigura formarea unei rețele laxă și relativ flexibile.

7. Reacția de reticulare a fost confirmată prin analize spectroscopice (^1H -RMN). Gradul de substituție al collagenului a fost determinat prin calcularea grupărilor $\alpha\text{-NH}_2$ libere din hidrogeluri. Cantitatea de grupări aminice libere scade odată cu creșterea gradului de reticulare și a cantității de polizaharid din sistem.

8. Studiile reologice au confirmat faptul că pe toată gama de frecvențe baleiate (0,1–100 rad/sec), valorile modul de acumulare sunt superioare valorilor modulului de pierdere, confirmând comportamentul reologic de gel, pentru toate compozițiile studiate. De asemenea, valorile acestor parametri scad odată cu creșterea gradului de reticulare și a fracției de polizaharid în amestec (probabil ca urmare a formării de punți de reticulare suplimentare, cu participarea grupărilor reactive ale hialuronatului).

9. Adăugarea în sistem a hialuronatului de sodiu conduce la o creștere a temperaturii de denaturare spre deosebire de hidrogelurile pe bază numai de collagen (61 °C).

10. Microscopia electronică de baleiaj relevă faptul că apar diferențe semnificative între collagenul liofilizat, hidrogelurile collagenice reticulate și cele care conțin amestecuri reticulate de collagen și hialuronan. Acestea din urmă prezintă o structură poroasă mai uniformă, cu pori interconectați. În cazul hidrogelurilor mai puternic reticulate și în al celor cu fracții masice de hialuronat mai mari, dimensiunea porilor este mai mică, probabil datorită compactării sporite a amestecului.

11. Gradul de retenție a soluțiilor tampon fosfat este dependent de compoziția hidrogelurilor: creșterea cantității de BDDGE și implicit de NaHyal determină o scădere a hidrofiliei hidrogelului. Acestea se umflă foarte mult în primele minute datorită structurii morfologice,

urmată apoi de o creștere lentă până la aproximativ 3-4 ore, după care instalându-se o stare de echilibru.

12. S-a studiat capacitatea de încărcare și eliberare a Levofloxacinei (sare de sodiu) în/din structura hidrogelurilor. Mecanismul de încorporare a fost unul fizic. Eliberarea LVF s-a realizat pe o perioadă de 24 ore, cinetica de eliberare fiind controlată de procesul de difuzie.

13. Testele de citotoxicitate și studiile de viabilitate celulară au evidențiat faptul că materialele obținute nu sunt citotoxice și, mai mult decât atât, au capacitatea de a susține și de a favoriza proliferarea celulară. Rezultatele obținute relevă faptul că celulele se dezvoltă în interiorul materialelor fără a suferi modificări morfologice și structurale. În concluzie, cercetările efectuate au condus la rezultate ce permit afirmarea faptului că hidrogelurile obținute pe bază de collagen și collagen-hialuronat de sodiu pot fi utilizate cu succes în aplicații biomedicale.

Bibliografie selectivă

10. Y.-C. Lin, F. Tan, K.G. Marra, S.-S. Jan, D.-C. Liu, *Synthesis and characterization of collagen/hyaluronan/chitosan composite sponges for potential biomedical applications*, *Acta Biomaterialia*, 2009, 5, 2591–2600.
11. D. Puppi, F. Chiellini, A.M. Piras, E. Chiellini, *Polymeric materials for bone and cartilage repair*, *Progress in Polymer Science*, 2010, 35, 403–440.
12. A. Sionkowska, J. Skopinska-Wisniewska, M. Gawron, J. Kozłowska, A. Planecka, *Chemical and thermal cross-linking of collagen and elastin hydrolysates*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 47, 570–577.
13. <http://en.wikipedia.org/wiki/Scleroprotein>
14. D.A.D. Parry, J.M. Squire, *Fibrous proteins: new structural and functional aspects revealed*, în D.A.D. Parry, J.M. Squire, *Advances in protein chemistry: Fibrous proteins: coiled-coils, collagen and elastomers*, Elsevier Academic Press, 2005, 70, 1–10.
15. B. Brodsky, A.V. Persikov, *Molecular structure of the collagen triple helix*, în D.A.D. Parry, J.M. Squire, *Advances in protein chemistry: Fibrous proteins: coiled-coils, collagen and elastomers*, Elsevier Academic Press, 2005, 70, 301–339.
16. Z. Chen, X. Mo, C. He, H. Wang, *Intermolecular interactions in electrospun collagen-chitosan complex nanofibers*, *Carbohydrate Polymers*, 2008, 72, 410–418.
17. D.I. Zeugolis, R.G. Paul, G. Attenburrow, *Post-self-assembly experimentation on extruded collagen fibres for tissue engineering applications*, *Acta Biomaterialia*, 2008, 4, 1646–1656.
18. M.C. Popescu, C. Vasile, D. Macocinschi, M. Lungu, O. Crăciunescu, *Biomaterials based on new polyurethane and hydrolyzed collagen, k-elastin, hyaluronic acid and chondroitin sulfate*, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2010, 47(5), 646–653.
19. P. Fratzl, *Collagen: structure and mechanics, an Introduction*, în P. Fratzl, *Collagen structure and mechanics*, Springer Science+Business Media, 2008, 15–20; 1–6, ISBN: 978-0-387-73905-2.
20. L. Sang, X. Wang, Zh. Chen, J. Lu, Z. Gu, X. Li, *Assembly of collagen fibrillar networks in the presence of alginate*, *Carbohydrate Polymers*, 2010, 82, 1264–1270.
21. D. Velegol, F. Lanni, *Cell traction forces on soft biomaterials. I. Microrheology of type I collagen gels*, *Biophysical Journal*, 2001, 81, 1786–1792.
22. O. Latinovic, L.A. Hough, H.D. Ou-Yang, *Structural and micromechanical characterization of type I collagen gels*, *Journal of Biomechanics*, 2010, 43, 500–505.
23. M.M. Horn, V.C. Amaro Martins, A.M. de Guzzi Plepis, *Interaction of anionic collagen with chitosan: Effect on thermal and morphological characteristics*, *Carbohydrate Polymers*, 2009, 77, 239–243.
26. M.H. Uriarte-Montoya, J.L. Arias-Moscoso, M. Plascencia-Jatomea, H. Santacruz-Ortega, O. Rouzaud-Sández, J.L. Cardenas-Lopez, E. Marquez-Rios, J.M. Ezquerro-Brauer, *Jumbo squid (Dosidicus gigas) mantle collagen: Extraction, characterization, and potential application in the preparation of chitosan–collagen biofilms*, *Bioresource Technology*, 2010, 101, 4212–4219.

27. H.-O. Ho, L.-H. Lin, M.-T. Sheu, *Characterization of collagen isolation and application of collagen gel as a drug carrier*, Journal of Controlled Release, 1997, 44, 103–112.
28. A. Gautieri, S. Vesentini, F.M. Monteverchi, A. Redaelli, *Mechanical properties of physiological and pathological models of collagen peptides investigated via steered molecular dynamics simulations*, Journal of Biomechanics, 2008, 41, 3073–3077.
29. E.Y. Jones, A. Miller, *Analysis of structural design features in collagen*, Journal of Molecular Biology, 1991, 218(1), 209–219.
30. O.S. Rabotyagova, P. Cebe, D.L. Kaplan, *Collagen structural hierarchy and susceptibility to degradation by ultraviolet radiation*, Materials Science and Engineering C, 2008, 28, 1420–1429.
31. J. Bella, B. Brodsky, H.M. Bermanl, *Hydration structure of a collagen peptide*, Structure, 1995, 3(9), 893–90.
32. M.C. Gómez-Guillén, B. Giménez, M.E. López-Caballero, M.P. Montero, *Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review*, Food Hydrocolloids, 2011, 25(8), 1813–1827.
33. S. Ricard-Blum, F. Ruggiero, *The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane*, Pathologie Biologie, 2005, 53, 430–442.
34. A. Rich, *The Molecular Structure of Collagen*, Journal of Molecular Biology, 1961, 3, 483–506.
35. L.S. Nair, C.T. Laurencin, *Biodegradable polymers as biomaterials*, Progress in Polymer Science, 2007, 32, 762–798.
69. D. Stamov, M. Grimmer, K. Salchert, Ti. Pompe, C. Werner, *Heparin intercalation into reconstituted collagen I fibrils: Impact on growth kinetics and morphology*, Biomaterials, 2008, 29, 1–14.
72. S.-W. Tsai, Y.-H. Cheng, Y. Chang, H.-L. Liu, W.-B. Tsai, *Type I collagen structure modulates the behavior of osteoblast-like cells*, Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers, 2010, 41, 247–251.
73. W. Friess, M. Schlapp, *Effects of processing conditions on the rheological behavior of collagen dispersions*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2001, 51, 259–265.
75. K. Nam, T. Kimura, S. Funamoto, A. Kishida, *Preparation of a collagen/polymer hybrid gel for tissue membranes. Part II: In vitro and in vivo biological properties of the collagen gels*, Acta Biomaterialia, 2010, 6, 409–417.
79. M. Zhang, Y. Chen, G. Li, Z. Du, *Rheological properties of fish skin collagen solution: Effects of temperature and concentration*, Korea-Australia Rheology Journal, 2010, 22(2), 119–127.
80. G. Lai, Y. Li, G. Li, *Effect of concentration and temperature on the rheological behavior of collagen solution*, International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 42, 285–291.

81. R.C. Santana, F.A. Perrechil, A.C.K. Sato, R.L. Cunha, *Emulsifying properties of collagen fibers: Effect of pH, protein concentration and homogenization pressure*, Food Hydrocolloids, 2011, 25(4) 604–612.
131. Y. Yang, L.J. Kaufman, *Rheology and Confocal Reflectance Microscopy as Probes of Mechanical Properties and Structure during Collagen and Collagen/Hyaluronan Self-Assembly*, Biophysical Journal, 2009, 96, 1566–1585.
135. S. Ibrahim, C.R. Kothapalli, Q.K. Kang, A. Ramamurthi, *Characterization of glycidyl methacrylate – Crosslinked hyaluronan hydrogel scaffolds incorporating elastogenic hyaluronan oligomers*, Acta Biomaterialia, 2011, 7, 653–665.
144. T. Coviello, P. Matricardi, C. Marianecchi, F. Alhaique, *Polysaccharide hydrogels for modified release formulations*, Journal of Controlled Release, 2007, 119, 5–24.
150. H.K. Can, B.K. Denizli, A. Güner, Z.M.O. Rzaev, *Effect of functional crosslinking agents on preparation and swelling properties of dextran hydrogels*, Carbohydrate Polymers, 2005, 59, 51–56.
171. S.S. Silva, B.J. Goodfellow, J. Benesch, J. Rocha, J.F. Mano, R.L. Reis, *Morphology and miscibility of chitosan/soy protein blended membranes*, Carbohydrate Polymers, 2007, 70, 25–31.
178. V. Ducel, D. Pouliquen, J. Richard, F. Boury, *¹H NMR relaxation studies of protein–polysaccharide mixtures*, International Journal of Biological Macromolecules, 2008, 43, 359–366.
200. L. Ma, C. Gao, Z. Mao, J. Zhou, J. Shen, X. Hu, C. Han, *Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering*, Biomaterials, 2003, 24, 4833–4841.
203. W.Y. Chen, G. Abatangelo, *Functions of hyaluronan in wound repair*, Wound Repair and Regeneration, 1999, 7, 79–89.
204. L. Lapcik, S. De Smedt, J. Demeester, P. Chabreck, *Hyaluronan: preparation, structure, properties, and applications*, Chemical Reviews, 1998, 98, 2663–84.
205. Y.K. Lin, D.C. Liu, *Studies of novel hyaluronic acid–collagen sponge materials composed of two different species of type I collagen*, Journal of Biomaterials Applications, 2007, 21, 265–281.
206. K. Pietrucha, *Changes in denaturation and rheological properties of collagen– hyaluronic acid scaffolds as a result of temperature dependencies*, International Journal of Biological Macromolecules, 2005, 36, 299–304.
207. A. Guiseppi-Elie, *Electroconductive hydrogels: synthesis, characterization and biomedical applications*, Biomaterials, 2010, 31, 2701–2716.
208. O. Wichterle, D. Lim, *Hydrophilic gels for biologic use*, Nature, 1960, 185, 117–118.
209. L. Klouda, A.G. Mikos, *Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2008, 68, 34–45.
210. Y.E. Shapiro, *Structure and dynamics of hydrogels and organogels: An NMR spectroscopy approach*, Progress in Polymer Science, 2011, 36, 1184– 1253.

211. C. Branca, S. Magazù, G. Maisano, L. Auditore, R.C. Barnà, D. De Pasquale, U. Emanuele, A. Trifirò, M. Trimarchi, *Synthesis of polyethylene oxide hydrogels by electron radiation*, Journal of Applied Polymer Science, 2006, 102, 820–824.
212. Y. Ogushi, S. Sakai, K. Kawakami, *Synthesis of enzymatically-gellable carboxymethylcellulose for biomedical applications*, Journal Of Bioscience And Bioengineering, 2007, 104(1), 30–33.
213. S.R. Van Tomme, G. Storm, W.E. Hennink, *In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications*, International Journal of Pharmaceutics, 2008, 355, 1–18.
214. A. Stathopoulos, P. Klonos, A. Kyritsis, P. Pissis, C. Christodoulides, J.C. Rodriguez Hernández, M. Monleón Pradas, J.L. Gómez Ribelles, *Water sorption and polymer dynamics in hybrid poly(2-hydroxyethyl-co-ethyl acrylate)/silica hydrogels*, European Polymer Journal, 2010, 46, 101–111.
215. Da-yong Teng, Z.-ming Wu, X.-ge Zhang, Y.-xia Wang, C. Zheng, Z. Wang, C.-xing Li, *Synthesis and characterization of in situ cross-linked hydrogel based on self-assembly of thiol-modified chitosan with PEG diacrylate using Michael type addition*, Polymer, 2010, 51, 639–646.
216. V. Dulonga, S. Lack, D. Le Cerf, L. Picton, J.P. Vannier, G. Muller, *Hyaluronan-based hydrogels particles prepared by crosslinking with trisodium trimetaphosphate. Synthesis and characterization*, Carbohydrate Polymers, 2004, 57, 1–6.
217. K.T. Nguyen, J.L. West, *Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications*, Biomaterials, 2002, 23, 4307–4314.
218. X.Z. Shu, Y. Liu, F.S. Palumbo, Y. Luo, G.D. Prestwich, *In situ crosslinkable hyaluronan hydrogels for tissue engineering*, Biomaterials, 2004, 25, 1339–1348.
222. Z.M. Wu, X.G. Zhang, C. Zheng, C.X. Li, S.M. Zhang, R.N. Dong, D.M. Yu, *Disulfide-crosslinked chitosan hydrogel for cell viability and controlled protein release*, European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2009, 37, 198–206.
223. A.K. Jha, X. Xu, R.L. Duncan, X. Jia, *Controlling the adhesion and differentiation of mesenchymal stem cells using hyaluronic acid-based, doubly crosslinked networks*, Biomaterials, 2011, 32, 2466–2478.
224. N.C. Hunt, A.M. Smith, U. Gbureck, R.M. Shelton, L.M. Grover, *Encapsulation of fibroblasts causes accelerated alginate hydrogel degradation*, Acta Biomaterialia, 2010, 6, 3649–3656.
225. J. Carvalho, S. Moreira, J. Maia, F.M. Gama, *Characterization of dextrin-based hydrogels: Rheology, biocompatibility, and degradation*, Journal of Biomedical Materials Research Part A, 2010, 93(1), 389–399.
234. J.M. Rosiak, F. Yoshii, *Hydrogels and their medical applications*, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 1999, 151, 56–64.
270. X. Zhu, P. Lu, W. Chen, J. Dong, *Studies of UV crosslinked poly(N-vinylpyrrolidone) hydrogels by FTIR, Raman and solid-state NMR spectroscopies*, Polymer, 2010, 51, 3054–3063.

271. S. Lack, V. Dulong, D. Le Cerf, L. Picton, J.F. Argillier, G. Muller, *Hydrogels Based on Pullulan Crosslinked with sodium trimetaphosphate (STMP): Rheological study*, Polymer Bulletin, 2004, 52, 429–436.
272. D.M. Devine, S.M. Devery, J.G. Lyons, L.M. Geever, J.E. Kennedy, C.L. Higginbotham, *Multifunctional polyvinylpyrrolidinone-polyacrylic acid copolymer hydrogels for biomedical applications*, International Journal of Pharmaceutics, 2006, 326, 50–59.
292. R. Zeeman, P.J. Dijkstra, P.B. van Wachem, M.J.A. van Luyn, M. Hendriks, P.T. Cahalan, J. Feijen, *Cross-linking and calcification of collagen-based materials*, in R. Zeeman, *Cross-linking of collagen-based materials*, Press: Febodruk BV., Enschede, The Netherlands, 1998, 9–34.
293. R. Zeeman, P.J. Dijkstra, P.B. van Wachem, M.J.A. van Luyn, M. Hendriks, P.T. Cahalan, J. Feijen, *Cross-linking and modification of dermal sheep collagen using 1,4-butanediol diglycidyl ether*, in R. Zeeman, *Cross-linking of collagen-based materials*, Press: Febodruk BV., Enschede, The Netherlands, 1998, 35–52.
294. S.S. Maier, N. Badea, V. Maier, M. Pruneanu, Romanian Patent RO123256 B1 / 2011.
295. S.S. Maier, V. Maier, M. Pruneanu, C.M. Ignat, Romanian Patent RO126403 A2 / 2009.
306. R. Langer, D.A. Tirrell, *Designing materials for biology and medicine*, Nature, 2004, 428, 487–492.
307. H. Ghazarian, B. Idoni, S.B. Oppenheimer, *A glycobiology review: Carbohydrates, lectins and implications in cancer therapeutics*, Acta Histochemica, 2011, 113, 236–247.
308. B. Leitinger, E. Hohenster, *Mammalian collagen receptors*, Matrix Biology, 2007, 26, 146–155.
312. R. Tenni, M. Sonaggere, M. Viola, B. Bartolini, M. Enrica Tira, A. Rossi, E. Orsini, A. Ruggeri, V. Ottani, *Self-aggregation of fibrillar collagens I and II involves lysine side chains*, Micron, 2006, 37, 640–647.
313. F. Gobeaux, G. Mosser, A. Anglo, P. Panine, P. Davidson, M.-M. Giraud-Guille, E. Belamie, *Fibrillogenesis in Dense Collagen Solutions: A Physicochemical Study*, Journal of Molecular Biology, 2008, 376, 1509–1522.
- 131.Y. Yang, L.J. Kaufman, *Rheology and Confocal Reflectance Microscopy as Probes of Mechanical Properties and Structure during Collagen and Collagen/Hyaluronan Self-Assembly*, Biophysical Journal, 2009, 96, 1566–1585.
314. R.G. Jones, C.K. Ober, P. Hodge, P. Kratochvil, G. Moad, M. Vert, *Terminology for selfassembly and aggregation of polymers (IUPAC Provisional Recommendations)*, http://www.iupac.org/fileadmin/user_upload/publications/recommendations/jones_prs.pdf.
315. H. Lenormand, B. Deschrevel, J.-C. Vincent, *Chain length effects on electrostatic interactions between hyaluronan fragments and albumin*, Carbohydrate Polymers, 2010, 82, 887–894.
316. S.L. Turgeon, C. Schmitt, C. Sanchez, *Protein-polysaccharide complexes and coacervates*, Current Opinion in Colloid and Interface Science, 2007, 12, 166–178.

317. G.-K. Tana, D.L.M. Dinnes, J.J. Cooper-White, Modulation of collagen II fiber formation in 3-D porous scaffold environments, *Acta Biomaterialia*, 2011, 7, 2804–2816.
318. S. Jacquier, F. Gruy, Application of scattering theories to the characterization of precipitation processes, in: *Light Scattering Reviews 5: Single Light Scattering and Radiative Transfer*, A.A. Kokhanovski (Ed.), Springer-Verlag, Berlin, 2010, 37–79.
319. A. Cesàro, A. Gamini, L. Navarini, Supramolecular structure of microbial polysaccharides in solution: from chain conformation to rheological properties, *Polymer*, 1992, 33, 4001–4008.
320. M.R. Kasaai, Calculation of Mark-Houwink-Sakurada (MHS) equation viscometric constants for chitosan in any solvent-temperature system using experimental reported viscometric constants data, *Carbohydrate Polymers*, 2007, 68, 477–488.
325. V. Tolstoguzov, Compositions and Phase Diagrams for Aqueous Systems Based on Proteins and Polysaccharides, in: *Microcompartmentation and Phase Separation in Cytoplasm*, International Review of Cytology, vol. 192, H. Walter, D.E. Brooks, P.A. Sreere (Eds.), Academic Press, San Diego, Canada, 2000, 3–32.
326. P. Uppamoochikkal, S. Tristram-Nagle, J.F. Nagle, Orientation of Tie-Lines in the Phase Diagram of DOPC/DPPC/Cholesterol Model Biomembranes, *Langmuir*, 2010, 26, 17363–17368.
327. V. Tolstoguzov, Food Polymers, in: *Food Materials Science. Principles and Practice*, J.M. Aguilera, P.J. Lillford (Eds.), Springer, New York, 2008, 21–44.
328. S. Ibrahim, C.R. Kothapalli, Q.K. Kang, A. Ramamurthi, Characterization of glycidyl methacrylate – crosslinked hyaluronan hydrogel scaffolds incorporating elastogenic hyaluronan oligomers, *Acta Biomaterialia*, 2011, 7, 653–665.
329. Y. Guo, T. Yuan, Z. Xiao, P. Tang, Y. Xiao, Y. Fan, X. Zhang, Hydrogels of collagen/chondroitin sulfate/hyaluronan interpenetrating polymer network for cartilage tissue engineering, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2012, 23(9), 2267–2279.
330. B. Leitinger, E. Hohenster, *Mammalian collagen receptors*, *Matrix Biology*, 2007, 26, 146–155.
331. L. Galois, S. Hutasse, D. Cortial, C. F. Rousseau, L. Grossin, M.-C. Ronziere, D. Herbage, A.-M. Freyria, *Bovine chondrocyte behavior in three-dimensional type I collagen gel in terms of gel contraction, proliferation and gene expression*, *Biomaterials*, 2006, 27, 79–90.
332. J.W. Kuo, *Practical Aspects of Hyaluronan Based Medical Products*, Boca Raton, 2006, FL: CRC Press.
333. J.Y. Lee, P.A. Spicer, *Hyaluronan: a multifunctional, megaDalton, stealth molecule*, *Current Opinion in Cell Biology*, 2000, 12, 581–586.
334. A. Tampieri, M. Sandri, E. Landi, D. Pressato, S. Francioli, R. Quarto, I. Martin, Design of graded biomimetic osteochondral composite scaffolds, *Biomaterials*, 2008, 29, 3539–3546.
337. F. Everaerts, M. Torrianni, M. van Luyn, P. van Wachem, J. Feijen, M. Hendriks, *Reduced calcification of bioprostheses prepared with an improved carbodiimide based cross-linking method*, *Biomaterials*, 2004, 25, 5523–5530.

338. N. Kathuria, A. Tripathi, K.K. Kar, A. Kumar, *Synthesis and characterization of elastic and macroporous chitosan–gelatin cryogels for tissue engineering*, Acta Biomaterialia, 2009, 5, 406–418.
339. Standard Practice for Direct Contact Cell Culture Evaluation of Materials for Medical Devices, Retrived from <http://www.astm.org/Standards/F813.htm>.
340. B. Martin-Martin, V.Tovell, A.H. Dahlmann-Noor, P.T. Khaw, M. Bailly, *The effect of MMP inhibitor GM6001 on early fibroblast-mediated collagen matrix contraction is correlated to a decrease in cell protrusive activity*, European Journal of Cell Biology, 2011, 90, 26–36.
341. L.A. Reis, L.L.Y. Chiu, Y. Liang, K. Hyunh, A. Momen, M. Radisic, *A peptide-modified chitosan-collagen hydrogel for cardiac cell culture and delivery*, Acta Biomaterialia, 2012, 8, 1022–1036.

Diseminarea rezultatelor obținute

Lucrări publicate sau trimise spre publicare:

Enzyme-Assisted Purification Of Denatured Atelocollagen, Using Pronase As Scavenging Agent, S.S. Maier, Vasilica Maier, M. Popa, **Cristina-Mihaela Ignat**, Revista Medico-Chirurgicală a Societății de Medici și Naturaliști din Iași, numărul 4, volumul 114/2010 , pag. 1232-1239, ISSN: 0048-7848, **lucrare tip BDI**.

Engineering preliminaries to obtain reproducible mixtures of atelocollagen and polysaccharides, **Cristina-Mihaela Lefter**, Stelian Sergiu Maier, Vasilica Maier, Marcel Popa, Jacques Desbrieres – trimisă spre publicare la revista Materials Science and Engineering C (2012) – revistă ISI.

Atelocollagen – hyaluronan conjugates cross-linked with a short chain di-oxirane compound, **Cristina-Mihaela Lefter**, Stelian Sergiu Maier, Vasilica Maier, Marcel Popa, Jacques Desbrieres, Maria Butnaru, Constanța Ibănescu, Maricel Danu – trimisă spre publicare – revistă ISI.

Brevete:

Procedeul pentru extracția și purificarea atelocolagenului biologic activ, Maier Stelian Sergiu, Maier Vasilica, Pruneanu Melida, **Ignat Cristina Mihaela**, nr. cerere A/01018 din 4.12.2009.

Compoziții vitrigelifiabile și procedeu pentru obținerea vitrigelurilor cu aplicații biomedicale, Maier Stelian Sergiu, Maier Vasilica, David Geta, Popa Marcel, **Lefter (Ignat) Cristina Mihaela**, nr. cerere A/01231 din 29.11.2010.

Participarea la manifestări științifice naționale și internaționale:

Comunicări orale:

Vitrifiable Collagen – Polysaccharides Hydrogels as Potential Scaffold for Tissue Engineering, **C.M. Ignat (Lefter)**, S. Maier, M. Popa, J. Desbrieres, V. Maier, a 24-a Conferința Europeană de Biomateriale, ESB 4-8 Septembrie 2011, Dublin, Irlanda.

New nanocapsules based on chitosan and poly(N-vinylpyrrolidone-alt-itaconic anhydride for drug delivery, D.M. Iurea(Rață), M. Popa, A.N. Cadinoiu, **C.M. Ignat (Lefter)**, C.A. Peptu – comunicare orală în secțiunea Introduction to Poster Session, Workshop-ul International: *Career in Polymers IV* , în perioada 29 iunie – 30 iunie 2012, organizatori: Institute of Macromolecular Chemistry, Praga, Cehia și Central and East European Polymer Network.

Postere:

Atelocollagen-poly(ϵ -caprolactone) substrates for tissue engineering, S.S. Maier, G. David, V. Maier, V. Musteata, **C. Ignat**, la 4th International Conference „Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices” BiomMedD’2010, 23-25 Septembrie 2010, Sinaia, România.

Vitrifiable Collagen – Polysaccharides Hydrogels as Potential Scaffold for Tissue Engineering, **C.M. Ignat (Lefter)**, S. Maier, M. Popa, J. Desbrieres, V. Maier, a 24-a Conferința Europeană de Biomateriale, ESB 4-8 Septembrie 2011, Dublin, Irlanda.

Polyurethane-nystatin formulations for sustained delivery in blood-contact applications: influence of urethane groups concentration, M. Mândru, M-E Ignat, **C.M. Ignat**, M. Popa, L. Vereștiuc, M. Butnaru, C. Ciobanu, a 24-a Conferința Europeană de Biomateriale, ESB 4-8 Septembrie 2011, Dublin, Irlanda.

La co-structuration du collagène et hyaluronane par réticulation à l'aide des composants di-oxiranique à chaîne courte, S. Maier, **C.M. Ignat (Lefter)**, M. Popa, J. Desbrieres, V. Maier, Al X-lea Colocviu Franco-Roman al Polimerilor, 6-8 Septembrie 2011, Douai, Franța.

New nanocapsules based on chitosan and poly(N-vinylpyrrolidone-alt-itaconic anhydride for drug delivery, D.M. Iurea(Rață), M. Popa, A.N. Cadinoiu, **C.M. Ignat (Lefter)**, C.A. Peptu – poster in secțiunea Poster Session, Workshop-ul International: *Career in Polymers IV* , în perioada 29 iunie – 30 iunie 2012, organizatori: Institute of Macromolecular Chemistry, Praga, Cehia și Central and East European Polymer Network.

Phase equilibria in atelocollagen – polysaccharide colloidal systems applicable for scaffolds producing, S.S. Maier, V. Maier, C.M. Lefter, M. Popa, 5th International Conference „Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices” BiomMedD’2012, 29 August – 1 Septembrie 2012, Constanța, România.

Premii obținute la manifestări științifice

Premiul „Rudolfs Cimdins Travel award” obținut la a 24-a Conferința Europeană de Biomateriale, ESB, 4-8 Septembrie 2011, Dublin, Irlanda.

Membru în echipe ale contractelor de cercetare

IDEI, ID_318, nr. 675 / 19 ianuarie 2009, Analogi chemo- și morfo-mimetici ai matricei extracelulare, ce includ biopolimeri, Ministerul Educației și Cercetării, România.