



UNIVERSITATEA TEHNICĂ „GHEORGHE ASACHI” DIN IAȘI
FACULTATEA DE INGINERIE CHIMICĂ ȘI PROTECȚIA MEDIULUI



Biomateriale polimerice pentru utilizare ca micromedii în ingineria tisulară

-Rezumatul tezei de doctorat-

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC

Prof. *em.* dr. ing. dr. h.c. Popa Marcel

DOCTORAND:

Bioing. Butnariu (Luca) Andreea

UNIVERSITATEA TEHNICĂ "GHEORGHE ASACHI" DIN IAȘI

RECTORATUL

Către

Vă facem cunoscut că, în ziua de 24.11.2016 la ora 11.00, în Sala de Conferințe a Universității „Gheorghe Asachi” din Iași, corp T, va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată:

„Biomateriale polimerice pentru utilizare ca micromedii în ingineria tisulară”

elaborată de doamna bioinginer **Butnariu Andreea (căs. Luca)** în vederea conferirii titlului științific de doctor.

Comisia de doctorat este alcătuită din:

- | | |
|--|------------------------|
| 1. Prof. dr. ing. Silvia CURTEANU , Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași | președinte |
| 2. Prof. em. dr. ing. Marcel POPA , Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași | conducător de doctorat |
| 3. Prof. dr. ing. Ecaterina ANDRONESCU , Universitatea „Politehnica” din București | referent oficial |
| 4. Prof. dr. ing. Jacques DESBRIERES , Université de Pau et des Pays de l'Adour, Franța | referent oficial |
| 5. Conf. dr. ing. Sergiu Stelian MAIER , Universitatea Tehnică „Gheorghe Asachi” din Iași | referent oficial |

Cu această ocazie vă invităm să participați la susținerea publică a tezei de doctorat.

RECTOR,

Prof.univ.dr.ing. **DAN CAȘCAVAL**



Secretar universitate,

Ing. Cristina Nagiț

Mulțumiri

Încep această teză prin a-i mulțumi domnului Prof. dr. ing. Popa Marcel care, în calitate de conducător științific, m-a îndrumat și sprijinit prin sfaturile și experiența dumnealui pentru a putea trece de toate etapele pe care le presupune o cercetare așa cum este cea din cadrul doctoratului.

Doresc să le mulțumesc pentru timpul acordat analizei manuscrisului acestei teze distinșilor membri ai comisiei prezidate de Doamna prof. dr. ing. Silvia Curteanu: Doamna prof. dr. ing. Ecaterina Andronescu, Domnul prof. dr. ing. Jacques Desbrieres, Domnului conf. dr. ing. Sergiu Stelian Maier.

Cu deosebită considerație doresc să mulțumesc Doamnei conf. dr. biolog Butnaru Maria pentru contribuția esențială pe care a avut-o la realizarea acestei teze și în egală măsură la formarea mea pe plan profesional.

De asemenea, cu deosebită considerație doresc să îi mulțumesc Domnului conf. dr. ing. Sergiu Stelian Maier fără de care această teză nu ar fi fost completă. Contribuția dumnealui a fost esențială în realizarea cercetărilor complexe din cadrul tezei.

Le mulțumesc Doamnei prof. univ. dr. Liliana Vereștiuc și Doamnei șef lucrări dr. ing. Vasilica Maier pentru îndrumare și sprijin.

Le mulțumesc colegilor cu care am împărtășit experiența doctoratului.

Nu în ultimul rând doresc să mulțumesc familiei, părinților mei pentru susținerea necondiționată și pentru educația pe care mi-au oferit-o și soțului meu pentru răbdarea, dragostea și sprijinul acordat.

CUPRINS

Introducere	5
STUDIU DE LITERATURĂ	8
Capitolul I: Hidrogeluri pentru imobilizarea (încapsularea) celulelor	8
I.1 Metode de reticulare pentru obținerea hidrogelurilor cu celule încapsulate	9
I.1.1 Reticularea chimică	10
I.1.2 Reticularea fizică	12
I.2 Scopul încapsulării celulelor în hidrogeluri	12
I.3 Condiții pentru încapsularea celulelor	15
Capitolul II: Hidrogeluri din polimeri naturali	18
II.1 Componenta proteică a hidrogelurilor: colagenul	18
II.1.1 Colagenul – structură și surse	18
II.1.2 Formele de colagen fibrilar	19
II.1.3 Interacțiunea colagenului cu celulele	20
II.1.4 Biodegradabilitatea colagenului	21
II.1.5 Metode de reticulare a colagenului	23
II.1.6 Difuzia biomoleculelor prin hidrogeluri pe bază de colagen	26
II.1.7 Aplicații ale hidrogelurilor pe bază de colagen	27
II. 2 Componenta polizaharidică a hidrogelurilor	29
II.2.1 Gellanul – utilizare în ingineria tisulară	29
II.2.2 Pullulanul – utilizare în ingineria tisulară	32
II.2.3 Chitosanul – utilizare în ingineria tisulară	34
II.2.4 Acidul hialuronic	36
II.2.5 Oxidarea polizaharidelor	37
II.2.6 Cinetica oxidării polizaharidelor	39
II.2.7 Avantajele reticulării colagenului cu polizaharide parțial oxidate	40
Capitolul III: Aplicații ale hidrogelurilor în ingineria tisulară a ovarului	41
III.1 Hidrogeluri utilizate în ingineria tisulară a ovarului	41
III. 2 Steroidogeneza foliculară	42
III.3 Interacțiuni între celulele ovarului	43
Scopul și obiectivele tezei	47
REZULTATE PROPRII	48
Capitolul IV: Materiale și metode	48
IV.1 Materiale	49

IV.1.1 Atelocolagen	49
IV.1.2 Gellan	50
IV.1.3 Pullulan	52
IV.1.4 Chitosan	53
IV.1.5 Hialuronat de sodiu	53
IV.2 Metode	54
IV.2.1 Oxidarea polizaharidelor	54
IV.2.1.1 Determinarea substanței uscate a soluțiilor de atelocolagen și polizaharide	54
IV.2.1.2 Oxidarea gellanului și a pullulanului	55
IV.2.1.3 Oxidarea chitosanului	56
IV.2.1.4 Determinarea conținutului de grupări aldehidice în polizaharidele oxidate	57
IV.2.1.5 Determinarea distribuției maselor moleculare prin SEC/GPC	59
IV.2.2 Obținerea și caracterizarea fizico-chimică a hidrogelurilor	60
IV.2.2.1 Obținerea hidrogelurilor	60
IV.2.2.2 Caracterizarea spectrală a produșilor de oxidare ai polizaharidelor	63
IV.2.2.3 Determinarea conținutului de grupări aminice din hidrogeluri	64
IV.2.2.4 Uscarea la punctul critic	65
IV.2.2.5 Caracterizarea morfologică a hidrogelurilor prin microscopie electronică de baleiaj	66
IV.2.2.6 Difuzia albuminei și glucozei prin hidrogeluri	66
IV.2.2.7 Degradarea enzimatică a hidrogelurilor	68
IV.2.2.8 Determinarea caracteristicilor reologice ale hidrogelurilor	70
IV.2.3 Caracterizarea biologică a hidrogelurilor	75
IV.2.3.1 Testarea citotoxicității hidrogelurilor – metoda MTT	75
IV.2.3.2 Metoda de încapsulare a celulelor în hidrogeluri	80
IV.2.3.3 Analiza proliferării celulare cu ajutorul testului AlamarBlue	82
IV.2.3.4 Determinarea lactat dehidrogenazei în mediul de cultură ca indicator al integrității membranare	84
IV.2.3.5 Analiza contracției hidrogelurilor cu fibroblaste încapsulate	85
IV.2.3.6 Microscopia de fluorescență	86
IV.2.3.7 Testul live/dead	88
IV.2.3.8 Eliberarea celulelor din hidrogeluri	88

IV.2.3.9 Testarea <i>in vivo</i> a citocompatibilității sistemelor hidrogel-celule	89
IV.2.3.10 Analiza histologică	89
IV.2.3.11 Detectarea secreției de estradiol în mediul de cultură	90
IV.2.3.12 Criostocarea hidrogelurilor cu celule încapsulate	90
Capitolul V: Rezultate și discuții	92
V.1 Caracterizarea fizico-chimică a hidrogelurilor	92
V.1.1 Frația masică a componentelor macromoleculare ale hidrogelurilor	92
V.1.2 Evidențierea funcționalizării exopolizaharidelor prin oxidare	93
V.1.3 Conținutul de grupări aldehydice în polizaharidele oxidate	97
V.1.4 Distribuția maselor moleculare ale polizaharidelor oxidate	98
V.1.5 Evidențierea reticulării chimice induse de polizaharidele oxidate	99
V.1.6 Morfologia hidrogelurilor observată prin SEM	103
V.1.7 Biodegradabilitatea hidrogelurilor	104
V.1.8 Difuzia prin hidrogeluri	106
V.1.9 Caracteristicile reologice ale hidrogelurilor	110
V.2. Caracterizarea biologică a hidrogelurilor	129
V.2.1 Citotoxicitatea hidrogelurilor	129
V.2.1.1 Testul MTT	129
V.2.2.2 Testul live/dead	132
V.2.2 Morfologia celulelor tecal-interstițiale și granuloase izolate	134
V.2.3 Capacitatea proliferării celulare în hidrogeluri	136
V.2.4 Detectarea lactat dehidrogenazei în mediul de cultură	138
V.2.5 Analiza contracției hidrogelurilor cu fibroblaste încapsulate	139
V.2.6 Morfologia și distribuția celulelor în hidrogeluri	141
V.2.7 Eliberarea celulelor din hidrogeluri	143
V.2.8 Analiza histologică și implantarea subcutanată a hidrogelurilor	146
V.3 Aplicații ale hidrogelurilor cu celule încapsulate	148
V.3.1 Aplicații în ingineria tisulară a ovarului	148
V.3.2 Criostocarea hidrogelurilor	149
Concluzii	151
Bibliografie	153
Activitatea științifică	171

Introducere

Unul dintre obiectivele principale ale ingineriei tisulare este dezvoltarea de strategii pentru regenerarea de țesuturi funcționale, sănătoase ce pot fi utilizate ca grefe tisulare sau chiar pentru înlocuirea de organe. Acest obiectiv poate fi îndeplinit în prezența a trei elemente esențiale: matricile care susțin creșterea celulară în vederea regenerării țesuturilor, celulele care duc la generarea de țesuturi noi și factorii bioactivi implicați în proliferarea celulară, care trebuie să aibă posibilitatea de a difuza înspre și dinspre matrice în vederea asigurării funcționării normale a celulelor.

Sistemele de cultură tridimensionale sunt realizate astfel încât să copie funcția biologică și mecanică a matricii extracelulare (ECM) native regăsită la nivelul țesuturilor din organism, având astfel rol de ECM artificială. În acest context hidrogelurile care asigură un conținut ridicat de apă și proprietăți de elasticitate specifice țesuturilor reprezintă o variantă potrivită pentru cultivarea celulelor în condiții cât mai apropiate de cele naturale. În același timp, hidrogelurile reprezintă un suport adecvat pentru imobilizarea de celule și pentru menținerea viabilității, dar și a fenotipului acestora, oferind un micromediu tridimensional pentru acestea prin reproducerea cât mai fidelă *in vitro* a condițiilor care duc la stimularea proliferării celulare, a diferențierii și regenerării. Cu toate acestea, multe dintre aceste sisteme de tip hidrogel sunt dezvoltate prin reticulare sub acțiunea radiației UV sau necesită reacții chimice de modificare desfășurate în cadrul mai multor etape, cu purificare ulterioară, lucru ce ridică probleme de siguranță, citotoxicitate și de cost, întrucât presupun metode de preparare complexe, de cele mai multe ori agenții chimici utilizați fiind incompatibili cu viabilitatea celulelor.

În cadrul acestei teze, atelocolagenul a fost propus ca element structural de bază în vederea obținerii unor hidrogeluri compatibile cu încapsularea celulară.

Scopul acestei teze a fost obținerea unor noi hidrogeluri pe bază de atelocolagen și polizaharide, care să permită încapsularea celulelor primare de tipul fibroblastelor, celulelor stem derivate din țesutul adipos sau celulelor izolate din stroma ovariană, de tipul celulelor tecal-interstițiale și granuloase. Polizaharidele (gellan, pullulan, chitosan) au în cadrul acestor hidrogeluri atât rol structural, cât și rol de reticulant, reticularea realizându-se în urma interacțiunii atelocolagenului cu polizaharidele funcționalizate prin oxidare parțială.

Teza de doctorat este structurată pe cinci capitole, după cum urmează:

Studiul de literatură este desfășurat pe trei capitole ce abordează tema hidrogelurilor utilizate pentru încapsularea celulelor, cu accent pe condițiile pe care componentele hidrogelurilor trebuie să le îndeplinească pentru a putea fi utilizate în contact direct cu celulele.

În **Capitolul II** sunt prezentate datele actuale despre cele două componente principale ale hidrogelurilor obținute în cadrul tezei, respectiv collagenul și polizaharidele, fiind evidențiate aplicațiile din cadrul ingineriei tisulare în care au fost utilizate acestea, importanța difuziei macromoleculelor prin hidrogeluri și cinetica de oxidare a polizaharidelor. De asemenea sunt puse în evidență avantajele reticulării collagenului cu polizaharide parțial oxidate. **Capitolul III** abordează subiectul aplicațiilor hidrogelurilor în ingineria tisulară a ovarului, acest capitol având ca scop evidențierea caracterului aplicativ al hidrogelurilor obținute în cadrul tezei, ca matrici bioactive în ingineria tisulară a țesuturilor moi.

Studiul de literatură este urmat de expunerea obiectivelor principale și secundare ale tezei.

Rezultatele proprii sunt prezentate în cadrul a două capitole. Primul dintre acestea, **Capitolul IV**, este cel al materialelor și metodelor utilizate în vederea obținerii și caracterizării hidrogelurilor obținute prin reticularea atelocolagenului cu polizaharide parțial oxidate. Metodele de caracterizare sunt desfășurate pe două subcapitole principale, respectiv caracterizarea fizico-chimică a hidrogelurilor (analize chimice și de RMN pentru evidențierea oxidării polizaharidelor și reticulării, caracterizare reologică, difuzie, SEM) și caracterizarea biologică a acestora (MTT, AlamarBlue, live/dead, histologie *in vitro* și *in vivo*).

Capitolul V cuprinde rezultatele originale obținute în cadrul tezei, acestea fiind desfășurate de asemenea pe două subcapitole principale ce descriu rezultatele obținute în urma caracterizării fizico-chimice și biologice a hidrogelurilor. Capitolul V se încheie cu un subcapitol ce abordează aspectul aplicativ al hidrogelurilor în ingineria tisulară a ovarului și ca sisteme „ready-to-use” datorită posibilității de criostocare a acestora.

Teza se încheie cu partea de **Concluzii, Bibliografie și Activitatea științifică.**

Obiectivele tezei

Obiectivul principal acestei lucrări îl constituie obținerea și caracterizarea unor noi hidrogeluri care să permită încapsularea *in situ* a celulelor primare (fibroblaste dermice, celule stem derivate din țesut adipos, celule tecal-interstițiale și granuloase din stroma ovariană) pentru realizarea unor structuri cu aplicații în ingineria tisulară a țesuturilor moi, respectiv a țesutului stromal.

Pentru îndeplinirea obiectivului principal, au fost stabilite următoarele obiective secundare:

- ✓ selectarea și testarea unor noi hidrogeluri pe bază de atelocolagen și polizaharide parțial oxidate (gellan, pullulan, chitosan), capabile să fie obținute în condiții fiziologice, să aibă posibilitatea de a fi sterilizate sau să fie obținute în condiții sterile, să fie lipsite de citotoxicitate, să susțină viabilitatea și funcționarea normală a celulelor și să nu necesite etape suplimentare de purificare după obținere întrucât prezența celulelor nu permite acest lucru;

- ✓ caracterizarea fizico-chimică a hidrogelurilor prin metode chimice și spectrale pentru determinarea gradului de oxidare a polizaharidelor utilizate ca agenți de reticulare pentru atelocolagen și evidențierea reticulării pentru diferite rapoarte de amestecare a componentelor; caracterizarea reologică, morfologică (SEM), difuzia prin hidrogeluri, biodegradabilitatea hidrogelurilor;

- ✓ caracterizarea biologică *in vitro* și *in vivo* a hidrogelurilor prin testarea citocompatibilității acestora și a capacității de proliferare a celulelor încapsulate; studiul contracției hidrogelurilor sub acțiunea fibroblastelor încapsulate, tehnici de microscopie optică și de fluorescență pentru evidențierea morfologiei celulelor încapsulate, posibilitatea eliberării celulelor încapsulate;

- ✓ evidențierea caracterului aplicativ al hidrogelurilor prin testarea capacității acestora de a menține funcția secretorie a celulelor încapsulate și a posibilității de criostocare cu menținerea viabilității celulelor și proprietăților hidrogelului.

În continuare sunt prezentate principalele rezultate originale obținute în cadrul tezei.

Capitolul IV. MATERIALE ȘI METODE

IV.2.1.2 Oxidarea gellanului și a pullulanului

Oxidarea gellanului a fost realizată folosind meta periodat de sodiu (Merck). Practic, se pregătește soluția de gellan de concentrație 10 mg/ml prin dizolvarea gellanului în apă bidistilată și încălzirea amestecului la 80°C. Soluția răcită la temperatura camerei este pregătită pentru purificare prin amestecare cu trietilamină, apoi diafiltrată împotriva unui număr de 6 volume de apă bidistilată, până la îndepărtarea completă a excesului de trietilamină, pH-ul final al soluției fiind cel al apei bidistilate.

Pentru oxidare se dizolvă meta periodatul de sodiu (0.1 M) în apă bidistilată, apoi se adaugă în picături peste soluția de gellan, sub agitare, întregul proces având loc în condiții de întuneric. Se continuă agitarea timp de 3 ore după care, pentru stoparea reacției de oxidare se adaugă o cantitate echimolară de etilen glicol, cu cea a periodatului. Se menține în continuare sub agitare timp de 30 de minute. După finalizarea procesului de oxidare gellanul se încarcă în membrane de dializă (MWCO 12400 Da) pregătite în prealabil conform protocolului, prin fierbere în soluție de bicarbonat de sodiu (2%) și EDTA (1mM), apoi în apă bidistilată și se lasă la dializat timp de 3 zile pentru îndepărtarea compușilor reziduali, în apă bidistilată, cu schimbarea de 2 ori pe zi a apei. Apoi gellanul se lasă peste noapte să înghețe la -20°C și se liofilizează.

Gradul de oxidare poate fi variat în funcție de concentrația de periodat folosită și de timpul acordat reacției de oxidare.

Oxidarea pullulanului a fost realizată prin utilizarea unei metode identice celei de mai sus. Pregătirea soluției de pullulan a fost făcută prin dizolvarea pullulanului în apă bidistilată, la o concentrație de 10 mg/ml.

IV.2.2.1 Obținerea hidrogelurilor

Studiul de formulare a hidrogelurilor utilizează următoarele componente macromoleculare:

1. soluție coloidală de atelocolagen (aK) hipoimunogen biologic activ, concentrația de 6 mg/mL;
2. soluție coloidală de hialuronat de sodiu (NaHyal), 3 mg/mL;
3. soluție coloidală de polizaharide funcționalizate (gellan oxidat – GellOx; pullulan oxidat - PullOx), 10 mg/mL.

Concentrațiile respectivelor componente sunt cele maxim admisibile pentru a le asigura stabilitatea după preparare, precum și pentru a permite amestecarea lor eficientă, la temperatura la care acestea au fost stocate.

În Figura IV.8 este o reprezentare schematică a protocolului de obținere a hidrogelurilor.

Tabelul IV.1 prezintă cantitățile componentelor ce vor fi amestecate pentru a asigura o masă totală constantă, de 1,92 mg, a speciilor biomacromoleculare în compoziția hidrogelurilor preparate.

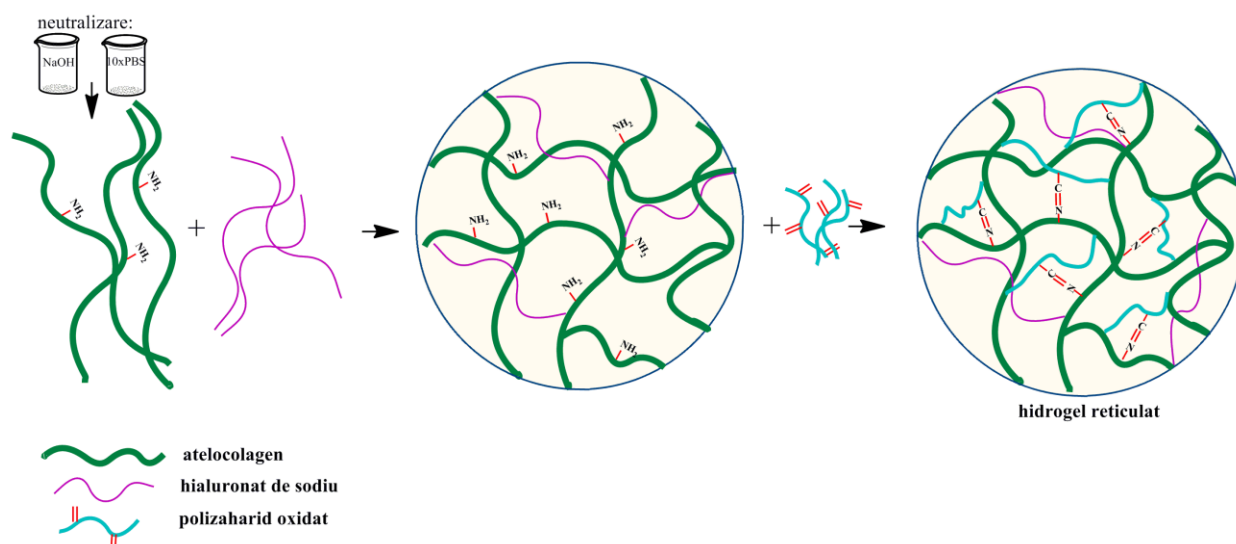


Figura IV.8 Reprezentare schematică a protocolului de formare a hidrogelurilor

Tabelul IV.3 reunește detaliile recepturilor de realizare a hidrogelurilor, în cele șapte variante descrise. Toate componentele recepturilor înscrise în Tabelul IV.3 se dozează sub formă lichidă, în ordinea în care sunt enumerate. Volumele dozate ale soluțiilor compuşilor biomacromoleculari s-au calculat pornind de la masele corespunzătoare înscrise în Tabelul IV.1 și de la concentrațiile soluțiilor coloidale de aK, NaHyal și GellOx/PullOx.

Tabelul IV.1 Masa componentelor care generează matricea macromoleculară a hidrogelurilor – rapoarte diferite.

Componenta	U.M.	Variantele investigate ale compoziției						
		(r I)	(r II)	(r III)	(r IV)	(r V)	(r VI)	(r VII)
Ak	Mg	1,86	1,77	1,56	1,38	1,14	0,93	0,66
NaHyal	Mg	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
GellOx/PullOx	Mg	0	0,09	0,3	0,48	0,72	0,93	1,2
Masa totală	Mg	1,92	1,92	1,92	1,92	1,92	1,92	1,92

Tabelul IV.3 *Recepturile amestecurilor investigate pentru realizarea seriei de hidrogeluri destinate încapsulării de celule.*

		Receptura și codul asociat acesteia						
Componente	U.M.	(r I)	(r II)	(r III)	(r IV)	(r V)	(r VI)	(r VII)
Soluție aK	μL	310	295	260	230	190	155	110
Apă bidistilată	μL	166	140	140	120	105	85	59
10x PBS	μL	40	40	40	40	40	40	30
NaOH 1M	μL	5	4	4	4	3	3	3
NaHyal	μL	20	20	20	20	20	20	20
GellOx/PullOx	μL	0	9	30	48	72	93	120
Volumul total	μL	541	508	494	462	430	396	342

Reacția care stă la baza obținerii hidrogelurilor este cea dintre grupările aldehidice formate în urma oxidării polizaharidei și grupările aminice de la nivelul atelocolagenului cu formarea de baze Schiff.

Volumele soluțiilor precursorilor macromoleculari și ale adjuvanților lichizi s-au calculat astfel încât prepararea hidrogelurilor să se realizeze în godeul central al unei plăci pentru cultură de țesut (BD Falcon™ 353037 60x15mm Center-well Organ Culture Dish), din polistiren, cu suprafețele tratate în plasmă, sterile. Pentru determinările ce necesită cantități mai ridicate de hidrogel (respectiv mase mai mari de substanță uscată), probele s-au preparat ca multipli ai recepturii primare.

Pentru obținerea hidrogelurilor, polizaharidul oxidat liofilizat este dizolvat în apă ușor alcalină (pH 7.5), la o concentrație de 10 mg/ml.

În continuare, atelocolagenul (concentrație soluție stoc 6 mg/ml) este diluat cu apă bidistilată la o concentrație finală de 3 mg/ml, apoi neutralizat cu ajutorul unei soluții de 10XPBS, pH 7 și cu NaOH 1 M. Peste acesta se adaugă hialuronatul (concentrație soluție stoc 3 mg/ml), apoi polizaharidul oxidat (concentrație soluție stoc 10 mg/ml), în diferite rapoarte față de soluția de atelocolagen. Amestecul astfel format se lasă la incubator la 37°C timp de 15-30 de minute până la formarea hidrogelului, după care se adaugă mediu de cultură echilibrat din punct de vedere termic și al pH-ului.

Pentru încapsularea celulelor, protocolul de lucru este asemănător celui descris, cu excepția faptului că soluția de atelocolagen este diluată cu mediu de cultură, iar suspensia de celule se amestecă înainte de adăugarea soluției de polizaharid oxidat, prin pipetare, cu evitarea formării de bule de aer. Concentrația de celule utilizată a fost de $2,5 \times 10^5$ celule/ml.

CAPITOLUL V. REZULTATE ȘI DISCUȚII

V.1.2 Evidențierea funcționalizării exopolizaharidelor prin oxidare

Pentru a demonstra prezența grupărilor carbonilice active în produsul oxidat, se impune determinarea calitativă a acestora prin analize fizico-chimice instrumentale. Tehnica spectroscopiei în infraroșu nu a putut pune în evidență, în mod cert și reproductibil, respectivele grupări în probele de (exo)polizaharide oxidate. Din acest motiv s-a recurs la evidențierea lor prin spectroscopie de rezonanță magnetică.

Figura V.2 prezintă spectrul ^1H RMN al gellanului neoxidat, în care se evidențiază absența semnalelor în plaja $9 \div 10$ ppm, precum și dubletul generat de gruparea $-\text{CH}_3$ a ramnozei, în domeniul $1,2 \div 1,4$ ppm. Peak-ul intens de la 4,8 ppm este cel al apei din soluție (fie provenind din urmele de apă din proba solidă, fie rezultată prin schimbul izotopic între D_2O și diverși protoni mobili ai compusului investigat, schimb posibil de realizat inclusiv cu atomii de hidrogen ai grupărilor hidroxil). Pentru a permite o analiză mai precisă a particularităților compusului, la procesarea spectrului gellanului oxidat, peak-ul de la 4,8 ppm a fost eliminat prin scădere algebrică.

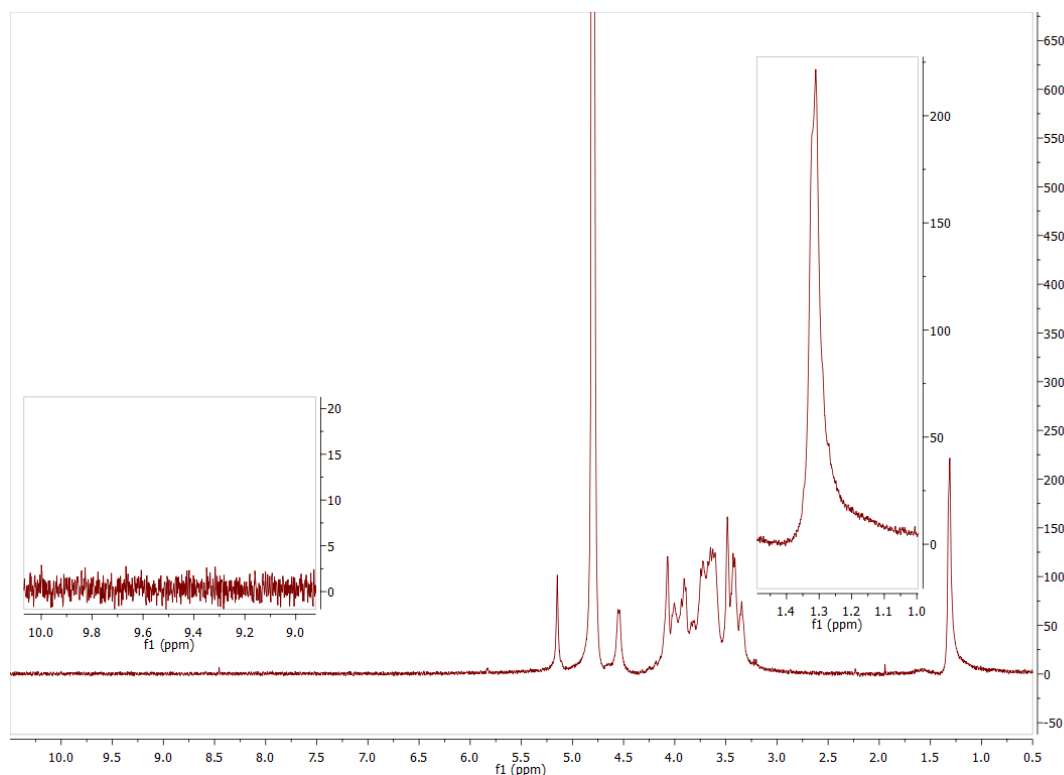


Figura V.2 Spectrul ^1H al gellanului neoxidat.

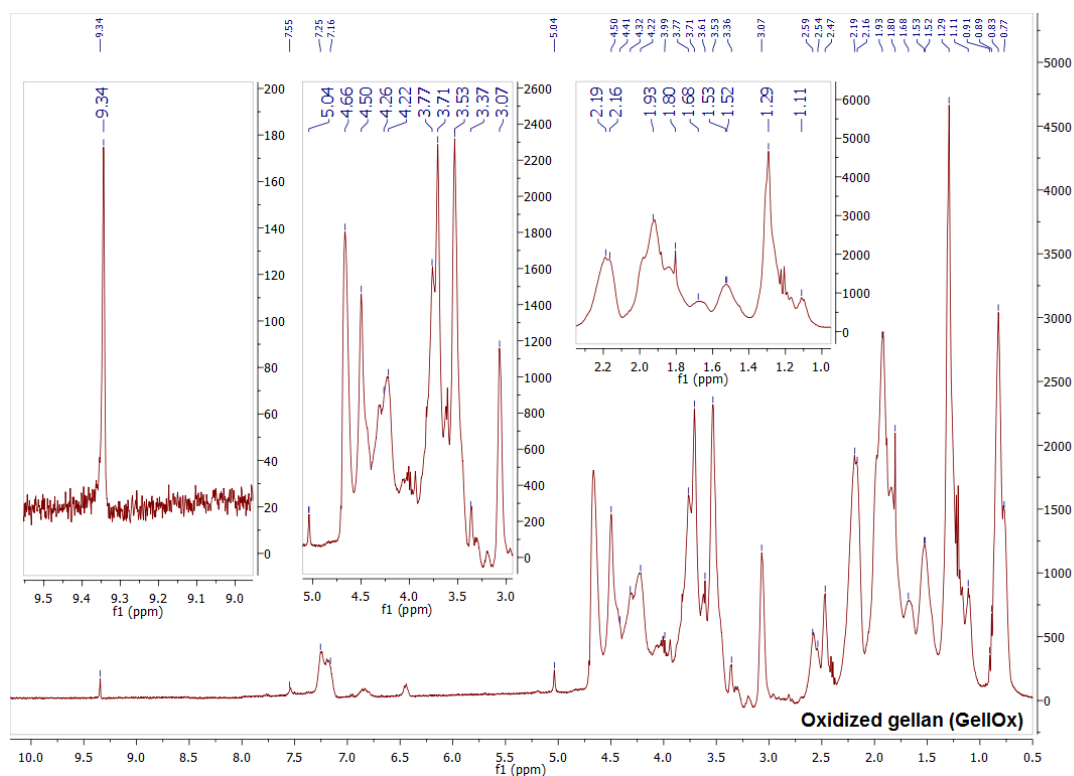


Figura V.3 Spectrul ^1H al gellanului oxidat (GellOx).

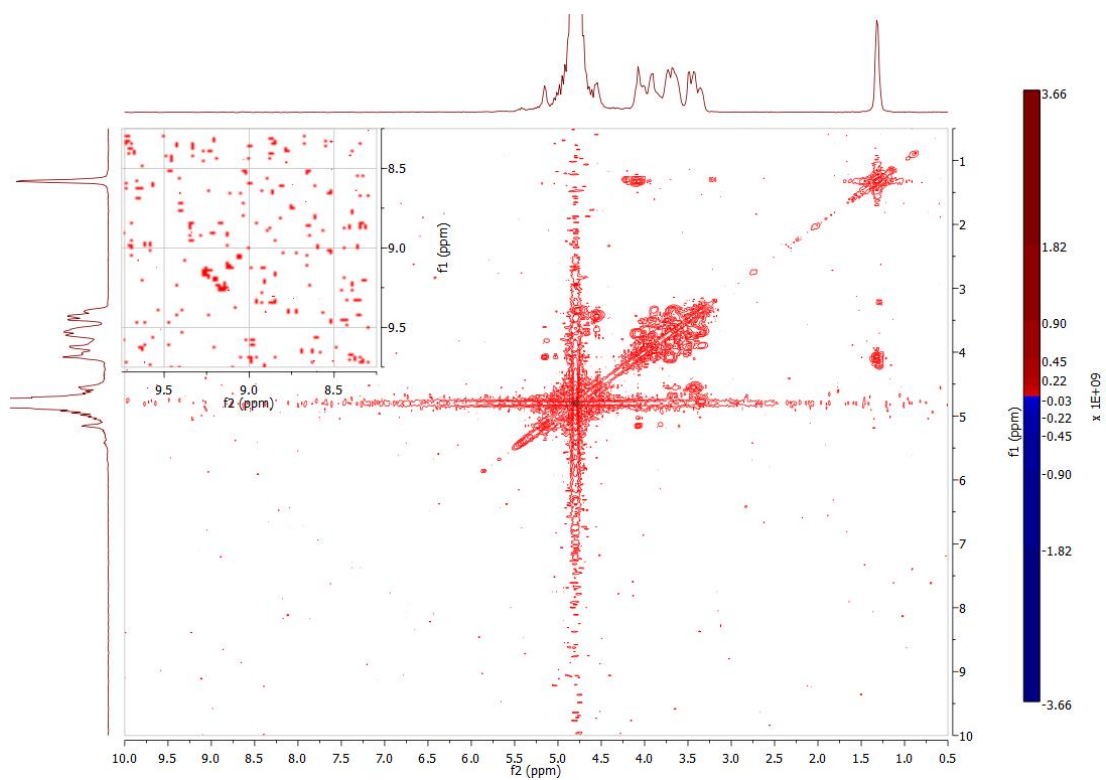


Figura V.4 Spectrul ^1H - ^1H COSY al gellanului oxidat (GellOx).

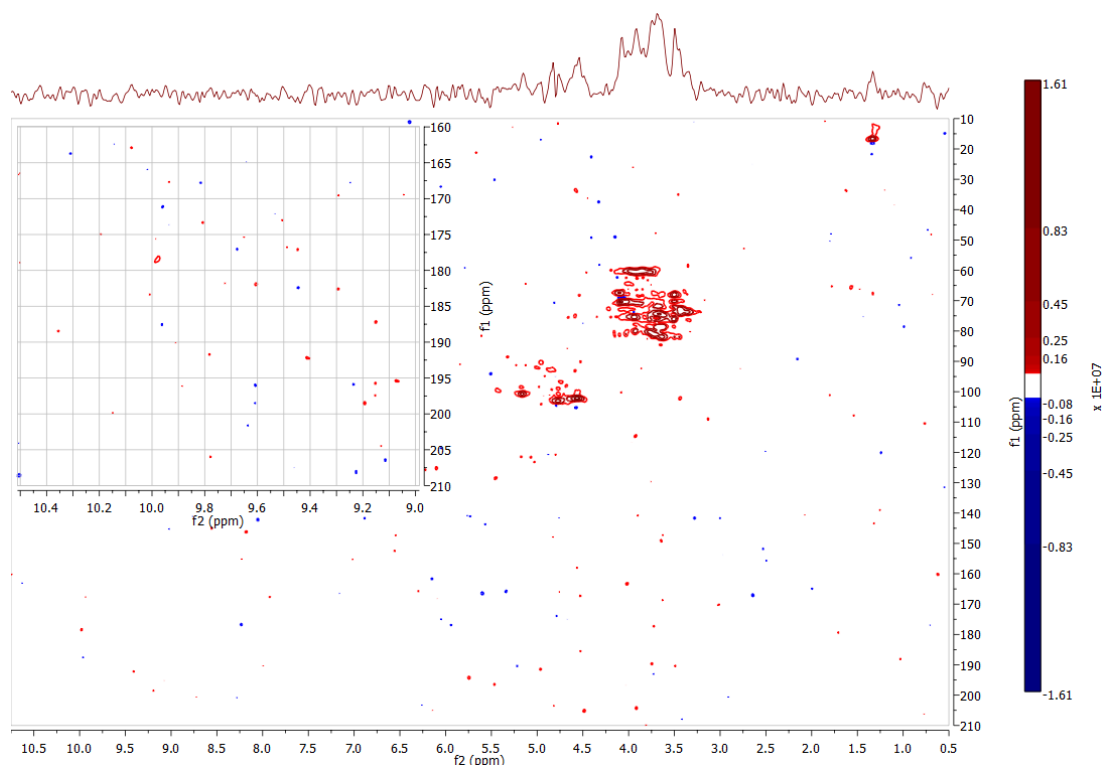


Figura V.5 Spectrul HSQC al gellanului oxidat (GellOx).

Figura V.3 prezintă spectrul gellanului oxidat. Se observă modificări semnificative, consecință a proceselor de oxidare, mai ales în domeniul câmpului magnetic intens (valori mici ale deplasărilor, măsurate în ppm), cauzate de ruperea haotică a catenei polizaharidice și apariția unei multitudini de grupări suplimentare. De asemenea, se observă prezența unui peak (cel mai probabil dublet) în plaja câmpurilor joase (la $\delta = 9,34$ ppm), cauzat de protoni dezecrañați aparținând grupării aldehydice ($-\text{CH}=\text{O}$) [106]. Intensitatea relativ mică a acestui peak indică prezența unui număr redus de funcțiuni carbonil prezente în masa probei, comparativ cu numărul cu cel puțin un ordin de mărime mai mare al grupărilor rezultate ca urmare a fragmentării catenei polizaharidice, la nivelul monozaharidelor.

Pentru a certifica prezența grupărilor aldehydice (singurele active în procesele de reticulare cu atelocolagenul) în probele analizate s-a recurs la trasarea a două spectre RMN bidimensionale: ^1H - ^1H COSY (Correlation SpectroscopY) și ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence). Spectrul COSY indică prezența dubletului la deplasarea $\delta = 9,16$ ppm, atribuibil aldehydelor alifactice. Conform spectrului heteronuclear simulat, amprenta grupărilor carbonilice prezente pe catenele gellanului este identificabilă în plaja ^1H : $9,8 \div 10$ ppm și respectiv ^{13}C : $180 \div 205$ ppm. În spectrul HSQC trasat experimental (Figura V.5) semnalele atribuibile acestei amprente se regăsesc în plaja corelativă ^1H : $9,85 \div 10$ ppm și respectiv ^{13}C : $188 \div 200$ ppm. Abaterile față de valorile prezise prin simulare derivă din

complexitatea anturajului chimic în proba supusă analizei, comparativ cu structura netă a unității repetitive a gellanului, care a fost simulată.

Drept concluzie, deși în concentrație redusă, grupările aldehidice dezvoltate ca urmare a oxidării gellanului sunt prezente în forma stoc, liofilizată, a produsului obținut conform protocolului descris în subcapitolul IV.2.1. Așadar, respectivul produs poate juca rolul de agent reticulant în protocoalele de obținere a hidrogelurilor atelocolagen – polizaharidice, destinate încapsulării de celule.

V.1.5 Evidențierea reticulării chimice induse de polizaharidele oxidate

Hidrogelurile fizice unicomponente au proprietăți fizico-chimice și reologice modeste, neputând fi supuse manipulărilor ocazionate de încapsularea celulelor fără a se destructura sau lichefia. Pentru îmbunătățirea respectivelor proprietăți se practică reticularea lor chimică, utilizând fie agenți reticulanti mic-moleculari [23], fie compuși macromoleculari, aceștia din urmă generați *in situ* (prin diverse tehnici de polimerizare), ori adăugați în amestec după o eventuală funcționalizare [191]. Cea de-a doua variantă dintre cele ce recurg la compuși macromoleculari a fost utilizată în prepararea hidrogelurilor studiate în prezenta lucrare.

Prin reacția de condensare a funcțiilor aldehidice ale polizaharidelor oxidate cu grupările aminice primare ale catenelor laterale ale lizinei din macromoleculele de atelocolagen se stabilesc punți de reticulare iminice. Numărul acestora se poate evalua determinând diferența între conținutul de grupări aminice ale atelocolagenului ce nu interacționează cu polizaharidele oxidate și respectiv ale celui supus reticulării.

Una dintre metodele fezabile pentru determinarea cantitativă a conținutului de grupări aminice este cea spectrofotometrică bazată pe reacția de culoare între aminele primare și sarea de sodiu a acidului 2,4,6-trinitrobenzen-sulfonic (TNBS). După aplicarea acestei determinări asupra formei liofilizate a hidrogelurilor preparate conform Tabelului IV.1 s-au obținut datele prezentate în Tabelul V.3 și reprezentate grafic în Figura V.7.

Gradul de reticulare calculat și exprimat procentual pentru hidrogelurile atelocolagen – polizaharide studiate este prezentat în Tabelul V.4, iar Figura V.8 descrie grafic dependența de compoziție a aceluiași parametru. Se constată faptul că, în comparație cu reticularea cu GellOx, cea realizată cu PullOx avansează mai rapid odată cu creșterea ponderii polizaharidului în compoziție, până la valori cu circa 15 % mai ridicate. În cazul ambelor polizaharide, se atinge un prag de saturare a reticulării, îndată ce ponderea celor doi parteneri macromoleculari (aK și GellOx/PullOx) atinge și depășește egalitatea.

Tabelul V.3 Conținutul de grupări aminice ale atelocolagenului prezent în compoziția matricei macromoleculare a hidrogelurilor reticulate chimic cu GellOx și PullOx.

Agentul reticulant	Codul probei	Masa hidrogelului liofilizat, Mg	Absorbanța u.a.	Conținutul de grupări aminice	
				μM/probă	μM/g
GellOx	31 : 1 : 0	6,7	0,218	0,9506	141,88
	29,5 : 1 : 1,5	5,2	0,189	0,7089	136,33
	26 : 1 : 5	5,4	0,188	0,7006	129,74
	23 : 1 : 8	6,1	0,184	0,6673	109,39
	19 : 1 : 12	5,3	0,170	0,5506	103,89
	15,5 : 1 : 15,5	5,0	0,156	0,4339	86,78
	11 : 1 : 20	4,3	0,147	0,3590	83,49
PullOx	31 : 1 : 0	5,2	0,192	0,7339	141,13
	29,5 : 1 : 1,5	6,5	0,187	0,6923	106,51
	26 : 1 : 5	5,2	0,158	0,4506	86,65
	23 : 1 : 8	6,6	0,167	0,5256	79,64
	19 : 1 : 12	5,9	0,157	0,4423	74,97
	15,5 : 1 : 15,5	4,2	0,136	0,2673	63,64
	11 : 1 : 20	4,6	0,138	0,2840	61,74

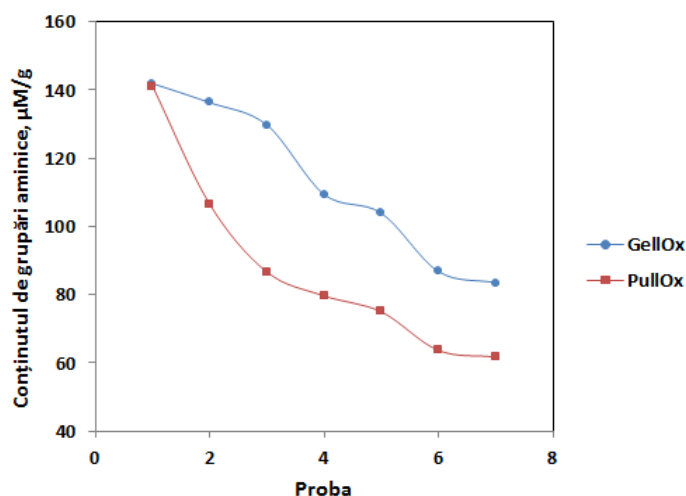


Figura V.7 Variația conținutului de grupări aminice în funcție de compoziția hidrogelurilor investigate.

La valori ridicate ale gradului de reticulare manevrabilitatea hidrogelurilor (mai ales ale celor reticulate cu PullOx) se înrăutățește. Recepturile care asigură un bun compromis între gradul de reticulare și manevrabilitate sunt cele cu ponderile aK : NaHyal : GellOx/PullOx de cel mult 23 : 1 : 8. Figura V.8 indică și comportamentul diferit al PullOx față de GellOx, indus probabil de diferențele de masă moleculară între formele oxidate ale celor două polizaharide.

Tabelul V.4 Variația gradului de reticulare a atelocolagenului cu polizaharidele oxidate în funcție de amestecurile hidrogelurilor investigate.

Codul probei	Gradul de reticulare al hidrogelurilor realizate cu	
	GellOx	PullOx
31 : 1 : 0	0,00	0,00
29,5 : 1 : 1,5	3,91	24,53
26 : 1 : 5	8,56	38,60
23 : 1 : 8	22,90	43,57
19 : 1 : 12	26,78	46,88
15,5 : 1 : 15,5	38,84	54,91
11 : 1 : 20	41,15	56,25

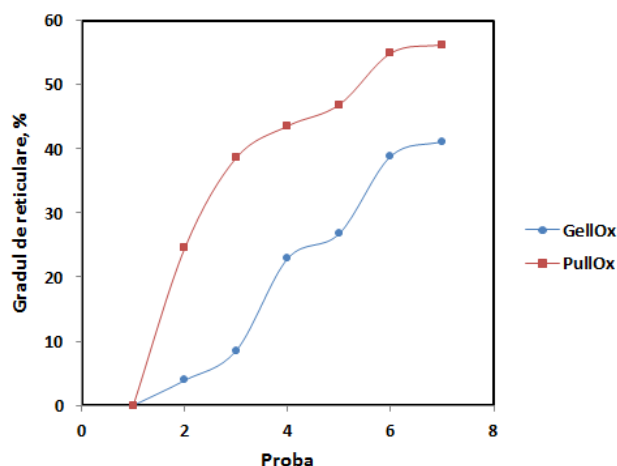


Figura V.8 Variația gradului de reticulare a hidrogelurilor în funcție de compoziție

Din cauza volumului redus al moleculelor de PullOx, amestecul cu macromoleculele de atelocolagen este unul intim, de aceea reticularea avansează mai rapid atunci când se utilizează cantități mai mici de polizaharid în amestec. Pentru a facilita compararea între eficacitatea de reticulare a GellOx și a PullOx, dependența gradelor de reticulare de cantitatea de polizaharide funcționale a fost fitată conform ecuației:

$$y = a \cdot x^p$$

Parametrul a are valorile 19,55 pentru GellOx și 42,19 pentru PullOx luând în considerare cantitatea de polizaharid oxidat utilizat în cazul celor mai versatile hidrogeluri (compoziția R(IV) – 1,039 mg/ml). Apare astfel o diferență de 22,64% în beneficiul PullOx ceea ce înseamnă că teoretic, același grad de reticulare poate fi obținut utilizând cu 20% mai puțin PullOx decât

Gellox. Deși PullOx ar fi teoretic de patru ori mai reactiv decât Gellox, în condițiile reale de amestec această diferență nu este atât de mare. Astfel, deși conținutul în grupări aldehidice este mai redus comparativ cu Gellox, eficiența de reticulare este mai mare în cazul PullOx. Motivul acestei discordanțe este diferența gradelor de fragmentare ale polizaharidelor funcționalizate. Moleculele mai mici de PullOx au capacitatea de a se amesteca mai eficient cu structura fibrilară a atelocolagenului, maximizând astfel interacțiunile reciproce.

V.1.6 Morfologia hidrogelurilor observată prin SEM

Observarea morfologiei hidrogelurilor în care au fost încapsulate celule se poate face cu ajutorul microscopiei electronice, în urma uscării hidrogelurilor la punctul critic, prin această procedură asigurându-se păstrarea nealterată a elementului biologic. În Figura V.9 se poate observa morfologia hidrogelurilor reticulate cu gellan, respectiv pullulan parțial oxidat, cu celule încapsulate.

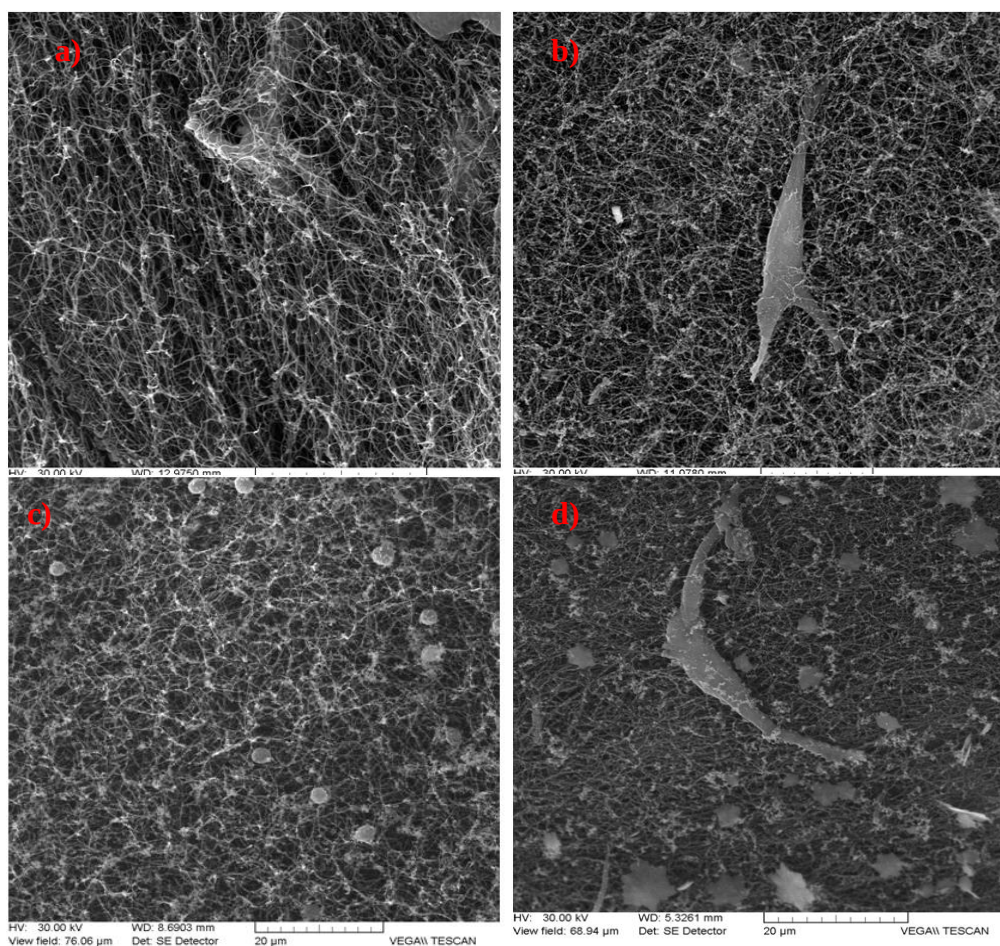


Figura V.9 Morfologia hidrogelurilor reticulate cu gellan (a, b), respectiv pullulan (c, d) parțial oxidat și a celulelor încapsulate, evidențiată prin SEM

Din imagini se observă morfologia fibrilară a hidrogelurilor, ideală pentru ca celulele să adere la aceasta. Morfologia este uniformă și se poate observa că hidrogelurile reticulate cu pullulan oxidat prezintă o densitate mai mare a fibrilelor, comparativ cu hidrogelurile reticulate cu gellan oxidat. Se poate observa, de asemenea, faptul că celulele au fost integrate în structura fibrilară a hidrogelurilor, acestea având o morfologie alungită.

V.1.8 Difuzia prin hidrogeluri

Figurile V.14 și V.15 prezintă grafic evoluția concentrației BSA în timp, în cele două compartimente ale celulei Franz, pe durata experimentelor efectuate asupra hidrogelurilor preparate conform a patru dintre recepturile cadru.

Data fiind neliniaritatea evidentă a variației concentrației în compartimentul donor, în vederea stabilirii coeficienților de difuzie s-a procedat la izolarea domeniului de liniaritate a curbelor sigmoide asociate.

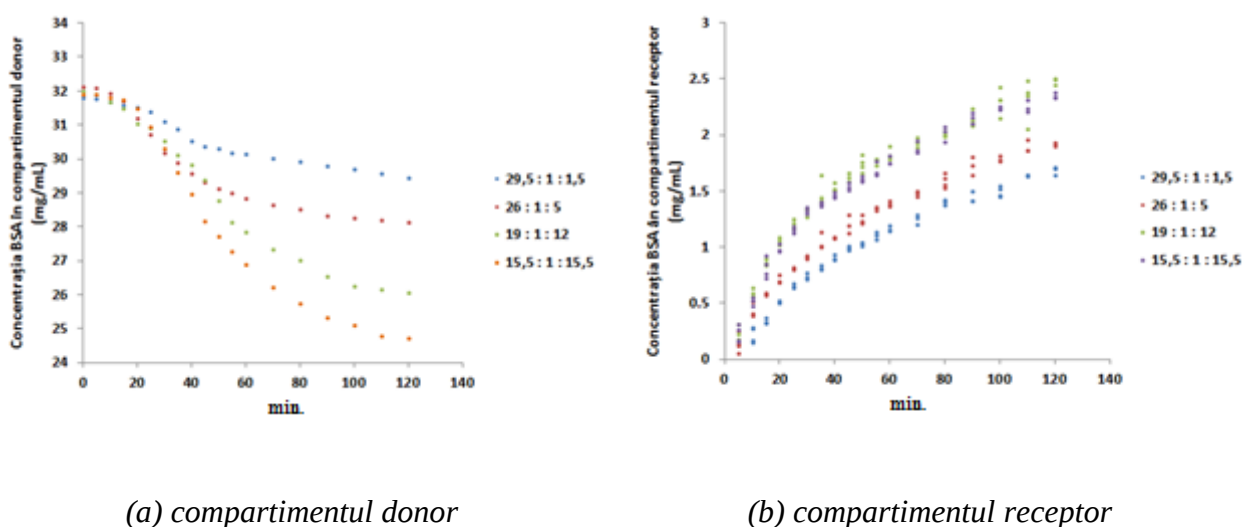
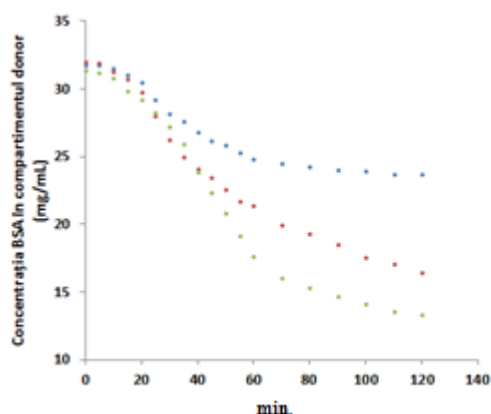
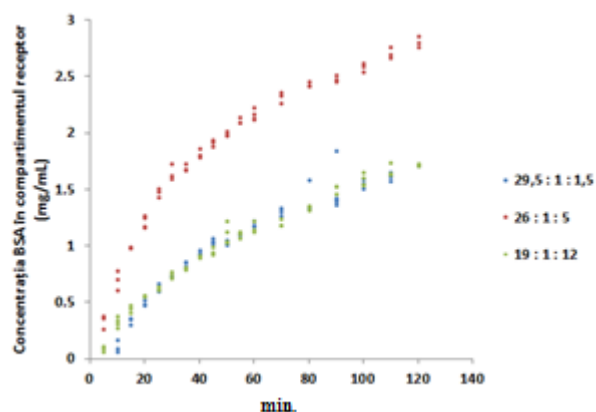


Figura V.14 Evoluția în timp a concentrației BSA în compartimentele celulei Franz, în experimentele efectuate asupra hidrogelurilor reticulate cu GellOx.

În cazul hidrogelurilor reticulate cu gellan oxidat, au putut fi montate drept diafragmă în celula Franz patru dintre compozițiile testate (conform rapoartelor indicate în Figura V.14), iar în cazul celor reticulate cu pullulan oxidat, doar trei (conform rapoartelor indicate în Figura V.15). Compozițiile în care atelocolagenul participă în proporții mici nu au prezentat rezistența mecanică necesară menținerii integrității lor în montajul celulei Franz. Tabelul V.5 include valorile calculate ale coeficienților de difuzie, de rezistență la transferul de masă [197] și de penetrare în hidrogel [198].



(a) compartimentul donor



(b) compartimentul receptor

Figura V.15 Evoluția în timp a concentrației BSA în compartimentele celulei Franz, în experimentele efectuate asupra hidrogelurilor reticulate cu PullOx.

Tabelul V.5 Valorile calculate ale coeficienților de difuzie și de rezistență la transferul de masă, pentru hidrogelurile atelocolagen – polizaharide.

Rapoartele de amestecare	Agentul reticulant	Coeficientul de difuzie	Coeficientul global al rezistenței la transferul de masă	Coeficientul distanței de penetrare prin hidrogel
29,5 : 1 : 1,5	GellOx	$4,2718 \cdot 10^{-13}$	$4,6819 \cdot 10^9$	$1,3072 \cdot 10^{-6}$
	PullOx	$4,9733 \cdot 10^{-13}$	$4,0215 \cdot 10^9$	$1,4104 \cdot 10^{-6}$
26 : 1 : 5	GellOx	$5,4248 \cdot 10^{-13}$	$3,8667 \cdot 10^9$	$1,4731 \cdot 10^{-6}$
	PullOx	$7,2714 \cdot 10^{-13}$	$2,7505 \cdot 10^9$	$1,7055 \cdot 10^{-6}$
19: 1 : 12	GellOx	$1,0510 \cdot 10^{-12}$	$1,9030 \cdot 10^9$	$2,0504 \cdot 10^{-6}$
	PullOx	$1,4505 \cdot 10^{-12}$	$1,3788 \cdot 10^9$	$2,4087 \cdot 10^{-6}$
15,5 : 1 : 15,5	GellOx	$1,1482 \cdot 10^{-12}$	$1,7419 \cdot 10^9$	$2,1430 \cdot 10^{-6}$
	PullOx	--	--	--
Unitatea de măsură		m^2/s	s/m	$m \cdot (s^{-0,5})$

Se constată că pe măsură ce conținutul de polizaharide în amestec crește, difuzia BSA prin hidrogeluri se accentuează, atât în virtutea încărcării electrice similare la pH-ul de lucru, cât și structurării morfologice mai laxe, care conduce la formarea unor matrici macromoleculare cu porozitate mai ridicată. Deși difuzia prin hidrogelurile obținute este ridicată, aceasta este cu un ordin de magnitudine mai mică decât coeficientul de difuzie al albuminei prin apă, fapt ce poate fi explicat de vâscozitatea determinată de amestecul și reticularea componentelor hidrogelurilor.

Rezultatele obținute pentru aceste hidrogeluri se regăsesc în același ordin de magnitudine ale coeficienților de difuzie cu cele obținute de Engberg și Frank (2011) care au testat difuzia mioglobinei prin hidrogeluri pe bază de poli(etilen glicol) și cu cele ale lui Carvalho et. al (2008) care au testat difuzia albuminei prin hidrogeluri pe bază de dextrină-vinacrilat, aceasta confirmând faptul că hidrogelurilor obținute în cadrul acestei cercetări permit o difuzie adecvată a moleculelor necesare susținerii funcțiilor celulelor încapsulate [201, 202].

V.1.9 Caracteristicile reologice ale hidrogelurilor

Variația elasticității gelurilor a fost determinată prin compararea G' și G'' măsurate la aceeași frecvență unghiulară de 1 rad/s, la o amplitudine de 0,3% și 37°C, valorile de referință pentru geluri slabe și puternic reticulate covalent fiind $G'/G''=10$ [204]. Convențional, gelurile pe bază de biomacromolecule cu valori ale G' mai mari cu un ordin de magnitudine decât G'' sunt considerate puternic reticulate chimic, iar rapoartele G'/G'' cuprinse între 1 și 10 indică predominanța forțelor fizice de reticulare. Raportul G'/G'' pentru gelul realizat doar din atelocolagen și hialuronat, deci pur fizic este de 7,1998, reprezentând în continuare o valoare de referință în evaluarea hidrogelurilor obținute în urma adăugării componentei polizaharidice.

Hidrogelurile reticulate cu GelloX și PullOx conform compoziției R (IV) au un comportament reologic similar. La cantități ale PullOx mai mari de 1 mg/ml rezultă hidrogeluri tot mai rigide odată cu creșterea numărului de legături covalente. Toate probele au comportament de gel slab dar stabil, dominant elastic ($G' > G''$), cu o slabă dependență de frecvența solicitării de forfecare, până la circa $80 \div 100$ rad/sec.), preponderent reticulat fizic. La frecvențe de oscilație ridicate, evoluțiile celor două module se inversează (curbele se intersectează și apoi diverg în sensuri contrare celor de dinaintea intersectării), indicând faptul că matricea macromoleculară a hidrogelurilor nu mai poate răspunde elastic (ca un solid), ci amortizează propagarea oscilației în volumul hidrogelurilor, efect similar creșterii vâscozității. În toate determinările, frecvența este baleiată descrescător, între 500 și 0,05 rad/secundă (adică între circa 80 și 0,008 Hz), menținând constantă deformația (la valoarea de 0,3 %) și temperatura (la valoarea de 37 °C).

Determinările prin baleiaj în temperatură (între 5 și 65 °C) au fost realizate în condițiile menținerii constante a deformației induse (la valoarea de 0,3 %) și a frecvenței de oscilație (la valoarea de 10 Hz = 62,83 rad/sec.). În cazul tuturor hidrogelurilor se constată existența unui prag al lichefierii. Până la acest prag, în general, vâscozitatea complexă crește odată cu energizarea termică a hidrogelurilor, iar după depășirea sa, vâscozitatea se diminuează drastic, hidrogelul deformându-se nerecuperabil, curgând asemănător lichidelor. De asemenea, în

intervalul de temperaturi 30-42 °C, interval specific fibrilării collagenului determinările reologice indică o creștere a ordinii structurale a hidrogelurilor.

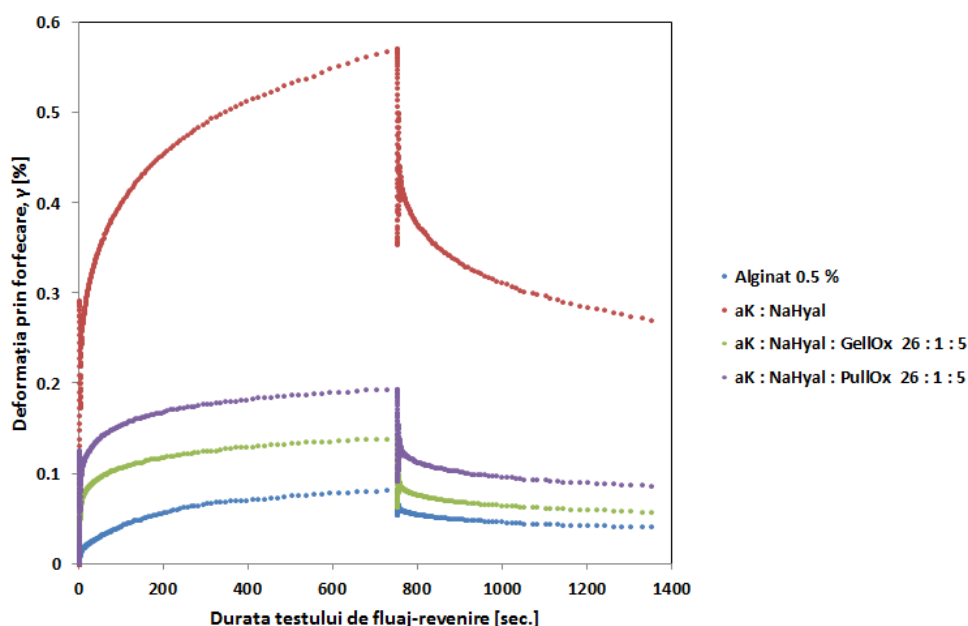


Figura V.21 Compararea comportamentului la fluaj-revenire a hidrogelurilor cu matrice atelocolagen - polizaharidică în raport cu hidrogelul din alginat utilizat pentru încapsularea celulelor.

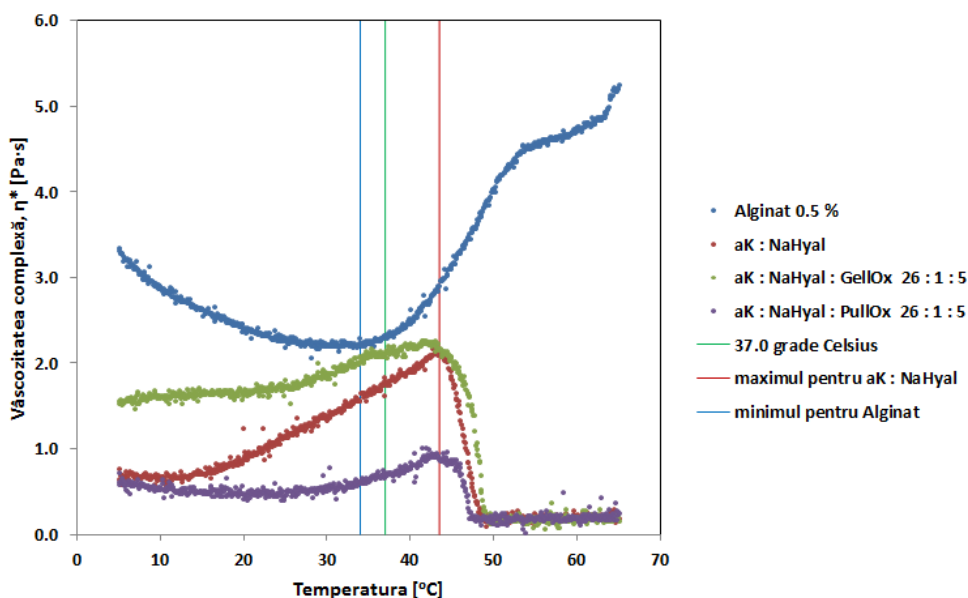


Figura V.22 Compararea variației cu temperatura a vâscozității hidrogelurilor cu matrice atelocolagen - polizaharidică în raport cu hidrogelul din alginat utilizat pentru încapsularea celulelor.

Figura V.21 prezintă diferențele de comportament în testele de fluaj-revenire. În mod evident, cel mai rigid hidrogel (și deci cel mai ferm) este cel din alginat. Deformarea sa sub un

efort treaptă de 5 Pa este de doar 0,08 % la finalul etapei de fluaj, deși, în primele 200 de secunde se dezvoltă o curgere vâscoasă ce nu se mai recuperează până la finalul etapei de revenire. Acest fapt este expresia reticulării exclusiv fizice a hidrogelului din alginat. Cel mai flasc hidrogel este cel din atelocolagen și hialuronat, nesupus reticulării. Acesta atinge o deformare de circa 0,57 % până la finalul etapei de fluaj, sub același efort treaptă, de 5 Pa. Neatingerea unei stări cvasi-staționare a valorii deformăției și nici a pantei de evoluție în cazul acestui hidrogel indică o componentă vâscoasă semnificativă, care disipă energia aplicată din exterior. În urma reticulării chimice a hidrogelurilor atelocolagen - polizaharide, componenta lor elastică este sporită, dar în paralel crește și rigiditatea lor. În acest sens, hidrogelurile reticulate cu GellOx (în raportul de amestecare de 26 : 1 : 5) sunt cele mai rigide, fără a pierde semnificativ din elasticitate. Cele reticulate cu PullOx sunt și ele relativ rigide, fiind în plus mai flasce comparativ cu cele reticulate cu GellOx. Diferențele se datorează pe de o parte flexibilității mai mari a segmentelor macromoleculelor de pullulan, iar pe de alta, în sens contradictoriu, capacității modeste de gelifiere individuală a pullulanului comparativ cu gellanul. Reticularea cu GellOx acționează sinergetic cu tendința de gelifiere a gellanului în prezența ionilor de Ca^{2+} dozați, conducând la rețele macromoleculare cu elemente morfologice mai ferm interconectate și dezordonate într-o mai mare măsură.

Evoluția comparativă a vâscozității aceluiași patru tipuri de hidrogeluri odată cu variația temperaturii este redată în Figura V.22. În acest context, hidrogelul din alginat prezintă un minim al vâscozității (și deci un maxim al flexibilității și elasticității) în apropierea domeniului temperaturilor fiziologice. Atât la temperaturi mai coborâte, cât mai ales la temperaturi mai ridicate, hidrogelul din alginat este mult mai ferm și pare a se rigidiza odată cu creșterea temperaturii. Acest fapt poate influența, în aplicații ce implică încapsulare celulelor, permeabilitatea înspre și dinspre mediul lichid extern. În plus, fiind nestructurat fibrilar, hidrogelul din alginat se compactizează mult mai semnificativ, atât la valori reduse ale temperaturii, cât și la temperaturi ridicate. Hidrogelurile cu morfologie internă fibrilară, asigurată în special de agregarea supramoleculară a atelocolagenului, se compactizează mult mai puțin la temperaturi joase, ele având posibilitatea de a atenua colapsarea microstructurii. Prezența gellanului oxidat și reticularea indusă de acesta rigidizează hidrogelurile la temperaturi coborâte crescându-i vâscozitatea și uniformizând răspunsul acestora la variația temperaturii. Pullulanul oxidat pare că defavorizează relaxarea matricei hidrogelurilor în care este prezent, odată cu creșterea temperaturii, microstructura lor menținându-se colapsată pe o mai largă plajă a temperaturilor, în contextul unei vâscozități reduse. În toate hidrogelurile investigate, prezența atelocolagenului induce abilitatea acestora de a se lichefia la depășirea unui prag al temperaturii, de circa 43 °C. Acest prag este apropiat de cel al denaturării ireversibile a macromoleculelor de

atelocolagen cvasi-nativ. Așadar, lichefierea este cauzată de destructurarea morfologiei matricei macromoleculare a hidrogelurilor cu atelocolagen. Într-o oarecare măsură, asocierea cu polizaharidele stabilizează matricea hidrogelurilor, gellanul oxidat fiind ușor mai eficient în acest sens. Prin prisma comportamentului la variația temperaturii, hidrogelurile investigate pot fi încadrate în clasa celor sensibile la stimuli exteriori.

Modelele Jeffreys ajustate etapei de fluaj timpuriu indus hidrogelurilor

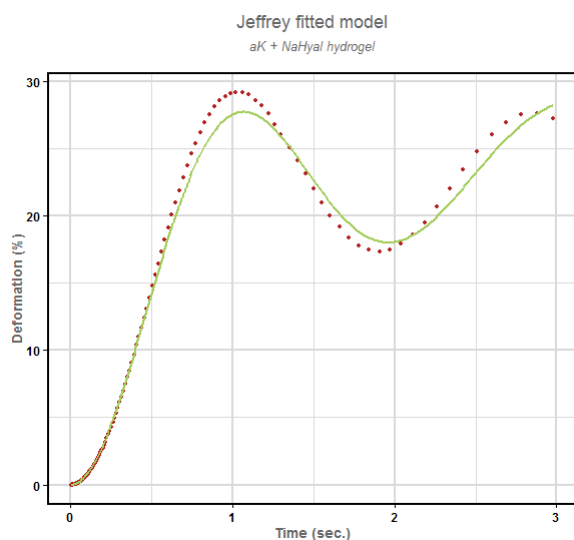
Practic toate gelurile „tremură” atunci când li se imprimă o mișcare bruscă. Acest efect pune în evidență elasticitatea gelurilor (prin amplitudinea și frecvența oscilațiilor), dar și raportul între caracteristicile lor elastice și vâscoase (prin durata de amortizare a oscilațiilor și prin trendul deformării pe durata regimului tranzitoriu, oscilant). Testele de fluaj-revenire evidențiază oscilațiile gelurilor la ambele fronturi ale semnalului treaptă aplicat. Cel mai adesea însă, respectivele oscilații sunt considerate parazitare și nu sunt tratate în algoritmi de determinare a parametrilor reologici ai gelurilor pornind de la evoluția deformației în etapa de fluaj.

Intervalul de timp în care se manifestă regimul oscilatoriu imediat după aplicarea tensiunii mecanice poartă denumirea de *fluaj timpuriu (early creep)*. Pentru extragerea de informații de factură reologică pornind de la acest interval de timp s-au dezvoltat modele speciale, care iau în considerare inerțiile ce se manifestă la aplicarea bruscă a tensiunilor mecanice (spre exemplu a celor de forfecare, induse de reometrele cu sistem de măsurare placă – placă). Algoritmi care tratează datele experimentale conform respectivelor modele disting între inerția sistemului de măsurare (cauzată de componentele mecanice ale reometrului și de placa superioară) și inerția caracteristică gelului investigat (masei de ansamblu a hidrogelului, elementelor morfologice ale matricei macromoleculare, volumului de fluid reținut în ochiurile/porii matricei etc.).

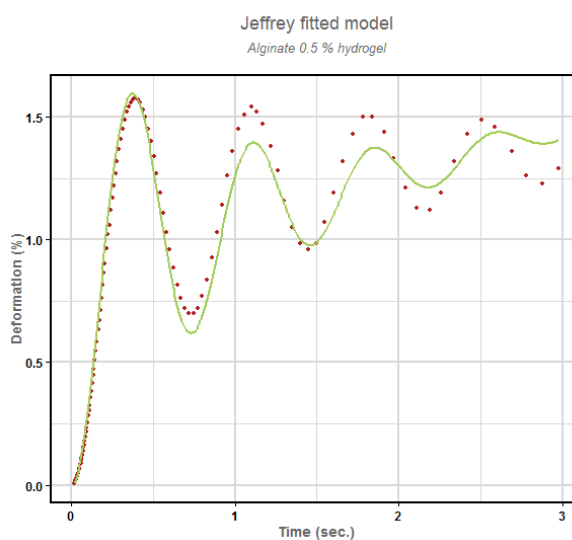
Astfel, din cauza unei dependențe complicate între compozițiile hidrogelurilor și rezultatele măsurărilor clasice privind fluajul reflectate de parametrii modelului Burgers, s-a decis verificarea aspectului general și particular al curbelor obținute, folosind modelul Jeffreys.

Tabelul V.8 include valorile numerice ale parametrilor reologici asociați modelului reologic inerțial Jeffreys, calculate pentru etapa de fluaj timpuriu a hidrogelurilor atelocolagen – polizaharide, iar Tabelul V.9 pe cele calculate pentru hidrogelul din alginat. Spre exemplificare, în Figura V.27 sunt ilustrate rezultatele ajustării modelelor Jeffreys pentru dependențele timp – deformație a hidrogelurilor de referință (aK + NaHyal și alginat 0,5 %) și a două dintre hidrogelurile atelocolagen – polizaharide, reticulate cu GellOx și respectiv cu PullOx.

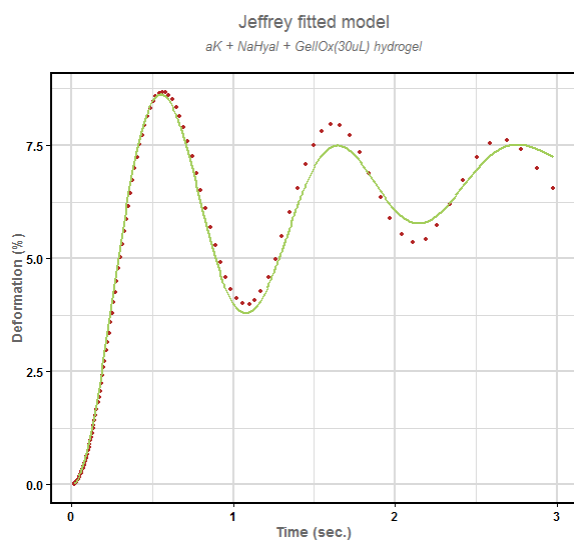
Figura V.28 prezintă grafic dependențele de receptură ale frecvenței de oscilație și ale modulelor neliniare de elasticitate și vâscozitate calculate conform relațiilor matematice asociate modelului Jeffreys. Se constată faptul că alura curbelor modulelor este similară celei a curbelor corespondente, determinate în baza modelului Burgers, pentru întreaga etapă de fluaj.



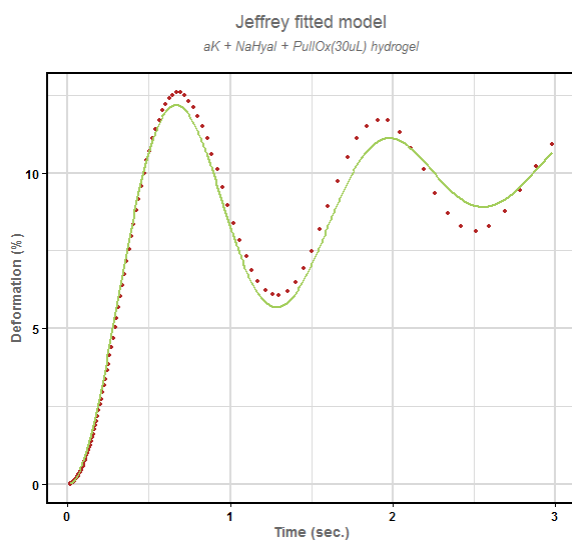
▲ (a) Hidrogel aK : NaHyal



▲ (a) Alginat de sodiu 0,5 %



▲ (c) aK : NaHyal : GellOx 25 : 1 : 5



▲ (d) aK : NaHyal : PullOx 25 : 1 : 5

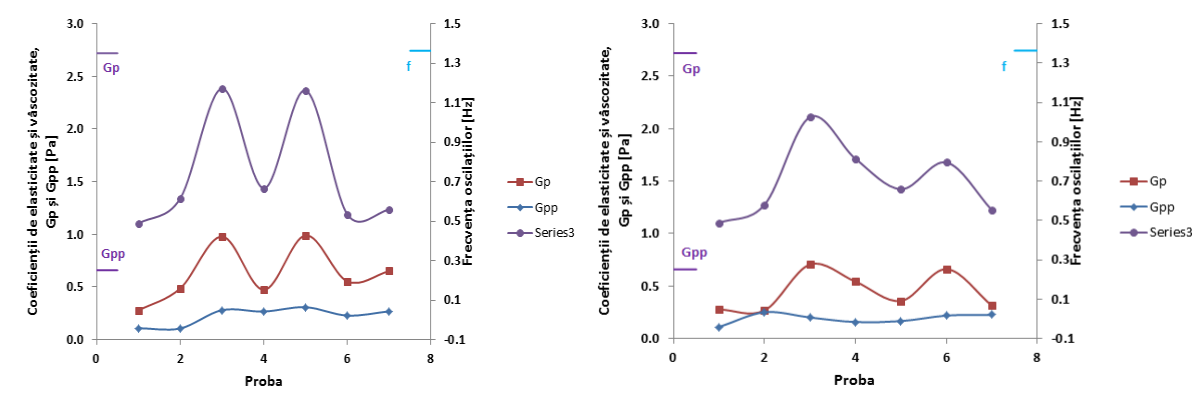
Figura V.27 Prelucrarea datelor experimentale ale etapei de fluaj timpuriu.
Curbele corespunzătoare modelelor Jeffreys ajustate dependențelor timp – deformație
pentru patru dintre hidrogelurile investigate.

*Tabelul V.8 Valorile numerice ale coeficienților modelelor reologice Jeffreys ajustate fluajului timpuriu asupra hidrogelurilor investigate
și valorile constantelor de timp asociate*

Agentul reticulant	Parametrul sau constanta	Rapoartele de amestecare a precursorilor biomacromoleculari aK : NaHyal : GellOx/PullOx						
		31 : 1 : 0	29,5 : 1 : 1,5	26 : 1 : 5	23 : 1 : 8	19 : 1 : 12	15,5 : 1 : 15,5	29,5 : 1 : 1,5
GellOx	f [Hz]	0,4879	0,6151	1,1723	0,6669	1,1621	0,5339	0,5586
	G [Pa]	0,2910	0,5024	0,9934	0,4923	1,0013	0,5659	0,6643
	η_1 [Pa·s]	0,0297	0,0183	0,0445	0,0523	0,0459	0,0403	0,0543
	η_2 [Pa·s]	1,3561	1,5638	6,9579	2,6331	10,5520	3,6351	5,9855
	G_n' [Pa]	0,2774	0,4868	0,9803	0,4726	0,9911	0,5531	0,6521
	G_n'' [Pa]	0,1095	0,1074	0,2807	0,2675	0,3091	0,2288	0,2699
	λ_{ret} [s]	4,6604	3,1128	7,0039	5,3485	10,5520	6,4235	9,0103
	λ_{rel} [s]	4,7625	3,1492	7,0487	5,4548	10,5979	6,4947	9,0919
PullOx	f [Hz]	0,4879	0,5798	1,0259	0,8138	0,6591	0,7954	0,5527
	G [Pa]	0,2910	0,2976	0,7188	0,5457	0,3724	0,6741	0,3249
	η_1 [Pa·s]	0,0297	0,0926	0,0365	0,0399	0,0377	0,0398	0,0578
	η_2 [Pa·s]	1,3561	1,8257	4,1550	12,8357	2,0432	4,3519	2,9091
	G_n' [Pa]	0,2774	0,2686	0,7055	0,5423	0,3583	0,6614	0,3121
	G_n'' [Pa]	0,1095	0,2506	0,2007	0,1573	0,1659	0,2189	0,2255
	λ_{ret} [s]	4,6604	6,1353	5,7802	23,5214	5,4867	6,4556	8,9525
	λ_{rel} [s]	4,7625	6,4464	5,8310	23,5945	5,5879	6,5147	9,1306

*Tabelul V.9 Valorile numerice ale coeficienților modelului reologic Jeffreys ajustat
măsurătorilor de fluaj timpuriu asupra hidrogelului din alginat
și valorile constantelor de timp asociate*

Parametrul reologic sau constanta							
f [Hz]	G [Pa]	η_1 [Pa·s]	η_2 [Pa·s]	G_n' [Pa]	G_n'' [Pa]	λ_{ret} [s]	λ_{rel} [s]
1,3631	2,7494	0,0700	13,8753	2,7204	0,6592	5,0467	5,0722



(a) Hidrogelurile reticulate cu Gellox

(b) Hidrogelurile reticulate cu PullOx

Figura V.28 Compararea valorilor parametrilor reologici pentru fluajul timpuriu, atât între seriile de hidrogeluri investigate, cât și în raport cu hidrogelul din 0,5 % alginat de sodiu.

În perioada fluajului timpuriu, în care componenta vâscoasă (asociată curgerii) nu se manifestă încă pregnant, valorile celor două module neliniare (de elasticitate, G_n' și vâscos, G_n'') sunt direct proporționale între hidrogelul din alginat și hidrogelurile atelocolagen – polizaharidice. Frecvențele oscilațiilor în regimul tranzitoriu sunt și ele în directă proporționalitate între cele două tipuri de hidrogeluri.

Pentru rapoartele de aK:polizaharid oxidat de aproximativ 3:1 s-a observat aceeași scădere a modulului de elasticitate, confirmând evoluția parametrilor Burgers.

V.2 Caracterizarea biologică a hidrogelurilor

V.2.1 Citotoxicitatea hidrogelurilor

V.2.1.1 Testul MTT

Metoda MTT reprezintă o primă etapă în testarea efectelor citotoxice pe care hidrogelurile le-ar putea avea asupra celulelor. Conform ISO 10993-5:2009 procentele

corespunzând unei viabilități celulare de peste 80% caracterizează materiale considerate non-citotoxice, în timp ce intervalul 80%-60% corespunde unei citotoxicități reduse, 60%-40% unei citotoxicități moderate, iar valorile mai mici de 40%, unei citotoxicități ridicate exercitate de către produsul testat.

La vizualizarea macroscopică a hidrogelurilor cu celule încapsulate, imersate în soluția de MTT se poate observa apariția colorației specifice celulelor viabile, care au metabolizat indicatorul, hidrogelul căpătând o nuanță violet. Cu ajutorul microscopului inversat se pot vedea cristalele de formazan formate la nivelul celulelor (Figura V.29).

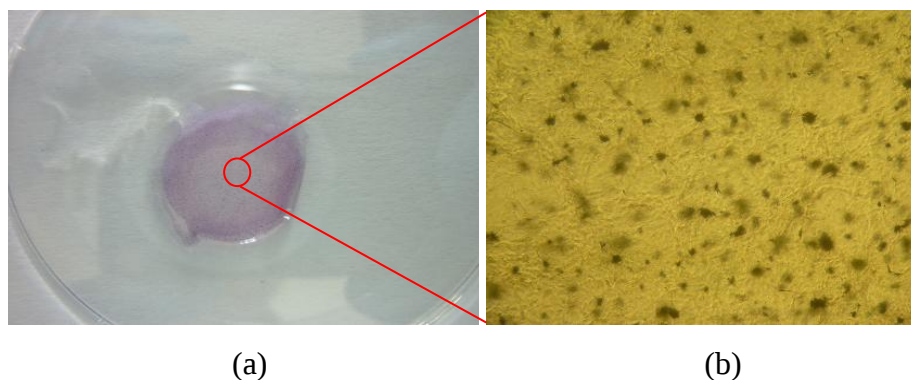


Figura V.29 Imagine macroscopică (a) și microscopică (b) a hidrogelului cu celule încapsulate după expunerea la MTT și formarea cristalelor de formazan ca urmare a metabolismului celular.

Potențialul efect citotoxic al hidrogelurilor realizate pe bază de atelocolagen reticulat cu gellan parțial oxidat a fost testat pe două tipuri de celule, respectiv fibroblaste primare și celule stem adipoase, sensibilitatea acestora fiind diferită la acțiunea agenților citotoxici. Rezultatele obținute în urma testării la 24, 48 și 72 de ore sunt prezentate în Figura V.30.

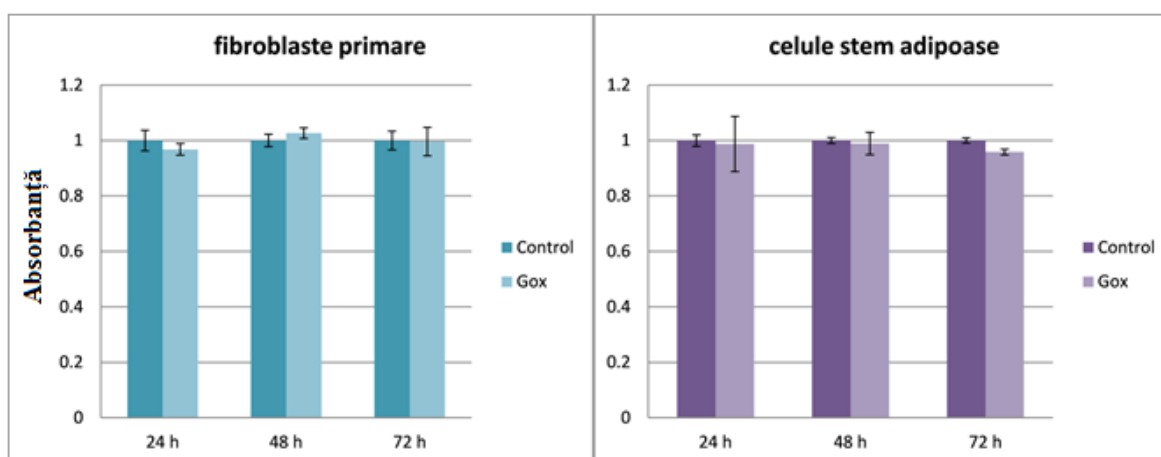


Figura V.30 Citotoxicitatea hidrogelurilor pe bază de gellan oxidat, compoziția r(IV) asupra viabilității fibroblastelor primare și celulelor stem derivate din țesut adipos

Din Figurile V.30 și V.31 se observă faptul că procentul de viabilitate celulară în toate cele 3 zile de testare nu doar se încadrează în valori superioare a 80% comparativ cu celulele cu rol de control, ci chiar înregistrează valori de peste 95%, ceea ce confirmă faptul că hidrogelurile realizate nu exercită efecte citotoxice asupra celulelor testate. Prezența hidrogelurilor în godeurile cu celule nu determină eliberarea de produși citotoxici ce ar putea afecta viabilitatea celulară; în plus, prezența fizică a hidrogelurilor pare, de asemenea, să nu exercite efecte negative asupra celulelor aderate la suprafața plăcii de cultură. Acest efect este confirmat și de imaginile obținute cu ajutorul microscopului inversat prin care a fost analizată morfologia celulelor în prezența hidrogelurilor.

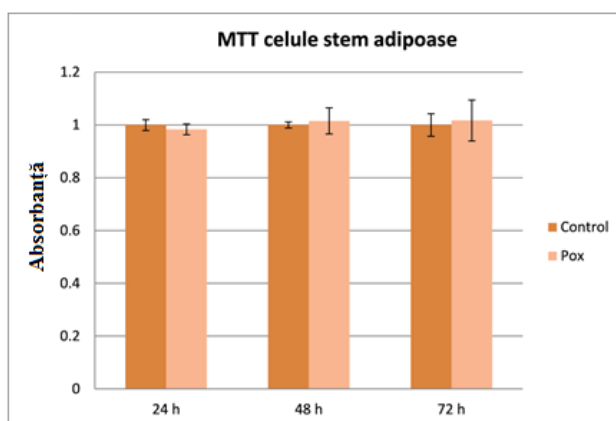


Figura V.31 Citotoxicitatea hidrogelurilor pe bază de pullulan oxidat, compoziția r(IV)) asupra viabilității celulelor stem derivate din țesut adipos

Din Figura V.32 se poate constata faptul că celulele prezintă o morfologie normală, specifică celulelor stem mezenchimale, sunt întinse pe substrat, iar în unele zone se observă tendința de populare a materialului.

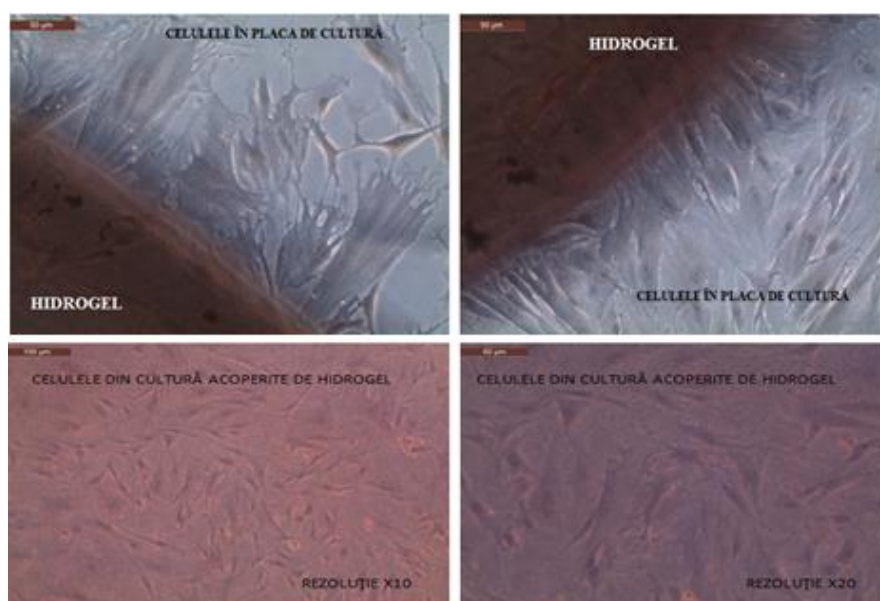


Figura V.32 Morfologia celulelor stem adipoase în prezența hidrogelurilor

Viabilitatea celulară în prezența hidrogelurilor a fost confirmată și cu ajutorul microscopiei de fluorescență. Celulele aderate la placa de cultură au fost cultivate timp de 7 zile în prezența hidrogelului după care s-a realizat colorarea cu calceină AM, un indicator al viabilității celulare ce permite menținerea celulelor vii pentru realizarea testului.

Din Figura V.33 se poate observa faptul că celulele au format un monostrat la suprafața plăcii de cultură, rămânând aderate la aceasta și menținându-și morfologia. Formarea monostratului confirmă capacitatea de proliferare a celulelor în cultură, care nu a fost afectată de prezența hidrogelului.

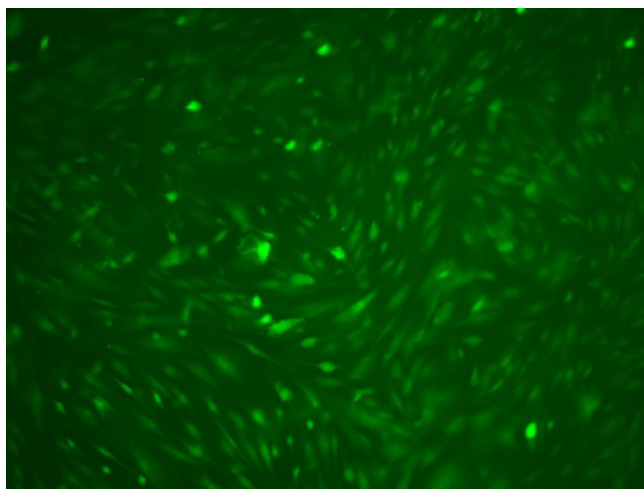


Figura V.33 Viabilitatea celulelor colorate cu calceină, aderate la suprafața plăcii de cultură, în prezența hidrogelului (100x)

V.2.2.2 Testul live/dead

Evaluarea proporției de celule viabile și neviabile din hidrogeluri, la diferite intervale de timp după încapsulare a fost realizată prin colorarea celulelor viabile cu ajutorul calceinei AM și a celulelor neviabile cu ajutorul iodurii de propidiu și urmărirea timp de 5 zile a culturilor. Morfologia, migrarea, proliferarea și atașarea celulelor într-un mediu tridimensional depinde de numeroși factori ce țin de proprietățile mecanice ale substratului și de prezența semnalelor pentru aderarea celulelor. În hidrogelurile realizate din polimeri sintetici, celulele capătă o morfologie rotundă, deși în cele mai multe cazuri continuă să își mențină viabilitatea. În hidrogelurile de tipul celor realizate pe bază de collagen, celulele capătă o morfologie alungită, asemănătoare culturilor în sistem bidimensional.

Această morfologie a fost observată și pentru celulele încapsulate în hidrogelurile realizate în urma reticulării cu gellan sau pullulan oxidat, indiferent de tipul celulelor

încapsulate: fibroblaste, celule stem derivate din țesutul adipos sau celule tecal-interstițiale din stroma ovariană.

În Figura V.34 pot fi observate celulele aderate la hidrogeluri, cu formarea unor legături între ele care facilitează semnalizarea inter-celulară.

După 48 de ore de cultură în hidrogeluri, testul live/dead a indicat faptul că celulele își mențin viabilitatea în hidrogeluri, majoritatea prezentând fluorescența verde, un număr foarte redus dintre acestea emițând o fluorescență roșie, specifică în acest caz celulelor neviabile.

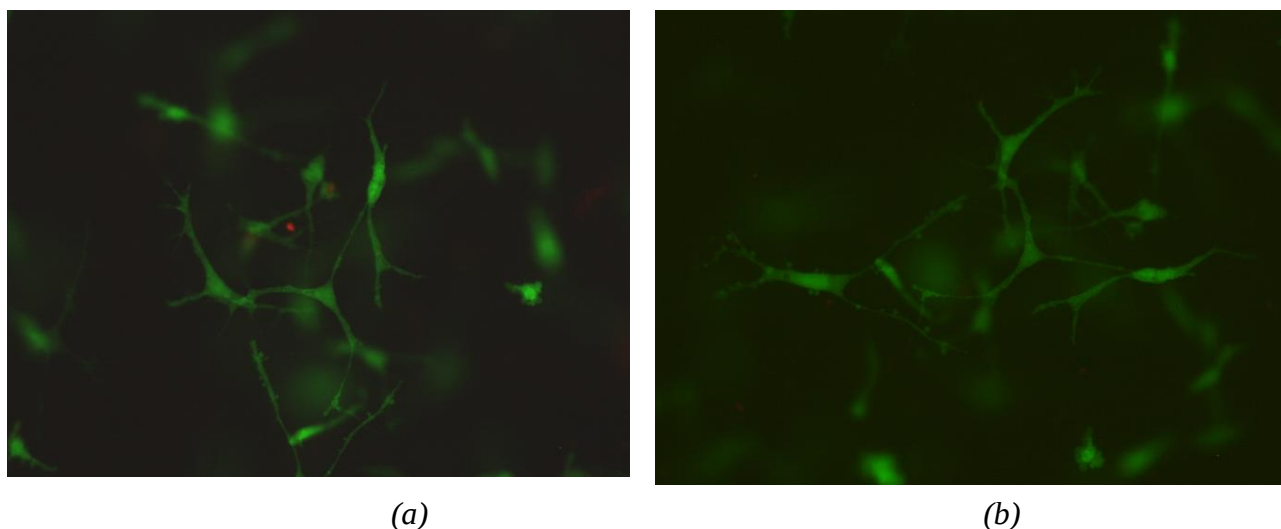


Figura V.34 Celule tecale încapsulate în hidrogel reticulat cu GellOx (a), PullOx (b); 200x

Rezultatele testelor realizate după 5 zile de cultură au indicat menținerea viabilității celulelor încapsulate, proporția celulelor care au emis fluorescență roșie fiind, de asemenea, foarte mică, la fel ca la 48 de ore. În schimb s-au observat diferențe între hidrogelurile reticulate cu gellan parțial oxidat și cele cu pullulan. Astfel, în hidrogelurile reticulate cu gellan s-a menținut morfologia și viabilitatea celulelor, numărul acestora fiind vizibil mai mare. În schimb, în hidrogelurile reticulate cu pullulan, deși cea mai mare parte a celulelor își mențin viabilitatea, morfologia acestora nu mai este la fel de alungită (Figura V.35). Acest aspect poate fi corelat cu porozitatea aparent mai redusă a hidrogelurilor reticulate cu pullulan care ar putea afecta transportul nutrienților și comunicarea inter-celulară, porozitate ce poate fi influențată de masa moleculară mai mică a pullulanului comparativ cu cea a gellanului, ceea ce îi permite accesul mai facil către macromoleculele de atelocolagen în vederea inițierii procesului de reticulare.

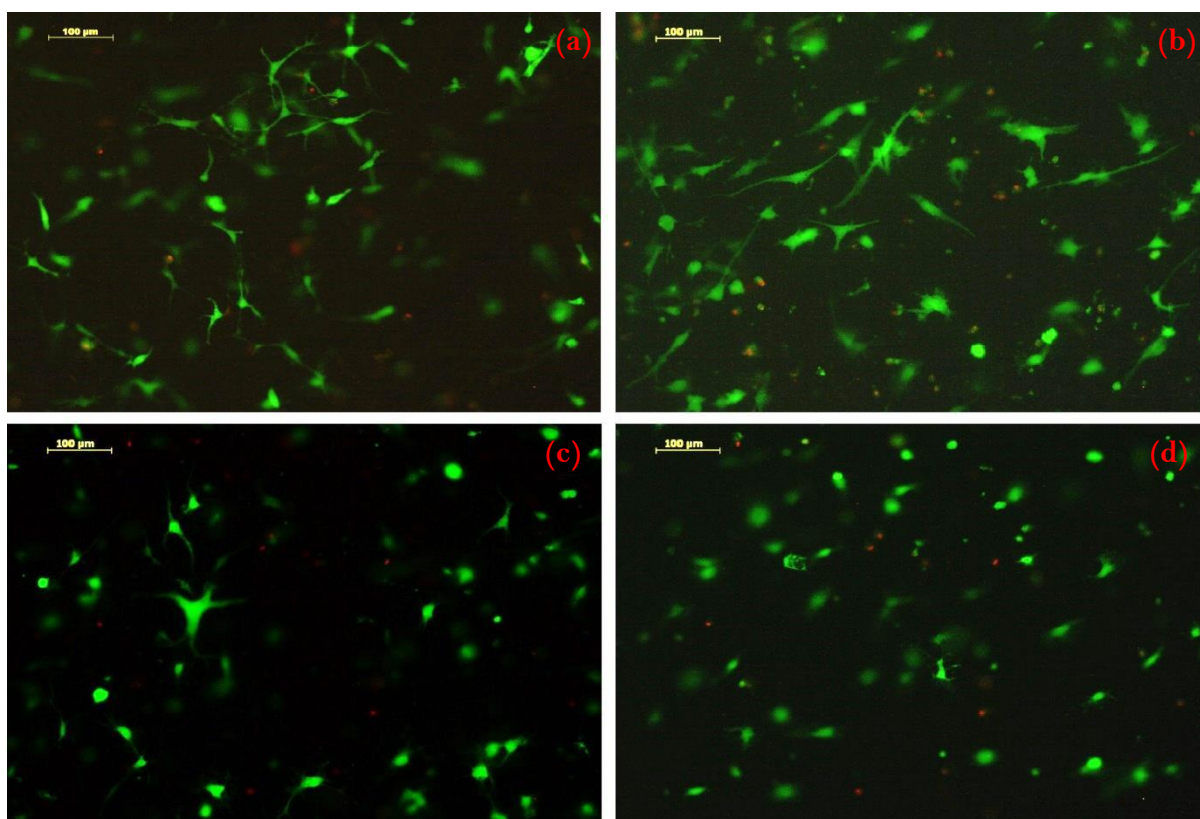


Figura V.35 Viabilitatea celulelor încapsulate în hidrogeluri reticulate cu GellOx (a, b), respectiv PullOx (c, d) după 48 de ore (a, c) și 5 zile (b, d)

V.2.5 Analiza contracției hidrogelurilor cu fibroblaste încapsulate

Celulele au capacitatea de a răspunde la proprietățile mecanice ale mediului din jur, convertind semnalele mecanice în semnale chimice care influențează expresia genică. Ca urmare, proprietățile mecanice ale hidrogelurilor în care sunt încapsulate celule trebuie stabilite astfel încât acestea să corespundă țesutului nativ, cu menținerea în același timp a proprietăților hidrogelului [211]. Contracția hidrogelurilor pe bază de collagen, ca acțiune a activității celulelor încapsulate, determină variații ale coeficienților de difuzie a nutrienților, în special în vecinătatea celulelor [199]. Unul dintre obiectivele reticulării collagenului se referă și la reducerea acestui efect de contracție pentru menținerea unei morfologii normale a celulelor și pentru evitarea apoptozei [212-214].

A fost studiat modul în care gradul de oxidare și cel de reticulare influențează contracția hidrogelurilor cu celule încapsulate. În Figura V.42 sunt prezentate imaginile hidrogelurilor după 5 zile de cultură, putându-se observa diferențele între diametrele diferitelor probe testate. Rezultatele calculului gradului de contracție comparativ cu hidrogelurile imediat după încapsulare sunt redată în Tabelul V.10.

Măsurătorile realizate în vederea observării influenței gradului de oxidare și a cantității de polizaharid oxidat asupra contracției hidrogelului cu fibroblaste încapsulate au indicat faptul că cele mai mici grade de contracție au fost înregistrate, așa cum era de așteptat, pentru gradul cel mai mare de oxidare și pentru raportul cel mai mare chitosan oxidat:colagen, respectiv pentru proba 3-3, contracția fiind de 31% față de dimensiunea inițială a hidrogelului. O contracție de 50% față de dimensiunea inițială a fost observată pentru probele în care s-a utilizat chitosanul cu cel mai mic grad de oxidare și în cel mai mic raport.

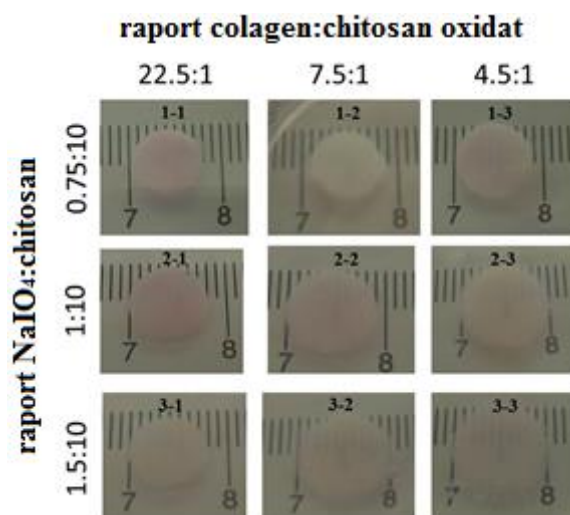


Figura V.42 Măsurarea dimensiunilor hidrogelurilor realizate prin reticulare cu chitosan adăugat în rapoarte diferite și cu grade diferite de oxidare

Tabelul V.10 Gradul de contracție al hidrogelurilor populate cu fibroblaste

Probă	Dimensiune hidrogel (mm)	Contracție (%)
Ziua 0 de cultură	160	100
1-1; 1-2; 1-3	80; 85; 90	50; 47; 44
2-1; 2-2; 2-3	80; 95; 105	50; 41; 34
3-1; 3-2; 3-3	85; 110; 110	47; 31; 31

Un grad mai mare de oxidare presupune un grad mai mare de reticulare a hidrogelului, grupările aldehydice disponibile pentru formarea bazelor Schiff fiind mai numeroase. Rezultă astfel un hidrogel cu o structură mai densă care reduce mobilitatea și posibilitățile de migrare a celulelor. Astfel, deși cel mai mic grad de contracție s-a obținut pentru proba 3-3, pentru a asigura citocompatibilitatea materialului, precum și pentru a avea

un mediu compatibil cu migrarea și proliferarea celulelor, s-a ales a se lucra cu raportul utilizat pentru proba 2-3 (raport NaIO_4 :chitosan – 1,5:10, raport collagen:chitosan oxidat – 4,5:1) întrucât diferența de contracție dintre această probă și proba 3-3 nu este una semnificativă.

Aceste sisteme tridimensionale de cultură au fost evaluate cu privire la viabilitatea pe termen lung a celulelor și potențialul funcțional al acestora. Toate hidrogelurile populate au avut capacitatea de a elibera celule viabile după 14 zile de cultură. Depunerea directă a hidrogelurilor pe flaconul de cultură a permis continuarea proliferării celulelor inclusiv în afara hidrogelului, o parte migrând din acesta (Figura V.43), ceea ce înseamnă că celulele și-au menținut funcționalitatea după 14 zile de cultură în hidrogel.

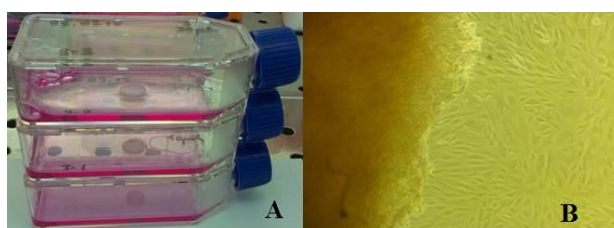


Figura V.43 (a) Cultură tisulară 3D; (b) Migrarea celulelor din hidrogel după 14 zile de cultură

V.2.6 Morfologia și distribuția celulelor în hidrogeluri

Aplicația pentru care au fost realizate hidrogelurile pe bază de atelocolagen reticulat cu gellan, respectiv pullulan parțial oxidat se referă la încapsularea celulelor, inițial a unor celule de tipul celor stem adipoase, urmând ca apoi să fie încapsulate celule ale stromei ovariene. Deși hidrogelurile obținute prezintă un anumit grad de transparență, microscopia optică are unele limitări în ceea ce privește vizualizarea celulelor din profunzimea lor, chiar dacă hidrogelurile sunt realizate astfel încât dimensiunile lor să permită difuzia nutrienților din mediul de cultură. Pentru o mai bună vizualizare a celulelor încapsulate în hidrogel, acestea au fost colorate cu markeri fluorescenți pentru nucleii celulari și pentru fibrele de actină, în acest mod putând-se observa distribuția celulelor în hidrogeluri și morfologia acestora.

În Figura V.44 se pot observa celulele încapsulate în hidrogeluri, imaginea fiind una în câmp luminos, captată cu ajutorul microscopului inversat. Aceleași imagini se regăsesc apoi în Figurile V.45 și V.46, celulele fiind colorate cu markerii fluorescenți DAPI și rhodamin-phalloidin. În Figura V.45 se pot observa celulele încapsulate în hidrogeluri reticulate cu gellan parțial oxidat; imaginea a) reprezintă colorarea cu DAPI a nucleilor, iar b)

atât a nucleilor, cât și a fibrelor de actină. În Figura V.46 se pot observa celulele încapsulate în hidrogelurile cu pullulan parțial oxidat.

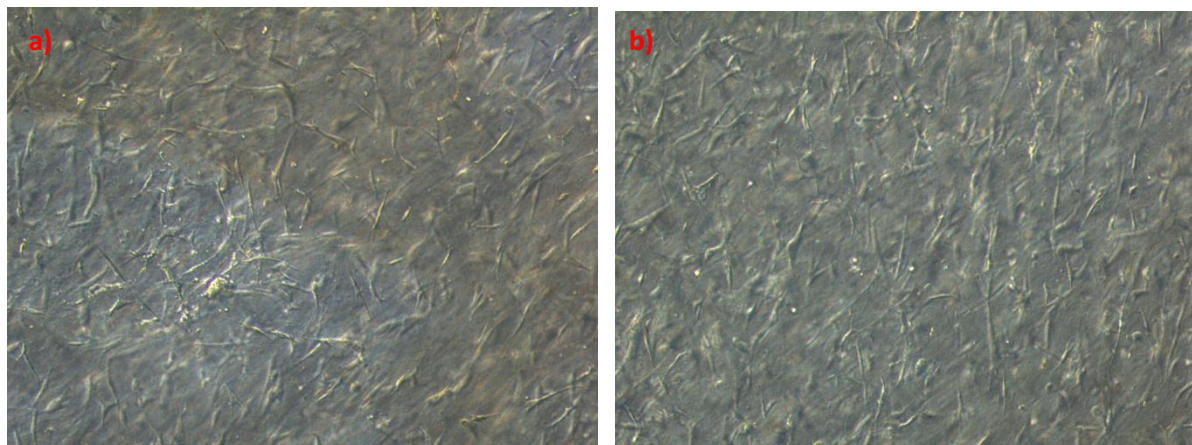


Figura V.44 Imagine microscopică în câmp luminos a celulelor încapsulate în gellan (a), respectiv pullulan (b) parțial oxidat; 100x

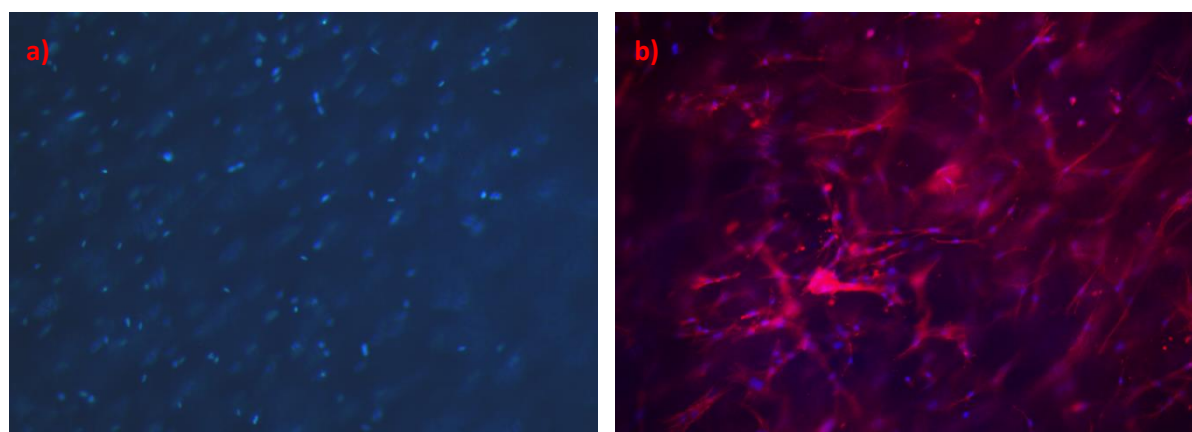


Figura V.45 (a) Colorarea nucleilor celulelor încapsulate în hidrogel reticulat cu GellOx. (b) imagine compozită (DAPI și rhodamin-phalloidin)- celule încapsulate în hidrogel reticulat cu GellOx (r(IV)); 200x

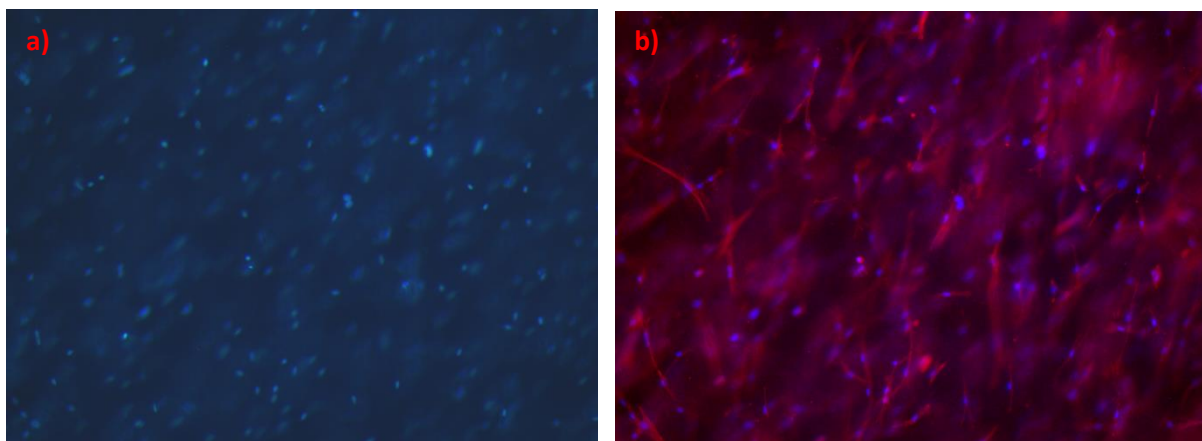


Figura V.46 (a) Colorarea nucleilor celulelor încapsulate în hidrogel reticulat cu PullOx. (b) colorarea cu DAPI și rhodamin-phalloidin a celulelor încapsulate în hidrogel reticulat cu PullOx, r(IV); 200x

Din figurile prezentate se poate observa faptul că celulele sunt uniform distribuite în hidrogeluri. Morfologia lor este una specifică celulelor aderente la substrat, ele fiind alungite, după cum se poate observa și în urma analizei aspectului filamentelor de actină. De asemenea, nu se pot observa diferențe majore între hidrogelurile reticulate cu gellan parțial oxidat și cele reticulate cu pullulan parțial oxidat. Cu ajutorul microscopiei de fluorescență s-a putut confirma și viabilitatea celulelor încapsulate în hidrogeluri, folosind calceina AM, cu fluorescență verde, aplicată hidrogelurilor cu celule încapsulate, după 5 zile de cultură. În Figura V.47 se pot observa celulele viabile distribuite uniform în hidrogeluri. Hidrogelul reticulat cu pullulan parțial oxidat a înregistrat un grad mai mare de contracție, de aceea se observă în urma colorării cu marker fluorescent un număr mai mic de celule viabile în hidrogel, după 5 zile de cultură.

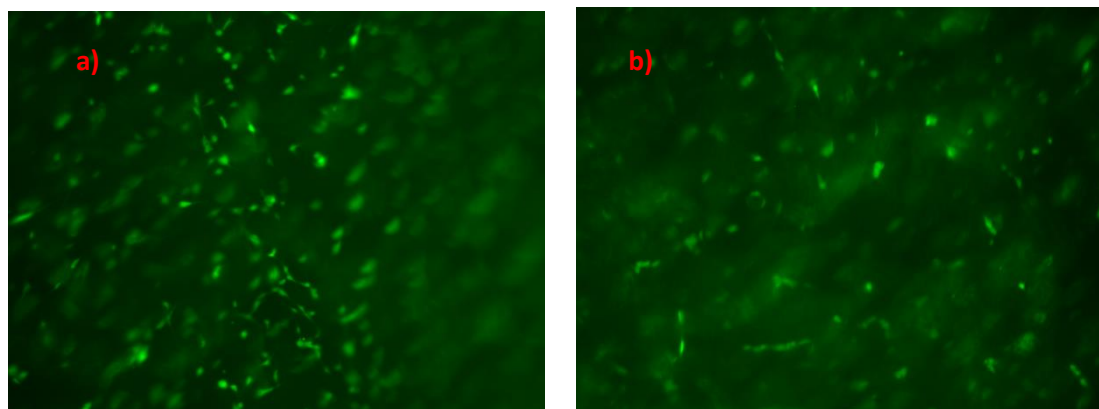


Figura V.47 Colorarea cu calceină AM a celulelor încapsulate în hidrogeluri cu gellan (a), respectiv pullulan parțial oxidat (b); 100x

V.2.8 Analiza histologică și implantarea subcutanată a hidrogelurilor

Analiza histologică a sistemelor hidrogel-celule testate *in vitro* a evidențiat menținerea morfologiei normale a celulelor încapsulate. Acest lucru poate fi observat în Figura V.52, în care pot fi vizualizate celule cu formă alungită, integrate în structura suportului. În ambele tipuri de hidrogeluri se observă celule în diviziune. O ușoară diferență a putut fi observată între hidrogelurile reticulate cu gellan, respectiv pullulan oxidat, aceea că în primele celulele prezintă o formă mai alungită. Acest aspect poate fi corelat cu o contracție de suprafață mai mare observată în probele reticulate cu pullulan, fapt ce ar putea fi explicat prin diferențele dintre masele moleculare ale celor două polizaharide utilizate ca agenți de reticulare.

Analiza histologică *in vivo* a hidrogelurilor cu celule stem încapsulate derivate din țesutul adipos, a fost realizată după 2, 5 și 7 zile de implantare subcutanată. S-a observat că după cele 7 zile hidrogelurile erau încă prezente în buzunarul subcutanat în care au fost

introduse, iar imaginile histologice arată integrarea treptată a structurilor de tip hidrogel în țesutul nativ (Figura V.53).

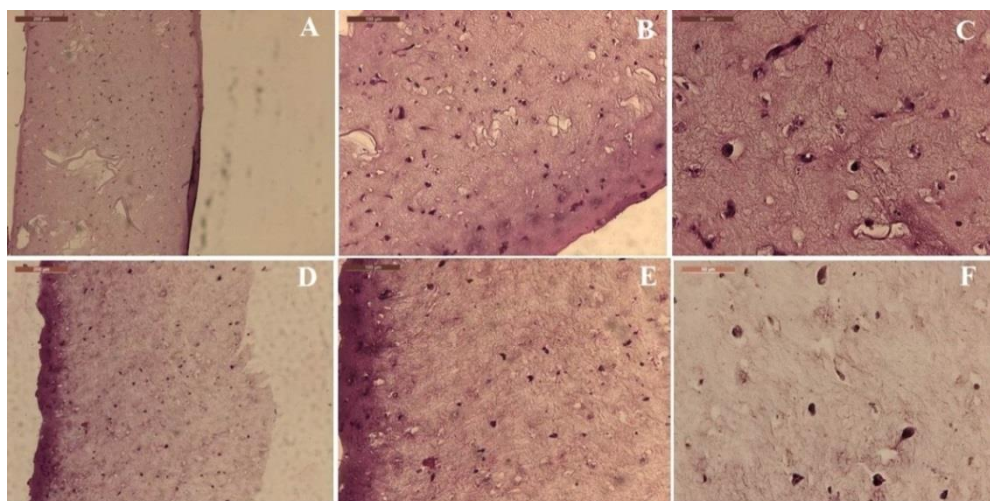


Figura V.52 Imagini microscopice cu secțiuni histologice colorate ale hidrogelurilor populate cu celule, la diferite ordine de mărime (A-C – hidrogeluri reticulate cu gellan oxidat, obiective: 10x, 20x, 40x); D-F hidrogeluri reticulate cu pullulan, obiective: 10x, 20x, 40x)

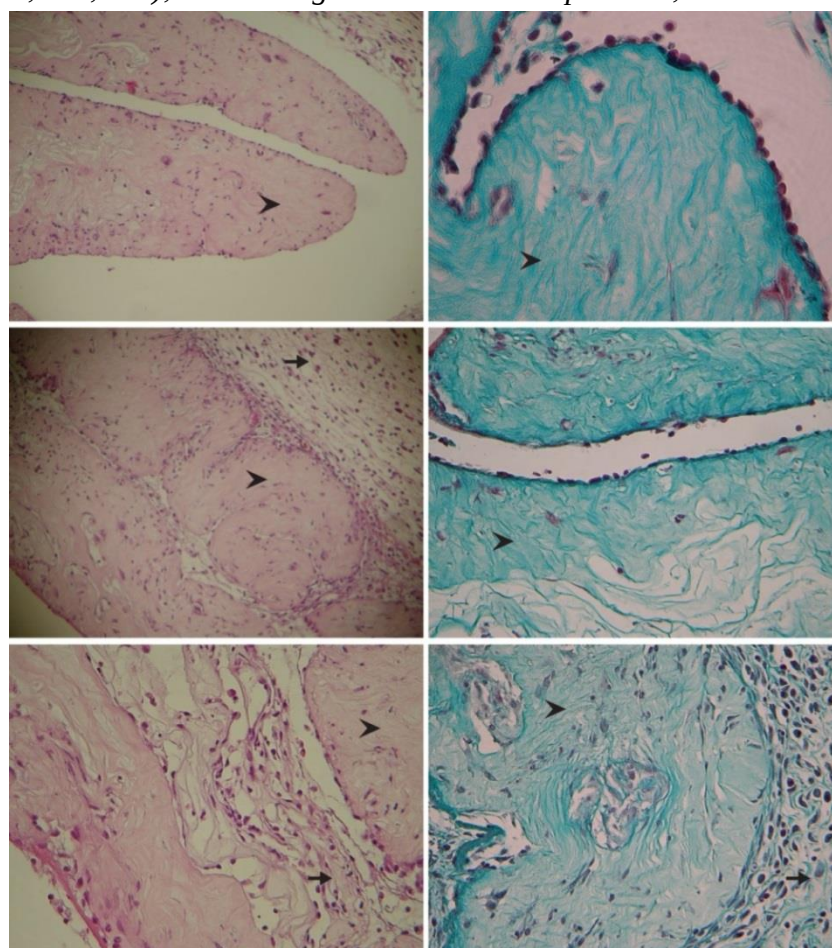


Figura V.53 Imagini histologice ale hidrogelurilor implantate subcutanat după 2 zile (a, b), 5 zile (c, d) și 7 zile (e, f) de la implantare. Capul de săgeată indică hidrogelul, iar săgeata întreagă, țesutul nativ; colorare cu HE (a, c, e), respectiv colorație tricromă Masson (b, d, f).

Macroscopic și microscopic nu au fost observate semne inflamatorii, aceasta confirmând citocompatibilitatea *in vivo* a hidrogelurilor obținute. Menținerea timp de cel puțin 7 zile *in vivo* a structurii hidrogelurilor și integrarea treptată a acestora le recomandă pentru aplicații ale medicinei regenerative, cu posibilitatea implantării în țesuturi cu funcționalitate compromisă a hidrogelurilor cu celule încapsulate, cu scopul restituirii funcției acestora.

V.3 Aplicații ale hidrogelurilor cu celule încapsulate

V.3.1 Aplicații în ingineria tisulară a ovarului

Funcționarea normală a celulelor încapsulate a fost evaluată prin determinarea capacității celulelor ovariene de a interacționa și de a secreta hormoni după cultura în hidrogeluri. Celulele tecal-interstițiale sunt celule secretorii active din stroma ovariană care interacționează funcțional cu celulele granuloase în vederea convertirii androstenedionului în estradiol prin activitatea specifică a aromatazei, conform teoriei „două-celule doi-hormoni”, aspect ce necesită o semnalizare foarte complexă între celulele ovarului. [221]

Cooperarea intercelulară în condiții de cultură 3D a fost demonstrată prin cuantificarea secreției de estradiol după 48 de ore și cinci zile de cultură în mediu suplimentat cu FSH și LH (cei doi hormoni secretați de hipofiza anterioară care induc formarea androstenedionului la nivelul celulelor tecale (LH) pe de o parte și activarea aromatazei la nivelul celulelor granuloase (FSH) pe de altă parte). E2 (17 β -estradiol) este izoforma principală de estradiol din sânge, cu o masă moleculară de 272,3 Da.

Rezultatele obținute în urma detecției estradiolului (observate în Tabelul V.11) din mediul de cultură al sistemelor hidrogel-celule au indicat faptul că celulele și-au menținut capacitatea de a secreta hormoni după încapsularea în hidrogeluri timp de cel puțin 5 zile.

Tabelul V.11 Concentrațiile 17 β -estradiol determinate în mediul utilizat pentru co-cultura celulelor încapsulate tecal-interstițiale și granuloase

Zile de cultură	Control (co-cultură 2D) [pg/mL]	Hidrogel reticulat cu GellOx [pg/mL]	Hidrogel reticulat cu PullOx [pg/mL]
2 zile	23.92 $\pm$ 2.12	25.43 $\pm$ 3.14	23.92 $\pm$ 4.18
5 zile	24.63 $\pm$ 1.16	26.34 $\pm$ 2.12	24.24 $\pm$ 2.16

După 48 de ore de cultură, valorile determinate pentru 17 β -estradiol au fost de 25,43 pg/ml pentru hidrogelurile reticulate cu gellan și 23,92 pg/ml pentru cele reticulate cu pullulan. Valoarea obținută pentru celulele cultivate drept control, în placa de cultură, a fost de 23,92 pg/ml. După cinci zile de cultură în mediu proaspăt având aceeași compoziție ca cea inițială, valorile obținute au fost nesemnificativ modificate ceea ce indică faptul că celulele și-au menținut proprietățile secretorii și faptul că hidrogelurile permit comunicarea intercelulară și difuzia hormonilor în mediul de cultură. Nu au fost observate diferențe majore între cele două hidrogeluri și între hidrogeluri și celulele de control, acest lucru indicând faptul că matricea obținută nu împiedică eliberarea hormonilor. Nivelul de estradiol determinat în mediul de cultură ne confirmă faptul că între celulele tecal-interstițiale și cele granuloase există o interacțiune normală, conform teoriei „două celule doi hormoni” care presupune mecanisme complexe de semnalizare între celulele ovarului. Rezultatele obținute în această teză sunt similare ca valori ale estradiolului cu cele obținute de Sittadjody et al. (2015) [45] aceștia realizând microcapsule pe bază de alginat, pentru secreția de hormoni ovarieni. Trebuie subliniat totuși că hidrogelurile obținute din componente native ale matricii extracelulare prezintă avantaje față de alginat sau de hidrogelurile din componente sintetice în ceea ce privește prezența semnalelor specifice pentru adeziunea celulară, care se reflectă în primă fază în morfologia celulelor încapsulate.

V.3.2 Criostocarea hidrogelurilor cu celule încapsulate

Criostocarea celulelor încapsulate în hidrogeluri a fost studiată în special pentru celulele secretoare de insulină, fiind obținute rezultate diferite la compararea tehnicilor de înghețare lentă și vitrificare [222], criostocarea celulelor aderente sau în suspensie [223] sau pentru includerea crioprotectantului direct în compoziția hidrogelului [224]. Criostocarea celulelor aderente poate prezenta o serie de avantaje în ceea ce privește rata de supraviețuire și expresia markerilor în cazul celulelor stem [225]. După încapsulare și 48 de ore de cultură, sistemele hidrogel-celule obținute au fost imersate în soluția crioprotectoare în care au fost lăsate timp de 10 minute, apoi au fost înghețate la -85 °C, utilizând ca soluție cu rol de crioprotecție, serul fetal bovin suplimentat cu 10% DMSO. Viabilitatea celulelor după dezghețare a fost evaluată cu ajutorul testului live/dead, observându-se că majoritatea celulelor sunt viabile, fapt confirmat de emiterea fluorescenței verzi (Figura V.54).

Morfologia celulelor precum și aderarea acestora la substratul reprezentat de hidrogel au fost de asemenea menținute. În plus, hidrogelul și-a păstrat integritatea după dezghețare, elasticitatea și posibilitatea manipulării acestuia fiind aceleași ca înaintea înghețării. Nivelul

ridicat al viabilității celulelor după dezghețare poate fi explicat și de efectul crioprotector al hialuronatului de sodiu, după cum a fost menționat în unele studii. [226, 227]

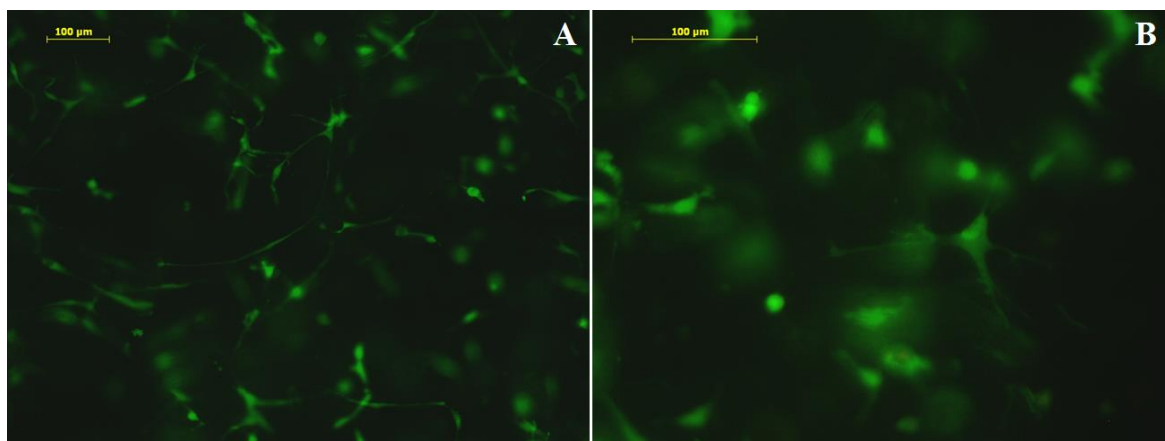


Figura V.54 Viabilitatea celulelor încapsulate în hidrogeluri după dezghețare, evidențiată cu ajutorul calceinei (A-100x, B-200x);

Astfel, prin utilizarea unei metode ieftine, simple și rapide s-a reușit criostocarea hidrogelurilor cu celule încapsulate oferind astfel posibilitatea considerării hidrogelurilor ca fiind sisteme "ready-to-use", cu posibilitatea transportului acestora și utilizării imediat după dezghețare în aplicații ale medicinei regenerative.

CONCLUZII

În cadrul prezentei teze au fost obținute noi sisteme de încapsulare a celulelor în hidrogeluri atelocolagen-polizaharide, apte să asigure viabilitatea și să susțină proliferarea celulară. Polizaharidele parțial oxidate au avut în cadrul hidrogelurilor atât rol structural, cât și rol de agent de reticulare. Hidrogelurile rezultate s-au dovedit non-citotoxice în raport cu celulele stem derivate din țesutul adipos, cu fibroblastele dermice în cultură primară și cu celulele izolate din stroma ovariană, în special datorită biocompatibilității intrinseci a precursorilor macromoleculari.

Prepararea hidrogelurilor cu matrice mixtă, atelocolagen – polizaharide s-a putut realiza în condițiile proiectării caracteristicilor lor fizico-chimice, prin ajustarea parametrilor de compoziție, respectiv a:

- naturii precursorilor macromoleculari și nivelului lor de puritate;
- gradului de abatere de la starea nativă a componentei scleroproteice;
- stării și nivelului de agregare supramoleculară preliminară a precursorilor;
- gradului de funcționalizare a polizaharidului ce joacă rol de agent reticulant;
- rapoartelor de amestecare între precursori;

Menținerea atelocolagenului drept componentă majoritară în amestecuri asigură gelifieri rapide (de ordinul câtorva zeci de minute) și corelate cu avansul fibrilării sale sub efectul încălzirii. Funcționalizarea prin oxidare controlată a unuia dintre polizaharidele partener și utilizarea sa ca agent reticulant permite controlul comportamentului reologic al hidrogelurilor, atât în raport cu solicitările mecanice, cât și sub efectul variației temperaturii. Rezultă astfel hidrogeluri cu prag de sensibilitate la influențele externe, cum sunt variațiile de tărie ionică și de temperatură. Caracterizarea reologică a hidrogelurilor evidențiază comportamente vâsco-elastice din care rezultă reticularea mixtă a acestora, atât fizică, precum și covalentă, prima datorată în special comportamentului atelocolagenului la neutralizare și la temperatură fiziologică, iar cea de-a doua datorată funcționalizării prin oxidare parțială a polizaharidelor utilizate ca agenți de reticulare datorită prezenței grupărilor aldehidice. Structura fibrilară a hidrogelurilor este compatibilă cu aderarea celulelor la substrat, prezența atelocolagenului facilitând interacțiunea cu celulele a căror morfologie este una alungită, spre deosebire de morfologia celulelor încapsulate în hidrogeluri sintetice, care nu prezintă semnale pentru ancorarea celulară.

Menținerea viabilității și posibilitatea proliferării celulelor încapsulate în hidrogeluri se datorează și capacității acestora de a permite difuzia nutrienților din mediul de cultură spre celule și a produșilor rezultați în urma metabolismului către mediul de cultură, aspect ce facilitează și comunicarea inter-celulară.

Analiza comportamentului fizico-chimic al hidrogelurilor a fost completată de analiza din punct de vedere biologic, luând în considerare scopul aplicativ al acestora. Astfel, alături de lipsa efectului citotoxic demonstrat în raport cu celulele primare de tipul fibroblastelor sau celulelor stem derivate din țesutul adipos, hidrogelurile obținute au capacitatea de a permite funcționarea normală a celulelor încapsulate, precum și comunicarea inter-celulară complexă. Acest aspect este demonstrat prin cuantificarea secreției de estradiol din mediul de cultură care confirmă faptul că hidrogelurile permit difuzia moleculelor din mediu spre celule și invers precum și în interiorul hidrogelurilor, fără să împiedice interacțiunea dintre celule.

Caracterizarea *in vivo* a hidrogelurilor a demonstrat posibilitatea utilizării acestora ca sisteme de încapsulare și livrare a celulelor în aplicații ale medicinei regenerative, în vederea restabilirii funcției țesutului în care se implantează prin integrarea în timp a hidrogelurilor în structura nativă confirmată și de absența răspunsului inflamator. Posibilitatea criostocării hidrogelurilor cu celule încapsulate, menținerea unui grad înalt al viabilității celulelor după dezghețare și ușurința procedurilor de înghețare/dezghețare confirmă potențialul hidrogelurilor ca sisteme "ready-to-use" în aplicații ale medicinei regenerative.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

3. Nicodemus GD, Bryant SJ. *Cell encapsulation in biodegradable hydrogels for tissue engineering applications*. Tissue Eng Part B Rev. 2008;14(2):149-65.
8. Hassan W, Dong Y, Wang W. *Encapsulation and 3D culture of human adipose-derived stem cells in an in-situ crosslinked hybrid hydrogel composed of PEG-based hyperbranched copolymer and hyaluronic acid*. Stem Cell Res Ther. 2013;4(2):32.
9. Kontturi LS, Jarvinen E, Muhonen V, Collin EC, Pandit AS, Kiviranta I. *An injectable, in situ forming type II collagen/hyaluronic acid hydrogel vehicle for chondrocyte delivery in cartilage tissue engineering*. Drug Deliv Transl Res. 2014;4(2):149-58.
11. de Vos P, Lazarjani HA, Poncelet D, Faas MM. *Polymers in cell encapsulation from an enveloped cell perspective*. Adv Drug Deliv Rev. 2014;67-68:15-34.
23. Maier V, Lefter CM, Maier SS, Butnaru M, Danu M, Ibanescu C. *Property peculiarities of the atelocollagen-hyaluronan conjugates crosslinked with a short chain dioxirane compound*. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2014;42:243-53.
44. Tingen CM, Kieseewetter SE, Jozefik J, Thomas C, Tagler D, Shea L. *A macrophage and theca cell-enriched stromal cell population influences growth and survival of immature murine follicles in vitro*. Reproduction. 2011;141(6):809-20.
45. Sittadjody S, Saul JM, Joo S, Yoo JJ, Atala A, Opara EC. *Engineered multilayer ovarian tissue that secretes sex steroids and peptide hormones in response to gonadotropins*. Biomaterials. 2013;34(10):2412-20.
60. Parenteau-Bareil R, GR, Berthod F. *Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications*. Materials. 2010;3:1863-87.
144. Kristiansen KA, Potthast A, Christensen BE. *Periodate oxidation of polysaccharides for modification of chemical and physical properties*. Carbohydr Res. 2010;345(10):1264-71.
167. Gong Y, Wang C, Lai RC, Su K, Zhang F, Wang D. *An improved injectable polysaccharide hydrogel: modified gellan gum for long-term cartilage regeneration in vitro*. J Mater Chem. 2009;19(14):1968-77.
168. Tang Y, Sun J, Fan H, Zhang X. *An improved complex gel of modified gellan gum and carboxymethyl chitosan for chondrocytes encapsulation*. Carbohydr Polym. 2012;88(1):46-53.
226. Ujihira M, Iwama A, Aoki M, Aoki K, Omaki S, Goto E. *Cryoprotective effect of low-molecular-weight hyaluronan on human dermal fibroblast monolayers*. Cryo Letters. 2010;31(2):101-11.

ACTIVITATEA ȘTIINȚIFICĂ

I. Articole trimise spre publicare în reviste cotate ISI cu factor de impact

1. „Biomacromolecular-based ionic-covalent hydrogels for cell encapsulation. The atelocollagen – oxidized polysaccharides couples”

Andreea Luca, Vasilica Maier, Stelian S. Maier, Maria Butnaru, Maricel Danu, Constanta Ibanescu, Mariana Pinteala, Marcel Popa

Material Science and Engineering, part C

2. „Versatility of atelocollagen-based hydrogels crosslinked with oxidized polysaccharides as cell encapsulation matrix for engineered bioactive stromal tissue ”

Andreea Luca, Maria Butnaru, Stelian S. Maier, Laura Knieling, Ovidiu Bredețean, Cristina Dimitriu, Marcel Popa

Macromolecular Bioscience

II. Articole publicate în reviste cotate ISI fără factor de impact

1. **Luca A**, Rachita OE, Verestiuc L, Popa M, Butnaru M. *Cell populated hydrogels based on collagen and chitosan for soft tissue regeneration*. E-Health and Bioengineering Conference (EHB); 19-21 Nov. 2015, doi: 10.1109/EHB.2015.7391522 – IEEE Xplore® data base, inclus în ISI Conference Proceedings Citation Index.

III. Participarea la manifestări științifice și conferințe internaționale

Comunicări orale

1. „Hidrogeluri bio-funcționalizate pentru regenerarea și reconstrucția țesuturilor moi”

Andreea Luca, Maria Butnaru, Stelian S. Maier, Laura Knieling, Marcel Popa

Congresul Internațional “PREGĂTIM VIITORUL PROMOVÂND EXCELENȚA”, 26 februarie – 1 martie 2015, Iași.

2. „Hidrogeluri pe bază de colagen și chitosan pentru încapsulare celulară *in situ*: studii de citocompatibilitate”

Oana Răchită, **Andreea Luca**

Conferința Națională de Bioinginerie, 14-17 mai 2015, Iași.

3. „Collagen - modified chitosan hydrogels for primary dermal fibroblast encapsulation and application in soft tissue regeneration”

O.E. Rachita , **A. Luca**, L.Verestiuc, M. Butnaru

3 rd International Conference Health Technology Management, October 6-7 2016, Chișinău.

Postere

1. „Atelocollagen-polysaccharides hydrogels for cell encapsulation”

Andreea Luca, Stelian S. Maier, Marcel Popa

6th International Conference – Biomaterials, Tissue Engineering and Medical Devices, BiomMed, 17-20 septembrie 2014, Constanța

2. „Biocompatibility of collagen-polysaccharide based hydrogels for cell encapsulation”

Alina Gabriela Rusu, **Andreea Luca**, Maria Butnaru, Stelian Sergiu Maier and Marcel Popa.

4th International Conference on Tissue Science and Regenerative Medicine, July 27-29, 2015

Roma, Italia, doi: 10.4172/2157-7552.S1.022. *Abstractul conferinței publicat în revista Journal of Tissue Science and Engineering, cotate ISI, cu factor de impact 3.11.*

3. „Bio-functionalized atelocollagen-polysaccharide hydrogels”

A. Luca, O. Rachita, L. Verestiuc, M. Butnaru

3rd International Conference on Nanotechnologies and Biomedical Engineering, September 23-26, 2015, Chișinău, Republica Moldova.

4. „Biomimetic macromolecular matrices produced by covalent inter-coupling in scleroproteinpolysaccharide mixtures, at cell tolerable conditions”

Stelian S. Maier, **Andreea Luca**, Vasilica Maier, Maria Butnaru

IUPAC 11th International Conference on Advanced Polymers via Macromolecular Engineering, 18-22 octombrie 2015, Yokohoma, Japonia.

5. „Caracterizarea unor hidrogeluri pe bază de collagen cu rol de matrice extracelulară artificială”

Andreea Butnariu (Luca), Maria Butnaru, Sergiu S. Maier, Marcel Popa

Congresul Internațional “PREGĂTIM VIITORUL PROMOVÂND EXCELENȚA”, 3-5 martie 2016, Iași.

IV. Alte colaborări științifice

1. articol în revistă cotate ISI

„Ovarian stimulation outcome in infertile women with endometriosis undergoing IVF”

Alexandru Luca, Dragos Nemescu, Maria Butnaru, **Andreea Butnariu**, Mircea Onofriescu.

Ginekol Pol 2016;87(1):37-41 (IF 0.609).

2. articol publicat în revistă cotate B+

„Time-lapse imaging and its potential to improve embryo selection in IVF”

Andreea Luca, M. Butnaru, A. Luca, A. Borș, I. Dumitrașcu, D. Nemescu, M. Onofriescu

Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat. Iași, 2015, Vol. 119, Nr. 3, pag. 749-756.

3. co-autor al cărții „Cultura de celule animale, tehnici uzuale și tehnici speciale”, autori

Maria Butnaru și **Andreea Luca**, Editura PIM, Iași 2014, ISBN 978-606-13-2199-5