

Universitatea " Babeş-Bolyai" Cluj-Napoca Facultatea de Chimie și Inginerie Chimică Catedra de Chimie-Fizică



PREPARARE ȘI PROPRIETĂȚI FIZICO-CHIMICE ALE UNOR COMPOZITE NANOSTRUCTURATE FORMATE DIN COLAGEN, CHITOSAN ȘI DIVERSE PULBERI ANORGANICE BIOACTIVE

TEZĂ DE DOCTORAT

REZUMAT

Conducător științific:

Prof.Univ.Dr. Maria Tomoaia-Cotişel

Autor:

Lăcrimioara-Bianca Pop

Cluj-Napoca

2011

CUPRINS

INTRODUCERE

PARTEA I

CAPITOLUL 1

1 1 Osul – Compozit complex	6
1 1 1 Structura și compoziția osului	6
1 1 1 1 Faza anorganică (minerală) a osului	7
1 1 1 2 Faza organică (matricea organică) a osului	8
1 1 1 3 Precursorii fazei minerale	10
1.2 Compozite si aplicatiile lor	11
1.2.1 Proprietăți ale compozitelor osoase: biocompatibile, osteoconductive,	15
osteoinductive	13
1.2.2 Hidroxiapatita și hidroxiapatita modificată	18
1.2.3 Nanostructuri ale hidroxiapatitei cu polimeri	19
1.2.3.1 Nanostructuri cu polimeri sintetici	19
1.2.3.2 Nanostructuri cu polimeri naturali	19
1.2.4 Scafolduri (grefe) pentru ingineria tesutului osos	22
1.2.4.1 Scafolduri pentru defecte de os	22
1.2.4.2 Arhitectura scafoldurilor	24

CAPITOLUL 2

2.1 Metode de preparare a fazei anorganice (pulberi anorganice bioactive)	25
2.2 Baza teoretică a formării fazei noi în procesul de obținere al nanoparticulelor	25
2.2.1 Nucleația și creșterea nucleelor	20
2.2.2 Cinetica nucleației primare.	20
2.2.2.1 Factorii care influențează nucleația	20
2.2.2.2 Cinetica creșterii nucleului. Viteza de nucleație	20
2.3 Transformările chimice și de fază din structura fosfatilor de calciu	21
2.4 Concluzij	32
	- 33

PARTEA a II-a

CONTRIBUȚII ORIGINALE

CAPITOLUL 3

PULBERE ANORGANICĂ BIOACTIVĂ (PAB)

3.1 Prepararea pulberii anorganice bioactive	35
3.1.1 Hidroxiapatită	38
3.1.2 Hidroxiapatită modificată cu siliciu	39
3.1.3 Hidroxiapatită modificată cu magneziu	41
3.1.4 Hidroxiapatită modificată cu magneziu și siliciu	42
3.1.5 Hidroxiapatită complexă, modificată cu magneziu, siliciu și zinc	
3.1.6 Hidroxiapatita complexă, dopată cu argint	42
3.1.6.1 Prepararea argintului coloidal.	42
3.1.6.2 Prepararea hidroxiapatitei complexe dopată cu argint	44
3.1.7 Hidroxiapatita complexă, dopată cu aur.	45
3.1.7.1 Prepararea aurului coloidal	45
3.1.7.2 Prepararea hidroxiapatitei complexe dopată cu aur	45
3.2 Caracterizare și proprietăți fizico-chimice ale pulberilor anorganice bioactive	46
3.2.1 Spectroscopie XPS.	47
3.2.2 Spectroscopie FTIR	52
3.2.3 Difractometrie de raze X	55
3.2.4 Analiza granulometrică	57
3.2.5 Analiza BET	59
3.2.6 Analiza termică, TG, DTG, DTA, DSC	64
3.2.7 Imagistică TEM	70
3.2.8 Imagistică SEM	72
3.2.9 Imagistică AFM	74
3.3 Concluzii.	77

CAPITOLUL 4

PREPARAREA COMPOZITELOR NANOSTRUCTURATE

4.1 Compozite formate din PAB și colagen	80
4.1.1 Mineralizarea colagenului	80
4.1.2 Prepararea compozitelor formate din PAB și colagen în mediu acid	81
4.1.3 Prepararea compozitelor formate din PAB și colagen în mediu bazic	82
4.1.4 Prepararea compozitelor formate din PAB și colagen reticulat cu GA	02
în mediu acid	82
4.1.5 Prepararea compozitelor formate din PAB și colagen reticulat cu GA	02
în mediu bazic	83
4.2 Compozite formate din PAB și chitosan.	83
4.2.1 Prepararea compozitelor formate din PAB și chitosan în mediu acid	83
4.3 Prepararea compozitelor formate din PAB, chitosan și colagen	8J 84
4.3.1 Prepararea compozitelor formate din PAB, chitosan și	04
colagen în mediu acid	85
4.4 Caracterizare și proprietăți fizico-chimice	86
4.4.1 Spectroscopie FTIR.	86
4.4.2 Difractometrie de raze X	80
4.5 Caracterizarea structurală și morfologică	80
4.5.1 Caracterizarea prin imagistică TEM	09 80
4.5.2 Caracterizarea prin imagistică SEM	07
4.5.3 Caracterizarea prin imagistică AFM	91
4.6 Prepararea filmelor compozite	100
4.6.1 Caracterizarea prin imagistică TEM	100
4.6.2 Evaluarea proprietătilor mecanice ale filmelor compozite	102
4.7 Determinarea proprietăților mecanice ale compozitelor	104
4.7.1 Rezistenta la compresie	100
4.7.2 Caracterizarea prin spectroscopie FTIR	100
4.8 Prepararea scafoldurilor din materiale compozite	100
4.9 Caracterizarea scafoldurilor	109
4.9.1. Imagistică AFM	110
4.9.2 Imagistică SEM	110
4.10 Concluzii	113
	114

CAPITOLUL 5

BIOCOMPATIBILITATEA COMPOZITELOR NANOSTRUCTURATE IN VITRO

5.1 Culturi de osteoblaste	116
5.1.1 Metodologia recoltării și izolării osteoblastelor din	110
fragmente osoase	117
5.1.2 Recoltarea, izolarea și obținerea culturii primare	11/
de osteoblaste	118
5.1.2.1 Protocolul de cultivare al osteoblastelor	120
5.1.2.2 Protocolul de înghețare al osteoblastelor	120
5.1.2.3 Protocolul de dezghețare al osteoblastelor	120
5.1.2.4 Protocolul de cultivare al osteoblastelor pe scafolduri	121
5.2 Biocompatibilitatea scafoldurilor în culturi celulare	122
5.2.1 Investigarea scafoldurilor prin microscopie optică	122
5.2.1.1 Evaluarea viabilității celulelor prin analiza MTT	130
5.2.1.2 Evaluarea fenomenului de adeziune și proliferare celulară prin metode de	150
analiză morfometrică	132
5.2.1.3 Evidențierea imunocitochimică a moleculelor implicate în adeziunea	152
celulară	134
5.2.2 Investigarea scafoldurilor prin imagistică SEM	1/1
5.2.3 Investigarea scafoldurilor prin imagistică AFM	1/18
5.3 Vizualizarea osteoblastelor prin imagistică TEM	1/0
5.4 Analiza SEM și EDX a celulei osteoblaste și a constractelor celulară	152
5.5 Analiza SEM și EDX a osului natural	152
5.6 Analiza SEM și EDX a osului natural la interfața cu proteza	155
5.7 Concluzii	154
	133

CAPITOLUL 6

6 Concluzii generale	157
CAPITOLUL 7	
7 Bibliografie	160

CAPITOLUL 8

DISEMINAREA REZULTATELOR ŞTIINȚIFICE

8.1 Lucrări stiintifice publicate	188
8.2 Participări la congrese și conferințe naționale și internaționale	189
8.3 Brevet de invenție	190

INTRODUCERE

Progresul în domeniul științei și tehnologiei materialelor compozite a modificat în mod semnificativ opțiunile medicilor în rezolvarea problemelor de implanturi [1]. Materiale compozite reunesc într-un singur produs unele componente care, de obicei, nu se asociază în mod natural. Compozitele trebuie să îndeplinească două criterii importante și anume biocompatibilitatea și biofuncționalitatea. Potrivit unui raport publicat în 1995 de către Institutul de Materiale din Londra, se estimează că pe piața mondială se alocă pentru materialele compozite în jur de 12 miliarde dolari pe an [2]. Cheltuielile sunt justificate întrucât compozitele prezintă o mare importanță pentru viața umană ele fiind vitale în multe cazuri. *De exemplu*, țesutul dur al corpului uman (sistemul osos) este esențial și dă forma corpului. Cele mai frecvente probleme cu care se confruntă țesuturile tari sunt fracturile osoase. Cercetarea și dezvoltarea de noi materiale compozite rezolvă anumite probleme referitoare la reconstrucțiile osoase și la obținerea osului artificial.

Amploarea pe care a luat-o chirurgia ortopedică reconstructivă presupune dezvoltarea unor materiale care trebuie să îndeplinească o mulțime de caracteristici dintre care cele mai importante sunt:

- biocompatibilitatea cu țesutul osos natural uman;

- osteointegrarea cât mai rapidă și fără efecte secundare (necroze, umflături);
- să acționeze după implantare ca matrițe pentru creșterea și diferențierea tisulară;
- să se resoarbă prin procese de biodegradare și remodelare osoasă.

Aceste materiale trebuie să corespundă ca structură și compoziție cu țesutul osos natural. Osul este format din 69% fosfat de calciu (în principal hidroxiapatită), 21% colagen, 9% apă și 1% alte componente și are o microstructură ierarhică complexă.

Cercetările originale din teza de doctorat sunt dedicate cercetării și dezvoltării de noi materiale compozite nanostructurate compuse în principal din pulberi anorganice bioactive bazate pe hidroxiapatită și un polimer natural, colagenul și/sau chitosanul.

Hidroxiapatita are unele proprietăți foarte bune cum ar fi bioactivitatea, biocompatibilitatea, netoxicitatea și osteoconductivitatea însă duritatea ei este scăzută. Colagenul (COL), proteina cea mai abundentă din corp, este un material biocompatibil, biodegradabil și osteoinductiv [3,4]. Chitosanul (CHI) este un polimer natural cu proprietăți remarcabile, cum ar fi biocompatibilitatea și bioresorbabilitatea. Este netoxic și ușor solubil în acizi organici slabi.

Prezenta teză de doctorat a avut ca **obiective principale** dezvoltarea unor tehnologii inovative de realizare a unor astfel de materiale compozite. Cercetările pentru îmbunătățirea caracteristicilor funcționale pe care trebuie să le îndeplinească aceste materiale compozite au fost axate pe două direcții principale, și anume:

- îmbunătățirea compoziției materialelor cu elemente care se regăsesc în osul natural: siliciul, magneziul și zincul care pe lângă rolul pozitiv pe care îl au în dezvoltarea și proliferarea celulelor osoase asigură și o morfologie și structură poroasă propice dezvoltării celulelor osoase (osteoblastelor)

- obținerea la scară nano a pulberii anorganice bioactive.

În plus, hidroxiapatita utilizată în scopuri ortopedice pentru reconstrucții osoase trebuie să aibă un înalt grad de cristalinitate. Acesta asigură o osteointregrare lipsită de fenomene secundare, cauzate de reactivitatea ridicată a materialelor cu grad scăzut de cristalinitate. Cristalinitatea se poate monitoriza în timpul tratamentului termic și astfel am studiat influența temperaturii de calcinare asupra gradului de cristalinitate a hidroxiapatitei în intervalul de temperatură de la 400° C - 1150° C. Rezultatele cele mai bune le-am obținut în cazul hidroxiapatitei calcinată în intervalul de temperatură 650° C - 800° C, cu palier de 6h.

În cadrul cercetării, am preparat prin precipitare peste 20 de sorturi de nano hidroxiapatită (HAP) pură, HAP parțial substituită cu ioni ce se regăsesc în compoziția osului natutral, și HAP dopată cu nanoparticule de aur sau argint. Diferitele sorturi de HAP au fost testate în culturi de celule osoase (osteoblaste) și am pus în evidență rolul pe care îl are suprafața specifică și porozitatea compozitelor asupra culturilor de osteoblaste. Principalii parametri de lucru studiați în procesul de precipitare au fost: - concentrația soluțiilor reactanților; temperatura din timpul precipitării reactanților; timpul și temperatura de maturare ale precipitatului; uscarea în condiții supercritice (liofilizarea).

Caracterizarea fizico-chimică a pulberilor de HAP și a nanobiostructurilor acestora cu chitosan și colagen s-a făcut prin metode de spectroscopie FTIR și XPS, difractometrie de raze X (XRD) și analize de suprafață specifică și porozitate prin metoda BET. Stabilitatea pulberilor s-a demonstrat prin analize termogravimetrice TG, DTG, DTA și DSC iar pentru determinarea structurală și morfologică a materialelor compozite am folosit tehnici de imagistică SEM, TEM și AFM.

Teza de doctorat este structurată în 8 capitole.

În *capitolele 1 și 2* sunt abordate, pe baza cercetării bibliografice, principalele aspecte teoretice referitoare la structura și compoziția osului natural, la nanostructura fazei anorganice pe bază de HAP precum și baza teoretica în procesul de formare a fazei anorganice la scară nano (*capitolul 2*).

Capitolul 3 cuprinde contribuțiile originale referitoare la prepararea hidroxiapatitei nesubstituite și a celei substituite cu diferiți ioni SiO_4^{4-} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , sau dopate cu nanoparticele de aur sau argint și caracterizarea fizico-chimică a materialelor sintetizate prin metode de spectroscopie FTIR și XPS, difractometrie de raze X și analize de suprafață specifică și porozitate prin metoda BET.

Capitolul 4 conține date referitoare la prepararea materialelor compozite formate din HAP și polimeri naturali, colagen și chitosan și caracterizarea fizico-chimică a acestora.

În *capitolul 5* sunt prezentate rezultatele privind biocompatibilitatea nanostructurilor preparate sub formă de scafolduri în culturi celulare de osteoblaste. Se evidențiază totodată proliferarea și adeziunea celulară pe scafoldurile fibroase formate din HAP/CHI/COL, precum și producerea eficientă de colagen a osteoblastelor cu formarea de os nou.

Capitolele 6, 7 și 8 sunt destinate concluziilor generale, bibliografiei și diseminării rezultatelor științifice.

CUVINTE CHEIE

Hidroxiapatită Colagen Chitosan Compozite Celule ostoblaste

CAPITOLUL 3 - CONTRIBUȚII ORIGINALE

PULBERE ANORGANICĂ BIOACTIVĂ (PAB)

3.1 Prepararea pulberii anorganice bioactive

Hidroxiapatita deși prezintă o biocompatibilitate ridicată, poate fi substanțial îmbunătățită prin modificarea compoziției chimice și a structurii morfologice. Aceste modificări sunt favorizate de capacitatea hidroxiapatitei de a accepta cu ușurință în structura sa numeroși ioni substituenți atât pentru ionii de Ca²⁺ cât și pentru cei de PO₄³⁻ odată cu compoziția chimică modificându-se și structura morfologică [223-226]. Analizele chimice și structurale au arătat că partea anorganică a osului nu corespunde formulei stoechiometrice a hidroxiapatitei. Practic partea anorganică aflată în țesuturile osoase reprezintă un amestec de compuși anorganici pe bază de hidroxiapatită în care ionii de Ca²⁺ și PO₄³⁻ sunt parțial substituiți cu diferiți alți ioni (anioni și cationi). Ionii substituenți trebuie să fie la rândul lor biocompatibili cu organismul astfel încât resorbția lor să nu provoace reacții nedorite și fenomene de respingere. Mai mult, prezența unor ioni străini în structura hidroxiapatitei conferă acesteia o abilitate sporită la stimularea și creșterea țesutului osos. Pe lângă condițiile amintite pe care trebuie să le îndeplinească ionii substituenți, aceștia trebuie să prezinte în plus și o bună biocompatibilitate cu o serie de polimeri naturali (chitosanul, colagenul) sau sintetici (acidul poliacrilic, polimetacrilatul de metil, etc.) [229].

Deși prezența ionilor substituenți în structura hidroxiapatitei este în proporție mică, ei conferă acesteia proprietăți biologice și fizice specifice, astfel că rolul lor este important și determinant în chimia osului. Din cele prezentate rezultă că prezența ionilor substituenți în structura hidroxiapatitei este obligatorie pentru ca biocompozitele în compoziția cărora aceasta intră să aibă biostructura și biochimia osului natural. Totodată, prin intermediul lor se asigură o viteză mai mare de regenerare a țesutului osos și parametri fizico-chimici cât mai apropiați comparativ de cei din osul natural. Cei mai importanți ioni substituenți ai hidroxiapatitei din materialele cu aplicații biomedicale sunt cei de Mg^{2+} și de Zn^{2+} pentru ionii de Ca^{2+} precum și cei de CO_3^{2-} și SiO₄⁴⁻ pentru ionii de PO₄³⁻. În ceea ce privește ionii de Mg^{2+} , aceștia joacă un rol important prin natura transformărilor pe care le produc în matricea osoasă. Lipsa magneziului în os afectează în mod negativ procesele fiziologice din metabolismul osos ducând astfel la o fragilitate ridicată a oaselor [234-236].

Hidroxiapatita sintetică substituită cu magneziu fiind mai solubilă decât hidroxiapatita pură, face ca resorbția ei în organism să fie mult mai rapidă, accelerându-se astfel procesul de regenerare a osului natural. Există însa o limită al raportului în care magneziul poate fi încorporat, întrucât un raport molar Mg^{2+}/Ca^{2+} mai mare decât 0,3 determină formarea fosfatului tricalcic și a celui de magneziu $Mg_3(PO_4)_2$ în defavoarea magneziu - hidroxiapatitei (MgHAP). Alături de magneziu, un alt element esențial cu efect stimulator asupra formării țesutului osos

este *zincul* care se regăsește în os în proporție de 0,012% - 0,0225 %. Prezența zincului contribuie pe de altă parte și la creșterea conținutului de proteină osoasă (colagen) pentru că intensifică activitatea fosfatazei alcaline și inhibă procesul de resorbție a părții amorfe din hidroxiapatită evitându-se astfel inflamațiile locale de la nivelul oaselor [234]. Mai mult, prezența ionilor de Zn^{2+} în soluții în timpul precipitării inhibă procesul de creștere al particulelor de HAP ceea ce facilitează obținerea de biocompozite la scară nano [236].

Siliciul prezent în hidroxiapatită sub forma ionilor de SiO₄⁴⁻ joacă un rol esențial în procesele biologice determinând structura chimică a osului. Substituirea ionilor de PO₄³⁻ din hidroxiapatită cu ionii de SiO₄⁴⁻ crește activitatea celulelor ostoblaste în raport cu hidroxiapatita pură. Această creștere a activității osteoblastelor conduce la o remodelare mai rapidă a țesutului osos, reducându-se astfel timpul de regenerare al acestuia. Prezența siliciului în hidroxiapatită intensifică și alte fenomene biologice cum sunt adeziunea celulară și dezvoltarea mai rapidă a matricei organice (a colagenului) din țesutul osos [225]. Cu toate că există mai multe procedee de sinteză a hidroxiapatitei, încă nu s-a reușit fabricarea unui produs care să îndeplinească la un nivel satisfăcător toate condițiile de calitate care se impun biocompozitelor utilizate în implanturi și reconstrucții osoase: scara nano a particulelor, cristalinitate ridicată, bună biocompatibilitate cu țesutul osos natural și viteză mare de resorbție. Procedeele existente de fabricare nu elimină apariția fazelor secundare formate din α și β fosfat tricalcic Ca₃(PO₄)₂ și a silicocarnotitului (Ca₁₀(PO₄)₄(SiO₄)₂), faze ce afectează negativ proprietățile biologice [228, 231].

Gradul de cristalinitate pe care trebuie să-l atingă structura hidroxiapatitei se realizează practic prin calcinarea la temperaturi cuprinse între 600°C și 1300° C, condiții în care are loc sinterizarea materialului, fenomen nedorit, deoarece conduce la creșterea dimensiunii particulelor, chiar dacă acestea au fost obținute în prima etapă la scară nano. În timpul tratamentelor termice aplicate, datorită fenomenului de sinterizare, particulele trec din domeniul nano în cel micro. Este cunoscut faptul că particulele la scară nano și cristalinitatea ridicată a acestora influențează în mod pozitiv creșterea și dezvoltarea celulelor osoase (osteoblastelor) prin intermediul cărora se reface țesutul osos natural.

Cercetările proprii efectuate au avut ca obiectiv prepararea unei bioceramici pe bază de HAP cu o bună biocompatibilitate și bioactivitate, cu viteză mare de resorbție și fără efecte secundare. Așa după cum am arătat, diferiți autori au evidențiat în lucrările lor efectul pozitiv pe care îl au o serie de ioni substituenți Mg^{2+} , Zn^{2+} , CO_3^{2-} și SiO_4^{4-} introduși în structura ceramicilor. Însă, în literatura de specialitate nu sunt semnalate compoziții ale ceramicilor pe bază de HAP cu structură complexă, în care să fie introduși simultan toți acești ioni în structura HAP.

Principalele căi de sinteză ale hidroxiapatitei sunt: metoda sol-gel, aerogel, reacția în fază solidă, metoda hidrotermală și precipitarea [19]. Dintre acestea, metoda precipitării pare a fi de cea mai mare perspectivă, întrucât utilizează reactivi ieftini, ușor accesibili: o sare solubilă de calciu (azotat sau acetat) Ca(NO₃)₂·H₂O sau Ca(CH₃COO)₂·yH₂O; un fosfat solubil de sodiu, potasiu, de preferință amoniu (NH₄)₂ HPO₄ și soluție de amoniac pentru corectarea pH-lui în limitele dorite. Metoda de preparare prin precipitare necesită instalații simple, flux tehnologic

ușor de controlat ceea ce permite obținerea de materiale cu proprietăți superioare și ușor reproductibile. Pentru realizarea sintezelor am folosit o instalație proprie de preparare a hidroxiapatitei prezentată în figura 3.1. Materiile prime folosite sunt prezentate în tabelul 3.1



Figura 3.1 Instalația de preparare a hidroxiapatitei

Tabel 3.1 Materiile	prime folosite îi	1 prepararea	pulberilor de	e hidroxiapatită și a	biocompozitelor:
	Prime 10100100	propulsion ou	pare erner ae	, mai o map avita și a	010000000000000000000000000000000000000

Compusul chimic	Formula chimică	Producătorul
Azotat de calciu	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	
Fosfat acid diamoniacal	(NH ₄) ₂ HPO ₄	
Amoniac	NH ₃	
Nonilfenol	C ₁₅ H ₂₄ O	
Acid acetic glacial	CH ₃ COOH	
Azotat de magneziu	$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	Merck
Ortosilicat de tetraetil (TEOS)	SiC ₈ H ₂₀ O	Germany
Alcool etilic absolut	CH ₃ -CH ₂ OH	
Azotat de zinc	$Zn(NO_3)_2$	
Azotat de argint	AgNO ₃	
Acid tetracloroauric (III) 99.5%	$HAuCl_4 \cdot 4H_2O$	
Colagen tip I (bovin-tendonul lui Achile)		
Chitosan (masa moleculara medie)		Sigma- Aldrich
Glutaraldehida (GA) 25% în H ₂ O	CH ₂ (CH ₂ CHO) ₂	USA
Silicat de sodiu	Na ₂ SiO ₃	Preparat în laborator

3.1.1 Hidroxiapatita

Pulberea de nanohidroxiapatită a fost preparată prin metoda precipitării. S-a preparat o soluție A cu concentrația 0,15 M, obținută prin dizolvarea azotatului de calciu în apă deionizată. Acesteia i s-a adăugat 0,5 ppm nonilfenol în calitate de surfactant. pH-ul soluției A a fost de 6,3. Soluția B cu concentrația 0,09 M s-a obținut prin dizolvarea fosfatului diamoniacal în apă deionizată și adăugarea a 0,5 ppm nonilfenol ca surfactant. pH-ul soluției B a fost ajustat în intervalul 9,5-12 prin adăugarea soluției de amoniac 25%. Soluția A s-a adăugat rapid (2-3 secunde) peste soluția B sub agitare intensă (800 rot/min).

Temperatura celor două soluții în timpul precipitării a fost de 60°C. După precipitare, suspensia obținută a fost supusă unui tratament hidrotermal (maturare) timp de 24 de ore la temperatura de 70°C. Precipitatul obținut a fost filtrat, spălat cu apă deionizată și uscat în condiții supercritice (liofilizare) temperatura de -80°C și presiunea de $5x10^{-3}$ torri. Pentru aceasta s-a folosit un liofilizator de tip ALPHA 1-2 LD_{plus}, CHRIST. Pulberea obținută a fost supusă tratamentului termic într-un interval de temperatură de 400°C - 850°C cu palier de 6 ore.

Aglomerarea particulelor s-a evitat în timpul precipitării prin adaugarea surfactantului (nonilfenol) și uscarea în condiții supercritice a pulberii. Mărimea finală a nanoparticulelor poate fi determinată de raportul dintre viteza celor două procese elementare: nucleația și creșterea cristalelor care sunt controlate prin nivelul suprasaturației și adaosului de substanțe tensioactive care se adsorb la suprafața particulelor.

Creșterea controlată a cristalelor și evitarea aglomerării particulelor s-a realizat prin adaosul de substanțe superficial active (*nonilfenol, amidon, glucoză, lactoza și proteinele din zerul de lapte*) folosite ca surfactanți în alte sinteze care nu sunt prezentate în această lucrare. În final ne-am oprit la nonilfenol ca surfactant folosit în continuare.

Cercetările întreprinse au fost orientate în direcția stabilirii modului în care cele două procese importante sunt influențate de prezența și natura surfactanților adăugați [246]. Astfel am elaborat un procedeu de preparare al nanoparticulelor de fosfați de calciu (HAP), a cărui schemă este prezentată în figura 3.3.



Figura 3.3 Schema de preparare și caracterizarea hidroxiapatitei prin procesul de precipitare.

3.1.2 Hidroxiapatită modificată cu siliciu

Hidroxiapatita poate fi multisubstituită cu specii de ioni compatibili, ce pot fi folosiți pentru prepararea osului artificial și în reconstrucția țesuturilor osoase. Ionilor substituenți prezenți într-o cantitate mică în hidroxiapatită le pot fi atribuite anumite proprietăți biologice și fizice specifice și joacă un rol important în biochimia osului și a dinților. Siliciul este unul dintre elementele esențiale prezente în procesele biologice. Importanța acestuia în formarea osului a fost dovedită științific. Substituirea ionilor de fosfat cu ionii de silicat în structura hidroxiapatitei crește activitatea celulelor osoase în raport cu hidroxiapatita fiziologică. Rezultă astfel o remodelare rapidă a țesutului osos ce a fost observată la suprafața implanturilor de hidroxiapatită substituită cu ioni de silicat (Si-HAP). Procentul de siliciu prezent în hidroxiapatita biologică

variază între limitele 0,2% și 0,8% [226]. Prezența siliciului în HAP favorizează adeziunea celulară și dezvoltarea părții organice din os, a colagenului. Procentul molar al ionilor de silicat în raport cu ionii de fosfst din hidroxiapatită este de preferat a fi cuprins între 0,1% până la 2,5%. Literatura de specialitate indică faptul că o proprietate determinantă a biocompozitelor este, alături de cristalinitate, porozitatea și suprafața specifică [225]. Hidroxiapatite cu porozitate și suprafață specifică controlate se pot obține dacă în structura acestora se introduc ioni de SiO₄⁴⁻ sub diferite forme de exemplu sub formă de TEOS sau Na₂SiO₃. Acești ioni prin procesul de policondensare crează grupări siloxan –Si-O-Si- și silanol Si-OH (figura 3.4) care depind de raportul HAP : SiO₂, temperatură, condiții hidrodinamice și viteza de adăugare a componenților reactanți.



Figura 3.4 Structuri macromoleculare și tridimensionale ale SiO₂ hidratat.

În acest scop, în sintezele ce urmează a fi prezentate, parametrul modificat în structura HAP a fost concentrația finală a SiO_2 în structura hidroxiapatitei. Pe lângă faptul că prin policondensare, SiO_2 crează o structură poroasă, adsorbția sa la suprafața particulelor de fosfați de calciu împiedică creșterea cristalitelor, având astfel și rol de inhibitor al creșterii acestora [225, 226]. Din acest punct de vedere, siliciul se comportă ca o impuritate adsorbită pe suprafată, adsorbția lui blocând creșterea cristalitelor. Un alt parametru care joacă un rol esențial în procesul de cristalizare este temperatura. Procesul de cristalizare este un proces deosebit de complex fiind rezultatul raportului în care se găsesc cele două procese elementare: nucleația (formarea germenilor) și procesul de creștere a germenilor. Ambele procese elementare sunt puternic influențate de temperatură.

Pentru controlul mărimii finale a particulelor, în toate sintezele, procesul de precipitare a fost condus la temperatura de 60°C. La această temperatură crește în mod semnificativ și viteza de transformare a β -witchlonit-ului (compusul care se formează în prima fază a precipitării) în structura hidroxiapatitei. Blocarea fenomenului de aglomerare și de creștere a particulelor de hidroxiapatită s-a realizat și prin adăugare de surfactant, nonilfenol, care odată adsorbit la suprafața particulelor împiedică creșterea lor.

Pulberea de nanohidroxiapatită substituită cu 1%, 5% și 10% siliciu (SiO₂) a fost preparată prin metoda precipitării în mod asemănător ca și sinteza hidroxiapatitei pure cu diferența că

aportul de SiO₂ s-a făcut prin adăugarea silicatului de sodiu soluție 5% (în raportul Na₂O : SiO₂ = 1:3,2) în soluția de fosfat diamoniacal. În figura 3.5 este prezentată funcționalizarea nanoparticulei de HAP cu SiO₂.



Figura 3.5 Funcționalizarea nanoparticulei de HAP cu SiO₂.

3.1.3 Hidroxiapatită modificată cu magneziu

Prezența ionilor substituenți în structura hidroxiapatitei este esențială pentru ca biocompozitele în compoziția cărora aceștia intră să conducă la o biostructură și biochimie asemănătoare cu cea osului natural. Totodată, prin intermediul lor se asigură o viteză mai mare de regenerare a țesutului osos. Cei mai importanți ioni substituenți sunt cei de Mg^{2+} , Zn^{2+} , CO_3^{2-} și SiO_4^{4-} [247]. În acest scop, am preparat diferite sorturi de hidroxiapatită cu structură complexă, substituită cu magneziu, siliciu și zinc ce sunt redate în tabelul 3.3. Prepararea acestui sort de hidroxiapatită cu structură complexă s-a realizat în mod similar ca și sinteza hidroxiapatitei pure, cu deosebirea că ionii de Mg^{2+} se introduc în soluția cu ionii de Ca^{2+} . Tabel 3.3 Compoziția chimică a probelor de hidroxiapatită complexă.

Nr. crt.	Compoziția hidroxiapatitei complexe (%)	Temperatura de calcinare °C
1	HAP_0,2%Mg	450, 650, 850
2	HAP_1%SiO ₂	450, 650, 850
3	HAP_0,4%SiO ₂ _0,2%Mg	450, 650, 850
4	HAP_0,2%SiO ₂ _1,5%Mg	450, 650, 850
5	HAP_1%SiO ₂ _1,5%Mg	450, 650, 850
6	HAP_0,2%SiO ₂ _0,6%Mg_0,2%Zn	450, 650, 850
7	HAP_0,2%Mg_0,6%Si_0,2%Zn+0,14% Ag	450, 650, 850
8	HAP_0,2%Mg_0,6%Si_0,2%Zn+0,3% Au	450, 650, 850

3.1.4 Hidroxiapatită modificată cu magneziu și siliciu

Prepararea acestor probe cu structură complexă s-a realizat în mod similar ca și sinteza hidroxiapatitei pure, cu deosebirea că ionii de Mg^{2+} se introduc în soluția cu ionii de Ca^{2+} iar ionii de SiO_4^{4-} se introduc sub forma de TEOS în soluția cu ionii de fosfat după ce pH-ul acesteia s-a ajustat în intervalul 11,5-12 cu soluție de amoniac 25%, cu câteva minute înainte ca cele două soluții să fie amestecate. Pentru evitarea reacției de precipitare a SiO₂ când acesta se introduce sub formă de TEOS, se face diluarea în prealabil a TEOS-ului în soluție de 5% alcool etilic, apoi se diluează soluția la 0,5 % cu apă ultrapură. Concentrația substituenților în structura HAP a fost de 0,2% SiO₂, 0,6% Mg și 0,2%Zn.

3.1.5 Hidroxiapatită modificată cu magneziu, siliciu și zinc

Prepararea acestor probe cu structură complexă s-a realizat în mod similar ca și sinteza hidroxiapatitei pure, cu deosebirea că ionii de Mg^{2+} împreună cu ionii de Zn^{2+} se introduc în soluția cu ionii de Ca^{2+} iar ionii de SiO_4^{4+} se introduc sub forma de TEOS în soluția cu ionii de fosfat după ce pH-ul acesteia s-a ajustat în intervalul 11,5-12 cu soluție de amoniac 25%, cu câteva minute înainte ca cele două soluții să fie amestecate. Pentru evitarea reacției de precipitare a SiO₂ când acesta se introduce sub formă de TEOS, se face diluarea în prealabil a TEOS-ului în soluție de 5% alcool etilic, apoi se diluează soluția la 0,5 % cu apă ultrapură. Concentrația substituenților în structura HAP a fost de 0,2% SiO₂, 0,6% Mg și 0,2% Zn.

3.1.6 Hidroxiapatita complexă, dopată cu argint

Argintul – rol și efecte biologice

Unul dintre cele mai remarcabile aspecte referitoare la argintul coloidal este faptul că are un spectru extrem de larg de aplicații și întrebuințări biomedicale. În timp ce un antibiotic farmaceutic convențional este eficient împotriva a șase sau șapte tipuri de germeni și total ineficient contra virusurilor, generând cel mai adesea efecte secundare nedorite, argintul este letal pentru mai mult de 650 de tipuri de bacterii, virusuri și fungi, fără însă a fi toxic pentru organismul uman. Spre deosebire de medicamentele de sinteză ce reacționează chimic cu anumite enzime, acțiunea biologică a argintului este de tip catalitic, dezactivând mecanismele enzimatice de oxigenare celulară ale microorganismelor. Prezența sa "sufocă" virușii, bacteriile și fungii fără a face niciun rău organismelor multicelulare, care au un sistem enzimatic cu totul diferit.Testele de laborator au arătat că argintul coloidal (5-10ppm) omoară majoritatea bacteriilor, fungilor și virusurilor în 2-6 minute de la contact. Particulele care generează coloizi se situează în gama de mărime 0.001 µm până la 100 µm. Acțiunea ionilor de argint nu se limitează numai la bacterii, medicamentele care conțin argint pot distruge sute de viruși, fungi și protozoare. În ultimul timp nanotehnologiile au relevat

capacitatea ionilor de argint de a lupta cu cancerul. Astfel, s-a demonstrat că soluțiile de argint coloidal sunt capabile să inhibe aderenta și mobilitatea celulelor tumorale [204-210]. S-a constatat că aceste particule cu dimensiuni cuprinse între 2 și 10 nm au capacitatea de a adsorbi și distruge bacteriile care afectează in situ tesuturile umane și îmbunătătesc mecanismele imune și pe cele de reparație tisulară [211-216]. Experimentele științifice au arătat că argintul coloidal este eficient și activ în tratarea multor afecțiuni importante: infecții microbiene, fungice, parazitare și virale ale pielii, organelor senzoriale, ale tracturilor digestiv, respirator și urinar. boli autoimune chiar si cancer. Procesul de reconstructie a tesuturilor sau de vindecare a plăgilor se accelerează în prezența argintului. În plus, prezența argintului coloidal a permis vindecări ale unor răni grave fără să lase cicatrice sau cu cicatrice mult mai mici decât în mod obisnuit. Cicatricele se dezvoltă atunci când celulele nediferențiate nu există în număr suficient de mare. Pe baza acestor dovezi se presupune că argintul coloidal ar reduce sau elimina cicatricele interne și ar accelera vindecarea după operatiile chirurgicale. Rezultate deosebite s-au obtinut în refacerea rapidă după fracturi, rupturi musculare sau ligamentare, entorse, luxatii, arsuri, ulceratii cutanate etc.



Figura 3.6 Mecanismul de acțiune al argintului

Biofuncționalitatea și acțiunea catalitică a argintului se atribuie faptului că se poate adsorbi pe suprafața unor proteine implicate în procvesele biologice, mărindu-le astfel reactivitatea (figura 3.6)

3.1.6.2 Prepararea hidroxiapatitei complexe dopată cu argint

Prepararea acestui material s-a realizat în mod similar cu sinteza hidroxiapatitei cu structură complexă (magneziu, siliciu, zinc). Suspensia de HAP complex obținută se filtrează, se spală și precipitatul se redispersează într-o soluție apoasă pentru a obține o suspensie foarte diluată de HAP complex. În suspensie se adaugă soluție de azotat de argint de concentrație 0.001 M. Suspensiei finale obținute i se adaugă borohidrură de sodiu pentru reducerea argintului din sistem. Maturarea suspensiei finale (HAP+Ag) se face pe baie de apă la temperatura de 70°C timp de 24h. După maturare, suspensia se filtrează, se spală și se liofilizează. Pulberea obținută se calcinează la temperatura de 650°C cu palier de 6 ore după care se mojarează la moara cu bile

de aluminiu timp de 4 ore pentru a obține o pulbere omogenă cu dimensiuni aflate în domeniul nanometric. S-a obținut o pulbere de culoare albă cu compoziția chimică $HAP_{0,2\%}Mg_{0,6\%}Si_{0,2\%}Zn + 0,14\%$ Ag.

3.1.7 Hidroxiapatita complexă, dopată cu aur

3.1.7.2 Prepararea hidroxiapatitei complexe dopată cu aur

Prepararea acestui material s-a realizat în mod similar cu sinteza hidroxiapatitei cu structură complexă (magneziu, siliciu, zinc). Suspensia de hidroxiapatită obținută se filtrează, se spală și precipitatul se redispersează într-o soluție apoasă astfel încât obținem o suspensie foarte diluată de HAP complex. Acestei suspensii i se adaugă soluție de 1% acid tetracloroauric trihidrat diluată în prealabil în soluție apoasă astfel încât concentrația să fie în final de 10⁻³ M. Se introduce în suspensia obținută borohidrură de sodiu pentru reducerea aurului din sistem. Maturarea suspensiei finale (HAP+Au) se face pe baie de apă la temperatura de 70°C timp de 24h. După maturare, suspensia se filtrează, se spală și se liofilizează. Pulberea obținută se calcinează la temperatura de 650°C cu palier de 6 ore după care se mojarează la moara cu bile de aluminiu timp de 4 ore pentru a obtine o pulbere omogenă și cu dimensiuni aflate în domeniul nanometric. S-a obtinut pulbere de culoare compozitia 0 roz cu (HAP_0,2%Mg_0,6%Si_0,2%Zn+0,3% Au).

Schema de preparare a hidroxiapatitei cu nanoparticule de aur este prezentată în figura 3.7.



Figura 3.7 Schema de preparare a hidroxiapatitei dopată cu nanoparticule de aur.

3.2 CARACTERIZARE ȘI PROPRIETĂȚI FIZICO-CHIMICE ALE PULBERILOR ANORGANICE BIOACTIVE

În vederea corelării activității biologice în culturile de celule osteoblaste cu structura fizicochimică a fazelor minerale, am făcut o caracterizare ce a presupus măsurători de porozitate (BET), difractometrie de raze X, FTIR, XPS, SEM, TEM, AFM și TG, DTA, DSC.

3.2.1 Spectroscopie XPS

Această metoadă, cunoscută și sub denumirea de spectroscopie electronică pentru analiză chimică (ESCA), este utilizată pentru analiza compoziției chimice a suprafețelor. Aceasta este o metodă de analiză ce permite identificarea tuturor elementelor chimice, în afară de H și He (care nu au nivele electronice interioare). S-au realizat spectre survey (ex. figura 3.9) pentru probele HAP_MgSiZn; HAP_MgSiZn+Ag; HAP_MgSiZn+Au; HAP_MgSiZn+CHI/SiO₂+COL/SiO₂. Pe baza spectrelor survey s-a întocmit un tabel (tabelul 3.4) ce conține concentrația relativă a principalelor elemente din probele studiate.



Figura 3.9 Spectre XPS survey ale probelor: (a) HAP_MgSiZn; (b) HAP_MgSiZn+Ag; (c) HAP_MgSiZn+Au; (d) HAP_MgSiZn+CHI/SiO₂+COL/SiO₂.

		Compoziția elementală (at %)									
Proba de hidroxiapatită	Ca	0	С	Р	Mg	Zn	Ν	Na	Si	Ag	Au
HAP_0.67%Mg_0.28%Si_ 0.2%Zn	23.2	53.7	1.1	21.2	0.6	0.2	-	-	-	-	-
HAP_0.67%Mg_0.28%Si_ 0.2%Zn+0.14%Ag	23.1	55.2	1.2	20.1	0.2	0.1	-	-	-	0.1	-
HAP_0.67% Mg_0.28% Si_ 0.2% Zn+0.3% Au	23.6	54.3	1.1	20.1	0.4	0.2	-	-	-	-	0.3
HAP_0.67%Mg_0.28%Si_ 0.2%Zn+CHI/SiO ₂ +COL/SiO ₂	15.9	41.4	24.1	13.3	0.5	0.1	1.5	1.7	1.5	-	-

Tabel 3.4 Concentrația relativă a principalelor elemente determinate din spectrele survey.

Spectrele survey prezintă fotopicuri corespunzătoare elementelor ce intră în compoziția sistemelor. Astfel fotopicuri corespunzătoare Ca 2p, O 1s, P 2p, C 1s, Zn 2p au fost identificate pentru toate probele investigate, excepție făcând fotopicurile N 1s și Na 1s din proba (d) HAP_MgSiZn+CHI/SiO₂+COL/SiO₂ datorate prezenței colagenului și chitosanului din structura probei. Fotopicul Na 1s este datorat funcționalizării colagenului și chitosanului cu silicat de sodiu. Conform tabelului se mai poate observa că pentru proba funcționalizată cu COL detecția elementelor de bază din probe a fost mai puțin evidentă datorită stratului de proteină format la suprafața particulelor. Totodată se poate observa faptul că fotopicul C 1s este în cantitate mult mai ridicată în proba cu COL și CHI tocmai datorită prezenței acestora în sistem. Fotopicul N 1s înregistrat în apropiere de 400 eV este tipic pentru azotul din matricile organice.



a



Figura 3.10 Spectre de înaltă rezoluție pentru fotopicurile: (a) Ca 2p; (b) P 2p; (c) O 1s; (d) C 1s; (e) Zn 2p; (f) Mg 2p.

Din spectrele XPS de înaltă rezoluție (Fig. 3.10) se poate observa o deplasare ușoară a semnalului dat de fotoelectronii O 1s, de la energia de legatură 531,6 eV (proba HAP_MgSiZn) la 531,1 eV (proba HAP_MgSiZn +0.14% Ag), respectiv 531,2 eV (probele HAP_MgSiZn + 0,3% Au și HAP_MgSiZn+CHI/SiO₂+COL/SiO₂) (figura 3.10 c). Scăderea energiei de legătură indică o densitate de electroni mult mai mare pe atomii de oxigen decât pe cationii de care se leagă în unități structurale. Spectrele de înaltă rezoluție (figura 3.10 a, b și c) pentru fotopicurile Ca 2p, P 2p și O 1s prezintă o deplasare ușoară a semnalului în proba cu conținut de aur

(HAP_MgSiZn + 0.3% Au). Această deplasare este datorată densității mari de electroni la suprafața nanoparticulelor de aur care prin efectul inductiv determină interacțiuni cu Ca^{2+} , P^{5+} și O^{2-} din structura hidroxiapatitei.

3.2.2 Spectroscopie FTIR

Am folosit spectroscopia FTIR pentru a determina picurile caracteristice pentru hidroxiapatită și interacțiunile ce au loc între compușii existenți în structura acesteia [233]. În figura 3.11 a-h sunt prezentate spectrele FTIR ale probelor de HAP înainte și după tratament termic la 650C°, HAP cu 1%, 5%,10% SiO₂, HAP_MgSiZn, HAP_MgSiZn+Au și HAP_MgSiZn+Ag după tratament termic la 650°C.





Figura 3.11 a-h. Spectre FTIR ale HAP înainte şi după tratament termic la 650C°, HAP cu 1%, 5%, 10% SiO₂, HAP_MgSiZn, HAP_MgSiZn+Au şi HAP_MgSiZn+Ag după tratament termic la 650C° pentru domeniile spectrale 4000-2500 cm⁻¹ şi 1800-400 cm⁻¹.

Figura 3.11 a, c și g prezintă benzile specifice pentru punțile de hidrogen din gruparea OH..O la 3426 cm⁻¹ – 3438 cm⁻¹ în toate probele de HAP studiate. În zona 3566 cm⁻¹ apar grupările OH libere de pe suprafața particulelor pentru toate probele de HAP. Figura 3.11 b indică existența grupării NO₃⁻ la 1380 cm⁻¹ în probele de HAP netratat termic în care, prezența impurităților este mai accentuată decât în proba de HAP tratat la 650°C. Astfel rezultă că aplicarea tratamentului termic duce la scăderea impurităților din probă. La 1463 cm⁻¹ apar benzi specifice pentru CO₃²⁻ atribuite faptului că fosfații în general absorb CO₂ din aerul atmosferic. Benzile de la 1090 cm⁻¹, 1030 cm⁻¹ și 960 cm⁻¹ corespund vibrațiilor PO₄³⁻. Spectrul FT-IR pentru figura 3.11 d prezintă două benzi caracteristice: una la 980 cm⁻¹ atribuită vibrației Si-OH din gruparile de silanol și banda de la 1100 cm⁻¹ care corespunde vibrației –Si-O-Si- din legătura

siloxan. Prezența lor se datorează introducerii în sistem a ionilor silicat, care intră în structura hidroxiapatitei și formează legături silanolice și siloxanice.

3.2.3 Difractometrie de raze X

Prin difractometria de raze X se poate determina gradul de cristalinitate al pulberilor și mărimea cristalitelor din structura particulelor [233]. În figura 3.12 a-c sunt prezentate difractogramele probelor de HAP, HAP_MgSiZn, HAP + 5% SiO₂, HAP + 10% SiO₂, HAP_MgSiZn+Ag și HAP_MgSiZn+Au. Toate probele au fost calcinate la temperatura de 650°C cu palier de 6 ore.



Figura 3.12 Difractograma probelor HAP şi HAP_MgSiZn (a); Difractograma probei HAP_MgSiZn+Ag (b); Difractograma probelor HAP, HAP + 5% SiO₂ şi HAP + 10% SiO₂ (c).

Din difractograma figurii 3.12 (a) și (c) se poate observa că nu există diferențe de structură între proba de HAP pur și proba de HAP_MgSiZn deci, introducerea de ioni substituenți în sistemul hidroxiapatitei nu produce schimbări în structura acesteia. În mod similar putem spune și despre probele din difractograma figurii 3.12 (b) că ionii de SiO_4^{4-} introduși în sistemul HAP în diferite proporții nu influențează și nu schimbă structura acesteia. Picurile corespunzătoare ionilor de Mg²⁺, SiO₄⁴⁻ și Zn²⁺ datorită concentrației scăzute în care aceștia au fost introduși în structura hidroxiapatitei nu sunt evidențiate în aceste difractograme.

3.2.5 Analiza BET

Pentru a evidenția modul în care porozitatea și suprafața specifică influențează comportamentul în culturile de celule osteoblaste, am efectuat o analiză B.E.T a probelor, după ce au fost calcinate în prealabil la temperaturi diferite. Rezultatele pentru probele preparate în diferite condiții de lucru sunt prezentate în tabelul 3.6.

Nr. crt	Proba de hidroxiapatită	Suprafața specifică (m ² g ⁻¹)	Porozitatea (cm ³ /g)	Tempera- tura de calcinare °C
1	HAP standard Aldrich	67.81	0.14	-
2	HAP	61.22	0.15	-
3	НАР	44.83	0.05	400
4	НАР	25.11	0.05	650
5	НАР	19.23	0.05	950
6	$HAP + 1\% SiO_2$	69.22	0.15	400
7	$HAP + 1\% SiO_2$	59.12	0.12	650
8	$HAP + 1\% SiO_2$	38.12	0.10	950
9	$HAP + 5\% SiO_2$	96.14	0.21	400
10	$HAP + 5\% SiO_2$	76.12	0.21	650
11	$HAP + 5\% SiO_2$	50.25	0.06	950
12	$HAP + 10\% SiO_2$	112.78	0.20	400
13	HAP + 10% SiO ₂	92.13	0.13	650
14	HAP + 10% SiO_2	77.56	0.08	950
15	HAP_0,28%SiO ₂ _0,67%Mg_0,2%Zn	104.51	0.19	400
16	HAP_0,28%SiO ₂ _0,67%Mg_0,2%Zn	54.18	0.07	650
17	HAP_0,28%SiO ₂ _0,67%Mg_0,2%Zn+ 0.14%Ag	110.78	0.35	650
18	HAP_0,28%SiO ₂ _0,67%Mg_0,2%Zn + 0.3%Au	131.64	0.46	650

Tabel 3.6 Analiza B.E.T a probelor de HAP cu diferite compoziții și concentrații calcinate la diferite intervale de temperatură:

Analiza datelor din tabelul 3.6 arată că atât ionii substituenți cât și temperatura de calcinare influențează puternic suprafața specifică și porozitatea probelor. Diferențele cele mai mari comparativ cu HAP pur se constată a fi la probele care conțin în structură SiO₂. Cu cât conținutul de SiO₂ este mai ridicat cu atât porozitatea și suprafața specifică sunt mai mari. Temperatura de calcinare influențează puternic suprafața specifică, în sensul că aceasta scade odată cu creșterea temperaturii. Influența temperaturii se manifestă cel mai puternic la probele cu conținut ridicat de SiO₂. Comparând HAP pur cu probele parțial substituite cu ioni, se constată diferențe ale suprafeței specifice care depășesc 100%. Datele tabelului relevă faptul că porozitatea și raza medie a porilor sunt și ele puternic influențate de conținutul de SiO₂ și mai ales de temperatura de calcinare. Odată cu creșterea temperaturii de calcinare, crește raza porilor întrucât la temperaturi ridicate are loc spargerea microporilor din structură.

3.2.6 Analiza termică, TG, DTG, DTA, DSC

Unele rezultate obtinute sunt prezentate în figura 3.17. Din analizele TG-DTA rezultă că, odată cu cresterea temperaturii cresc pierderile de masă datorită pierderii apei și descompunerii carbonatilor de calciu și magneziu, cu formarea oxizilor corespunzători care conferă caracter bazic suspensiilor apoase ale bioceramicilor de hidroxiapatită. Analiza diagramelor din figura 3.17 a-b indică complexitatea și numărul mare de compuși și faze care se formează. Astfel în intervalul de temperatură 20°C-300 °C se înregistrează pentru HAP pur o pierdere totală de 7,17 % din care 3,83 % corespund apei legate fizic, în timp ce diferența de 3,34 % reprezintă apa din fosfații de calciu hidratați. În intervalul de temperatură 300°C-600°C pierderile de masă sunt doar de 0,43 % și sunt atribuite descompunerii unor hidrați mai stabili termic ai fosfatului de calciu. Pierderi semnificative de 3 % se înregistrează în intervalul de temperatură 600°C-820°C cu două maxime pe curba DTG corespunzătoare descompunerii carbonatului de magneziu respectiv de calciu la 800°C. Curba DTA în intervalul de temperatură 600°C-800°C prezintă două maxime ce corespund unor procese exoterme. În intervalul de temperatură 810°C-1200°C pierderile de masă fiind doar de 0,32 % corespund ruperii unor grupări OH de la suprafată cu eliminar de apă. Curba DTA și DSC mai arată si un proces puternic endoterm care se desfășoară cu viteză maximă la 1050°C când are loc un proces de transformare, descompunerea fosfatului tetracalcic Ca_4 (PO₄)₂O:

$$Ca_4 (PO_4)_2 O \rightarrow Ca_3 (PO_4)_2 + CaO$$



Figura 3.17 Termograma probei HAP 650 (a); Termograma probei HAP_MgSiZn 650 (b) $(10^{\circ}/\text{min}).$

3.2.7 Imagistică TEM

Prin imagistica TEM se pot determina atât morfologia particulelor de HAP cât și mărimea acestora. Astfel în figura 3.19 sunt prezentate imagini TEM ale unor pulberi de HAP pur, calcinat la 650°C. În fig. 3.22 sunt prezentate imagini TEM ale nanoparticulelor de argint.



Figura 3.19 Imagini TEM ale particulelor de HAP pur calcinat la 650°C; barele din figuri corespund la 500 nm (a) respectiv 200 nm (b).



Figura 3.22 Imagini TEM ale nanoparticulelor de argint preparate. Barele din imagini corespund la 100 nm.

Din imaginile TEM ale probei de HAP pur (figura 3.19) se observă particule aciculare mici de 7-15 nm cu diametre de cca 10 nm și lungimi de până la 100 nm Figura 3.22 prezintă imagini TEM ale nanoparticulelor de argint cu dimensiuni de sub 100 nm.

3.2.9 Imagistică AFM

Pentru exemplificare, imaginile AFM din figura 3.25 caracterizează suprafața hidroxiapatitei nesubstituite, calcinate la 650°C.



Figura 3.25 Imagini AFM ale pulberii de HAP calcinate la 650°C. Aria scanată 100 nm x 100 nm a) imagine topografică 2D; b) imagine de fază; c) imagine de amplitudine ;d) imagine topografică 3D; e) secțiune transversală de-a lungul săgeții în panoul a.

Tabel 3.9 Diametre medii ale particulelor, determinate din secțiuni transversale ale imaginilor AFM

Nr.	Droha da hidroxianatită	Diametrul mediu al particulelor	
crt.	r roba de muroxiapatita	determinat din cross section (nm)	
1	HAP pur	24	
2	HAP + 10% SiO_2	40	
3	HAP_MgSiZn	80	
4	HAP_MgSiZn + Ag	35	

Din analiza datelor din tabelul 3.9 se observă că dimensiunile cele mai mici ale particulelor sunt în cazul HAP nesubstituit (24 nm). Acest lucru este posibil datorită faptului că procesul de creștere al particulelor a fost blocat de surfactantul nonilfenol introdus în sinteză care, adsorbindu-se pe suprafață, oprește creșterea în continuare a particulelor.

PREPARAREA COMPOZITELOR NANOSTRUCTURATE

Cele mai recente progrese în domeniul cercetării științifice biomedicale se referă la materialele compozite (biocompozite) procesate la scară nanometrică. În cadrul studiilor întreprinse în cadrul acestei lucrări, s-a urmărit asamblarea colagenului și a chitosanului cu hidroxiapatită în vederea obținerii unor biocompozite cu o structură și compoziție cât mai apropiate de cea a osului natural. În acest context am preparat o hidroxiapatită parțial substituită cu ioni de Mg²⁺, Zn²⁺și SiO₄⁴⁻ așa cum am arătat în capitolul 3 și am asamblat aceste particule pe fibre de colagen și chitosan pentru a obține biocompozite cu structură și compoziție comparabile cu cele ale osului natural [257]. În tabelul 4.1 sunt prezentate sorturile de biocompozite preparate cu hidroxiapatită, chitosan și colagen.

Cod probă	Componente, adaosuri, preparare				
	M 650 = HAP_ 0,28%SiO ₂ _0,67 %Mg_0,2%Zn (%)	COLAGEN (%)	CHITOSAN (%)	GLUTARALDEHIDA (GA)	Mediul de preparare
B1	73	27	-	-	Acid
B6	73	27	-	-	Bazic
B2	93	-	7	-	Acid
B3	68.5	26	5.5	-	Acid
B4	75	24.5	-	0.5	Acid
B5	75	24.5	-	0.5	Bazic

Tabelul 4.1 Biocompozitele preparate cu hidroxiapatită, chitosan și colagen.

4.4.1 Spectroscopie FTIR

Spectrele FTIR ale materialelor COL, CHI, HAP_MgSiZn, HAP_MgSiZn +CHI /SiO₂, HAP_MgSiZn +COL /SiO₂ şi HAP_MgSiZn +CHI /SiO₂+ COL /SiO₂ sunt prezentate în figura 4.4 a-f. Pe baza acestor spectre se pot face aprecieri asupra interacțiunilor ce au loc între fazele sistemului.



Figura 4.4 Spectre FTIR ale probelor CHI, HAP_MgSiZn, HAP_MgSiZn +CHI /SiO₂ (a) şi (b);COL, HAP_MgSiZn, HAP_MgSiZn +COL /SiO₂ (c) şi (d); HAP_MgSiZn , HAP_MgSiZn +CHI /SiO₂+ COL /SiO₂ (e) şi (f).

În cazul **colagenului** (format din cca 33% glicină și 22% prolină sau hidroxiprolină) pe baza datelor din literatură [264], avem următoarele atribuiri: la 3433 cm⁻¹ gruparea H-O-H (alungire) iar în zona alifatică 2925 și 2858 cm⁻¹ gruparea C-H – (vibrație de alungire). În zona 1656 cm⁻¹ vibrația de alungire C=O din amida I iar la 1542 cm⁻¹ combinația vibrațiilor de deformare N-H și alungire C-N din amida II. La 1452 cm⁻¹ avem vibrația de deformare a grupărilor CH₃ iar la 1243 cm⁻¹ vibrația de alungire C-N și de deformare N-H din amida II.

Chitosanul pe baza datelor din literatură [265] prezintă la frecvențe înalte 3421 cm⁻¹ vibrația H-O-H cuplată cu N-H iar la 2925 și 2858 cm⁻¹ vibrația de alungire C-H. Banda pentru amida I (C=O) este localizată la 1637 cm⁻¹, iar amida II (N-H) este localizată la 1564 cm⁻¹. La 1383 cm⁻¹ identificăm vibrația de deformare a grupării CH₃.

Pe baza datelor din literatură [262] se pot observa frecvențele de vibrație specifice pentru hidroxiapatită, localizate în domeniul de frecvențe înalte atribuite grupărilor H-O-H la 3426 cm⁻¹ din apa legată prin punți de hidrogen. La 3566 cm⁻¹ se observă prezența grupărilor OH libere de pe suprafața particulelor. În zonele de vibrație de la 2800-2925 cm⁻¹ identificăm benzi minime de absorbție atribuite grupărilor CH₂ provenite din partea organică introdusă în sinteze sub formă de surfactant (nonilfenol). La 638 cm⁻¹ apar benzile specifice pentru gruparea CO_3^{2-} provenite din bicarbonatul de amoniu introdus în sinteze. Frecvențele de vibrație PO_4^{3-} sunt localizate în domeniul de frecvențe joase la 1090 cm⁻¹, 1030 cm⁻¹ și 590 cm⁻¹.

4.5.2 Caracterizarea prin imagistică SEM

În imaginile de mai jos se poate observa natura fibroasă a colagenului mineralizat cu nanoparticule de hidroxiapatită.





Figura 4.11 Imagini SEM ale probei HAP_MgSiZn+COL/SiO₂ B1; (a) Fibre de colagen mineralizate; (b) Fibra colagen, distribuție Ca²⁺.



Figura 4.12 Imagini SEM ale probei HAP_MgSiZn+COL/SiO₂ (mediu bazic) B6; (a) Fibră de colagen mineralizată; (b) Fibra colagen, distribuție calciu și fosfor.



Figura 4.13 Imagini SEM ale probei HAP_MgSiZn+COL/SiO₂ (mediu acid+GA)B4; (a) Fibră de colagen mineralizată;(b) Fibra colagen, distribuție Ca²⁺.

Din figurile imaginilor SEM se poate observa morfologia și structura biocompozitelor preparate în diferite condiții precum și fibrele de colagen mineralizate cu HAP atât în mediu acid cât și în mediu bazic.

4.5.3 Caracterizarea prin imagistică AFM

O selecție a imaginior AFM ale particulelor de biocompozite este prezentată în figurile 4.17, 4.18 și 4.19. Imaginile AFM arată diferite structuri morfologice ale auto-asamblării fibrei de colagen cu nanoparticulele de hidroxiapatită. Acestea sugerează că nanoparticulele de HAP conduc la formarea autoasamblărilor de COL cu un grad mare de stabilitate. Interacțiunile ce au loc între COL și nanoHAP pot fi explicate prin intermediul lagăturilor de hidrogen, însă nu excludem nici mecanismul de simplă înglobare al nanoparticulelor de HAP în matricea de colagen.



Figura 4.17 Imagini AFM ale fibrei de colagen mineralizată. Aria scanată 2 μm x 2 μm; a)
imagine topografică 2D; b) imagine de fază; c) imagine de amplitudine d) imagine topografică
3D; e) secțiune longitudinală de-a lungul săgeții în panoul a.

4.8 PREPARAREA SCAFOLDURILOR DIN MATERIALE COMPOZITE

Pentru prepararea scafoldurilor din materiale compozite am folosit tehnica depunerii în multistrat (layer by layer) a hidroxiapatitei cu colagenul și chitosanul pe suport de sticlă ITO. În această lucrare este prezentată metoda optimă de obținere a scafoldurilor. Pâna am ajuns însă la această formulă, s-au făcut o serie de încercări pentru a obține scafoldul optim cu caracteristicile: stabilitate chimică, morfologie, compoziție chimică și design. Astfel am folosit suspensii apoase de 1% HAP cu diferite compoziții și structuri, soluție 0.3% COL și soluție 2% CHI. Pe sticla optică tratată cu HCl 5% timp de 1 oră, activată cu ioni de siliciu, s-au depus prin adsorbții verticale (imersii) straturi succesive de silicat de sodiu 5% - HAP - silicat de sodiu - CHI - silicat de sodiu - COL.

S-au efectuat câte 5 spălări succesive după fiecare strat depus iar uscarea a fost facută la temperatura camerei timp de 30 de minute/strat. Silicatul de sodiu de concentrație 5% a fost depus cu rol de liant între straturile de HAP, CHI și cel de COL pentru a realiza o stabilitate chimică puternică între straturi. Totodată ionii de SiO₂ oferă și porozitate ridicată și controlată scafoldurilor. Schema de preparare a scafoldului este prezentată în figura 4.40.



Figura 4.40 Schema de preparare a scafoldului.

4.9 CARACTERIZAREA SCAFOLDURILOR

4.9.1. Imagistică AFM

Scafoldurile preparate prin tehnica layer by layer descrisă anterior au fost investigate pe suprafață prin imagistica AFM. În imaginile AFM din teză sunt prezentate mai multe tipuri de scafolduri preparate cu diferite structuri și morfologii, de exemplu cel format din HAP pur + $SiO_2 + CHI + SiO_2 + COL$. (Fig. 4.41), sau cel pa bază de HAP cu siliciu (Fig. 4.42).



Figura 4.41 Imagini AFM ale suprafeței scafoldului HAP pur + SiO₂ + CHI + SiO₂ + COL. Aria scanată 500 nm x 500 nm; a) imagine topografică 2D; b) imagine de fază; c) imagine de amplitudine; d) imagine topografică 3D; e) secțiune transversală de-a lungul săgeții în panoul a.



Figura 4.42 Imagini AFM ale suprafeței scafoldului HAP+10% $SiO_2 + SiO_2 + CHI + SiO_2 + COL$. Aria scanată 500 nm x 500 nm; a) imagine topografică 2D; b) imagine de fază; c) imagine de amplitudine; d) imagine topografică 3D; e) secțiune transversală de-a lungul săgeții în panoul a.

În imaginile AFM se observă pe scafolduri fibre de colagen mineralizate cu nanoparticule de hidroxiapatită (o mineralizare intrafibrilară) cu o distribuție omogenă a acestora pe suprafață.

5. BIOCOMPATIBILITATEA COMPOZITELOR NANOSTRUCTURATE IN VITRO

5.2.1.1 Evaluarea viabilității celulelor prin analiza MTT

Investigarea proliferării celulelor osteoblaste este o tehnică importantă de a evalua viabilitatea, biocompatibilitatea și toxicitatea biocompozitelor pe scafolduri *in vitro*.

Testul MTT (*bromurã de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu*) se bazează pe capacitatea dehidrogenazei mitocondriale de a cliva inelul tetrazoliu al MTT, de culoare galbenă, din celulele viabile și de a forma cristale de culoare albastru închis de formazan care nu pot traversa membrana celulară și astfel se acumulează în celulele viabile. Numărul de celule viabile este direct proporțional cu cantitatea de formazan format. Solubilizarea cristalelor se realizează prin adăugare de izopropanol iar cantitatea de formazan format este determinată spectrofotometric la lungimea de undă de 492 nm.



Figura 5.17 Structura chimică a MTT (bromură de 3-(4, 5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu)

Celulele osteoblaste aflate la pasajul 6 sunt detașate de pe scafold cu tripsină 0.25% cu EDA timp de 5 minute după 3 spălări cu PBS. Tripsina este inactivată prin adăugarea mediului de cultură cu 10% ser fetal. Suspensia de celule este centrifugată timp de 5 minute la 1000 rpm. Viabilitatea celulară a fost verificată cu 0,4% tripan albastru iar numărarea celulelor a fost efectuată cu un hemocitometru Thoma.

Analiza statistică a rezultatelor testului MTT s-a făcut cu testul multicomparison Dunnett În cadrul acestui test am comparat grupul de control (plastic) cu fiecare scafold preparat cu substrat HAP-MgSiZn; substrat CHI; substrat COL; substrat HAP-MgSiZn+CHI+COL.



Figura 5.18 Analiza MTT a viabilității celulelor la 2 ore (a) la 48 de ore (b) pe scafolduri comparate cu proba control (plastic) în aceleași condiții de cultură.

Din analiza MTT se poate observa că viabilitatea celulară la 2 ore (figura 5.18 a) pe scafolduri este mult mai intensă decât pe proba control (plastic). Valorile absorbanței apar a fi semnificativ diferite la scafoldul cu COL și scafoldul cu structură complexă HAP_MgSiZn+CHI+COL față de proba control. Același lucru se întâmplă și la 48 de ore (figura 5.18 b) de cultură a celulelor pe scafolduri. Aceste diferențe semnificative sunt influențate în mod cert de compoziția, morfologia și structura scafoldului. Cu cât acesta prezintă o structură și o compoziție mai complexă, cu atât viabilitatea celulară este mai ridicată. Testul MTT arată că scafoldurile preparate nu au efect toxic asupra celulelor și prezintă o bună biocompatibilitate cu acestea.

5.2.1.3 Evidențierea imunocitochimică a moleculelor implicate în adeziunea celulară

Osteoblastele conțin molecule specifice implicate în fenomenul de adeziune celulară *osteopontina* și *molecula de adeziune celulară CD44*. În experimentele noastre am marcat cu anticorpi monoclonali celulele cultivate pe scafolduri și pe cele cultivate pe plastic pentru a observa dacă există diferențe în exprimarea acestor antigene în funcție de scafoldul utilizat.

Investigarea scafoldului: celule de control cultivate pe o placă Petri tratată cu colagen de tip I la 3 zile de cultură.

Osteoblastele la pasajul 6 au fost însămânțate în mediu osteogenic de cultură Promoocell timp de 3 zile. Mediul de diferențiere Promocell este un mediu ce conține factori specifici

ce induc diferențierea osoasă. Colorațiile imunocitochimice s-au efectuat pentru osteopontină, actină și DAPI.



a.OP-FITC (400x)

b. OP-FITC+ DAPI (400x)



c.Faloidina -TRITC (400x)

Figura 5.20 Celule osteoblaste de control pe substrat de colagen, ziua 3.

Celulele prezintă pozitivitate pentru osteopontină (figura 5.20 b). Morfologia celulelor la 72 ore este cea de celule tinere, alungite, cu aspect fibroblastoid. Modificările citoscheletului determinate de aderarea celulelor la suprafața de plastic acoperită cu colagen au constat în orientarea microfilamentelor de actină paralel cu axul longitudinal al celulelor (figura 5.20 c).

Investigarea scafoldului : HAP_MgSiZn + SiO₂ + CHI + SiO₂ + COL în mediu de cultură cu celule la 7 zile, colorație - colagen FITC-faloidina TRITC-DAPI.



a COL-FITC (400x)

COL- FITC-faloidina TRITC-DAPI (400x)



Triplă colorație: OP-FITC, faloidina TRITC, DAPI (400x)

Figura 5.23 a-c. Scafold cu celule la 7 zile.

În această probă s-a urmărit evidențierea sintezei colagenului *de novo* de către celulele osteoblaste. Spre deosebire de probele de control fără celule colorația fibrelor de colagen este mult mai intensă, aceste fibre sunt în contact direct cu celulele și sunt acoperite de mici depozite de cristale de hidroxiapatită (figura 5.23 b și c).

Investigarea scafoldului : HAP_MgSiZn + SiO₂ + CHI + SiO₂ + COL în mediu de cultură cu celule la 3 zile.



a. OP-FITC (400x)

b. faloidina TRITC (400x)



c. Triplă colorație: OP-FITC + faloidina TRITC+ DAPI (400x);



d. OP-FITC+Actina TRITC+DAPI (200x)



e. OP-FITC+Actina TRITC+DAPI (400x)

Figura 5.24 a-e. Scafold cu celule în mediu de cultură la 3 zile.

Cultivarea în mediul de cultură standard timp de 3 zile a osteoblastelor pe acest scafold a indus o intensă exprimare a osteopontinei intracelulare față de cultivarea în mediul osteogenic Promocell (figura 5.20 a-c). Astfel se remarcă o morfologie mai tânără a celulelor (aspect mai alungit) și o accentuată densitate a filamentelor de actină care sunt dispuse în fascii paralele cu axul longitudinal al celulei (Fig. 5.24 a și b) iar pe suprafața celulelor apar cristale mici de hidroxiapatită (Fig 5.24 c). Figura 5.24 (d) reprezintă triplă colorație pentru OP-FITC, actina-faloidina TRITC și DAPI iar Figura 5.24 (e) oferă detalii ale citoscheletului, cu apariția fibrelor de stres.

Comportamentul osteoblastelor în condiții de cultură 3D pe suporturi matriceale este diferit în funcție de structura și compoziția chimică a substratului scafoldului. Un substrat osteoinductiv induce o aderare și proliferare celulară ridicate și orientează celulele spre un fenotip mai matur de celulă osteocit (celula matură). Pentru suporturile matriceale ce conțin hidroxiapatită modificată cu Mg²⁺, Zn²⁺, SiO₄⁴⁻ s-au obținut rezultatele cele mai bune. Astfel s-a constatat o proliferare accelerată a celulelor într-un interval scurt de timp (3 zile) pe scafolduri indusă de prezența acestor substituenți în structură, care influențează în mod pozitiv dezvoltarea celulelor osteoblaste.

Metodele de evaluare a adeziunii celulare tatonate în această etapă și anume aprecierea morfologiei osteoblastelor, numărarea celulelor la diferite intervale de timp, colorațiile imunocitochimice pentru proteinele implicate în procesul de aderare și a filamentelor de actină, au arătat diferențe semnificative între scafoldurile cu substratele matriceale diferit preparate.

5.2.2 Investigarea scafoldurilor prin imagistică SEM

Imagistica SEM este o metodă de investigare a structurii și suprafaței scafoldurilor cu sau fără celule. Astfel am reușit să observăm apariția unor structuri noi pe scafolduri la anumite intervale de timp și modul de proliferare și dezvoltare al celulelor pe acestea. Etapele pregătirii probelor biologice pentru imagistica SEM au fost:

- fixarea probelor cu glutaraldehidă 2,5%;
- spălarea probelor cu tampon fosfat (PBS);
- acoperirea probelor cu 6nm strat pulverizat de aur.



Figura 5.28 Imagini SEM ale scafoldului $HAP_MgSiZn + SiO_2 + CHI + SiO_2 + COL + celule la 3 zile (a), (b) și 7 zile de cultură (c), (d), (e), (f).$

În imaginile SEM se observă o organizare tridimensională a scafoldurilor cu inducerea maturizării (diferențierii) celulelor osteoblaste spre osteocite cu formă caracteristică și cu prelungiri dendritice. În figura 5.28 c și d se observă în spațiul intercelular apariția unei rețele matriceale proprii create de celulele osteoblaste cu sinteza de *matrice osoasă de novo*.

5.3 Vizualizarea osteoblastelor prin imagistică TEM

Testarea viabilității celulelor osteoblaste s-a făcut prin imagistică TEM. În acest scop, s-a efectuat secționarea celulelor după 7 zile de cultură, printr-o metodă specială. Astfel, celulele au fost desprinse de pe scafolduri prin tripsinizare și apoi centrifugate. Se obține un "buton" de celule care se încapsulează într-o rașină specială și apoi se face secționarea probei cu microtomul, obținându-se secțiuni ultrafine de 40 nm.



Figura 5.35 (a). Secțiune transversală prin celulă cu intense procese de exocitoză (export din interior în mediul extracelular). Se disting microvili (1), vezicule (2), formațiuni exocitate din celulă în afară (3), lizosomi (4); nucleul celulei (5), citoplasma (6); (b). Secțiune transversală printr-o porțiune din celulă:1 – mitocondrii; 2 – lisosomi; 3 – vezicule; 4 – microvezicule de endocitoză; 5 – REG. Se observă atât procese de exocitoză cât și procese de endocitoză.

Din imaginile TEM ce prezintă secțiuni la diferite nivele prin celulă, se observă toate organitele celulare specifice importante, ceea ce demonstrează viabilitatea excelentă a acestora. De exemplu se poate observa existența nucleului la nivelul căruia se sintetizează ADN și ARN; nucleolul ce are rol în pregătirea celulei pentru diviziunea mitotică; mitocondriile care generează cea mai mare parte a ATP – ului utilizat ca sursă energetică în reacțiile biochimice din celulă. De asemenea se constată prezența reticulului endoplasmatic (RE) la nivelul căruia are loc biosinteza proteinelor și a lipidelor. În figura 5.35 se observă atât procese de exocitoză cât și procese de endocitoză ale celulei. Acestea demonstrează faptul că celula prezintă o activitate biologică intensă ce conduce la o viabilitate remarcabilă a acesteia.

5.2.6 Analiza SEM și EDX a osului natural

Pentru a investiga suprafața și compoziția chimică a osului natural am făcut o analiză SEM și EDX a acestuia prezentate în figura 5.37 a-d.



Figura 5.37 Imagine SEM a osului natural (a) și (c); analiza chimică elementală a osului natural (b) și (d).

Din imaginile SEM și analiza EDX a osului natural se poate observa structura și compoziția chimică a acestuia. Fragmentele de os natural au fost obținute în timpul intervenției chirurgicale de reconstrucție a articulației genunchiului, după obținerea acordului pacientului.

Concluzii generale

- Am efectuat o sinteză și o analiză asupra factorilor din ecuațiile cinetice ale formării și creșterii germenilor și am evidențiat rolul pe care îl au concentrația reactanților, pH-ul mediului de reacție și suprasaturația asupra mărimii particulelor. De asemenea am stabilit natura și proporția în care surfactanții sunt adăugați în sinteză.
- Am stabilit ordinea şi modul de adăugare al ionilor substituenți pentru a evita formarea α şi β fosfatului tricalcic.
- Prin determinări experimentale am optimizat durata tratamentului hidrotermal (24 h) prin care se aduce compoziția fazei solide la raportul Ca/PO₄ =1.67, raport corespunzător hidroxiapatitei.
- Utilizând în calitate de surfactanți amidon, gelatină, zer de lapte de vacă și nonilfenol am stabilit că surfactantul cel mai potrivit este nonilfenolul urmat de zer, care are în compoziție lactoză și o serie de proteine.
- Am stabilit temperatura optimă de calcinare pentru realizarea gradului de cristalinitate, factor important pentru materialele folosite în ortopedie și stomatologie, fiind cuprinsă între 650°C 750°C interval de temperatură la care carbonații nu se descompun termic.
- Am elaborat metode de asamblare a HAP/COL, HAP/CHI precum și a HAP/CHI/COL atât în cimenturi (biocmpozite B1, B2 si B3) cât și sub formă de scafolduri prin adsorbție pe suprafețe de sticlă ITO după metoda strat cu strat (layer by layer) prin imersii verticale succesive în suspensiile componente.
- Hidroxiapatita preparată după metoda originală, parțial substituită cu ioni de SiO₄⁴⁻, Zn²⁺ şi Mg²⁺ în proporțiile indicate la capitolul 3, a arătat cea mai bună biocompatibilitate cu celulele osteoblaste în comparație cu celelalte probe de HAP pur şi HAP substituit cu SiO₂.
- Pe cale experimentală am stabilit condițiile optime de preparare a scafoldurilor prin care să se asigure fenomenele de adeziune, proliferare și diferențiere celulară cele mai ridicate.

- Prin adaosul de silicat de sodiu soluție 5% și controlul pH-ului la care se realizează policondensarea acestuia, în cadrul sistemelor studiate, am obținut scafolduri cu diferite morfologii și cu porozitate controlată.
- Caracterizarea microstructurilor s-a făcut prin analize de microscopie TEM, SEM și AFM; prin difractometrie de raze X și spectrosopie FTIR și XPS. Rezultatele au arătat că acestea prezintă o structură cu o cristalinitate bine conturată și dimensiuni ale particulelor cuprinse în domeniul nanometric.
- Introducerea argintului la scară nano (10 nm) în structura HAP conferă acesteia proprietăți (adeziunea, proliferarea) net superioare față de HAP pur (figurile 5.16 și 5.17).
- Analiza imaginilor de microscopie optică arată că pentru nanostructurile de HAP parțial substituite cu ioni de SiO₄⁴⁻, Mg²⁺ și Zn²⁺ fenomenul de adeziune se manifestă mai intens încă din primele 3 zile de cultură a celulelor osteoblaste comparativ cu nanostructurile cu HAP pur.
- După 7 zile de cultură în mediu cu celule osteoblaste se constată că numărul celulelor pe unitatea de suprafață (1mm²) scade datorită faptului că se intensifică procesul de adeziune care este în raport invers proporțional cu fenomenul de proliferare celulară.
- Nanostructurile de HAP care conțin argint și aur arată proprietăți de biocompatibilitate puțin inferioare celor de HAP complex. Această caracteristică sugerează faptul că utilizarea nanostructurilor HAP cu conținut de Ag⁰ și Au⁰ sunt de preferat datorită proprietăților pe care aceștia le au. Argintul are proprietatea de a "sufoca" virușii și bacteriile, iar nanoparticulele de aur au capacitatea de a fi utilizate pentru fabricarea unor teste de diagnosticare rapidă, prin care să se identifice prezența unor agenți toxici, microbi sau alergogeni în fluidele corpului (sânge).
- Imaginile TEM ce prezintă secțiuni la diferite nivele prin celulă, relevă că acestea au toate organitele specifice importante, demonstrând astfel excelenta lor viabilitate. Tot prin imagistică TEM în figura 5.34 s-au pus în evidență procesele de exocitoză și de endocitoză ale celulei care dovedesc faptul că celula prezintă o activitate celulara intensă ce conduce la o viabilitate remarcabilă a acesteia.
- Analizele EDX a celulei osteoblaste, a osului natural și a osului la interfața cu proteza relevă compoziția chimică a acestora, asemănătoare cu compoziția chimică a nanostructurilor pe care le-am preparat în această lucrare.

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ

- 1. Temenoff J.S., Mikos A.G.; Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering; Biomaterials, 21: 2405-2412, 2000.
- 2. Kelly E.B.; New Frontiers in Bone Grafting; Orthopedic Technology Review, 2:28-33, 2000.
- 3. Crane G.M., Ishaug S.L., Mikos A.G.; Bone tissue engineering; Nature Medicine, 1:1322-1324, 1995.
- 4. Athanasiou K.A., Zhu C.F., Lanctot D.R., Agrawal C.M., Wang X.; Fundamentals of biomechanics in tissue engineering of bone; Tissue Engineering, 6:361-381, 2000.
- 204. Gravens D., Margraf H., Butcher H., Ballinger W.; The antibacterial effect of treating sutures with silver. Surgery, 73:122-127, 1973.
- 205. Heard S.O., Wagle M., Vijayakumar E.; The influence of triple-lumen central venous catheters coated with chlorhexidine/silver sulfadiazine on the incidence of catheter-related bacteremia: a randomized; Controlled clinical trial. Arch Intern Med,158:81-87, 1998.
- 206. Kerker M.; The optics of colloidal silver: something old and something new; Journal of Colloid and Interface Science,105:297-314, 1985.
- 207. Liedberg H., Lundeberg T.; Silver alloy coated catheters reduce catheter-associaled bacteriuria. Br J Urol, 65:379-381, 1990.
- 208. Livingston-Wheeler V., Wheeler O.W.; The microbiology of cancer: Physician's Handbook; Spring Valley, CA: A Livingston-Wheeler Medical Clinic Publication, 1977.
- 209. Madden M.R., Nolan E., Finkelstein J.L, Yurt R.W, Smeland J., Goodwin C. W., Hefton J., Staiano-Coico L.; Comparison of an occlusive and a semi-occlusive dressing and the effect of the wound exudate upon keratinocyte proliferation; J.Trauma, 29:924-930, 1989.
- 210. Maki D.G., Cobb L., Garman J.K., Shapiro J.M,. Ringer M., Helgerson R.B.; An attachable silver-impregnated cuff for prevention of infection with central venous catheters: a prospective randomized multicenter trial. Am J Med, 85:307-314, 1988.
- 211. Maki DG, Stolz SM, Wheeler S, Mermel LA.; Prevention of central venous catheter-related bloodstream infection bz use of an antiseptic-impregnated catheter: a randomized. controlled study; Ann Intern Med; 127:257-266, 1997.

- 212. Margraf H.W, Covey T.H Jr; A trial of silver-zinc-allantoinate in the treatment of leg ulcers; Arch Surg, 112:699-704, 1977.
- 213. Morones J.R.; The bacteriocidal effects of silver nanoparticles; Nanotechnology, 16:2346-2353, 2005.
- 214. Moyer C.A., Brentano L., Gravens D.; Treatment of large human burns with silver 0.5% nitrate solution; Arch Surg, 90:812–867, 1965.
- 215. Niizeki K., Hashimoto K.; Treatment of molluscum contagiosum with silver nitrate; Paste. Pediatric Dermatology, 5:395–397, 1999.
- 216. Olson M.E., Wright J.B., Lam K.; Healing of porcine donor sites covered with silver-coated dressings; Eur J Surg, 166:486–489, 2000.

217. Cai L., Wang Q., Gu C., Wu J., Wang J., Kang N., Hu J., Xie F., Yan L., Liu,X., Cao, Y., Xiao R. ; Vascular and micro-environmental influences on MSC-coral hydroxyapatite construct-based bone tissue engineering; Biomaterials, 32:8497-8505, 2011.

218. Russell A.D., Path F.R., Hugo W.B.; Antimicrobial activity and action of silver; Prog Med Chem., 31:354, 1994.

219.Sosa I.O., Noguez C., Barrera R.G.; Optical properties of metal nanoparticles with arbitrary shapes; Journal of Physical Chemistry B., 107:6269-6275, 2003.

223. Haghbin N. M., Solati-Hashjin M., Moztarzadeh F.; Preparation of hydroxyapatite ceramics for biomedical applications; Journal of Ceramic Processing Research, 10:54-57, 2009.

224. Faming Z., Jiang C., Jianxi L., Kaili L., Congqin N.; Bioinspired structure of bioceramics for bone regeneration in load-bearing sites; Acta Biomaterialia, 3:896–904, 2007.

225. Sung-Baek C., Fumiaki M., Tadashi K., Kazuki N., Naohiro S., Takashi N.; Apatite-forming ability of silicate ion dissolved from silica gels; Journal of Biomedical Materials Research, 32:375-381, 1996.

226. Sz-Chian L., San-Yuan C., Hsin-Yi L., Jong-Shing B.; Structural characterization of nanosized calcium deficient apatite powders; Biomaterials, 25 : 189–196, 2004.

228. Karin A. H., Peter A. R., Nigel S., Thomas B.; Effect of silicon level on rate, quality and progression of bone healing within silicate-substituted porous hydroxyapatite scaffolds; Biomaterials, 27:5014–5026, 2006.

229. Yoshinobu F., Hiroshi Y., Kunio K., Tsugio S., Akitsugu O.; Preparation of needle-like hydroxyapatite by homogeneous precipitation under hydrothermal conditions; Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 57:349 – 353, 2007.

230. Shigeru S., Takayuki Y., Toshihiro M., Hiromu H., John B. M.; Preparative enhancement of the thermal stability of calcium hydroxyapatites ; Journal of Solid State Chemistry, 142:319 -324, 1999.

231. Marı'a V. R, Daniel A.; Silicon substituted hydroxyapatites. A method to upgrade calcium phosphate based implants; J. Mater. Chem., 15:1509–1516, 2005.

232. Mahdi R., Fathollah M., Mohammadreza T.; Formation of hydroxyapatite nanoneedles on the surface of a novel calcium phosphate/blood plasma proteins biocement in simulated body fluid (SBF); Journal of Ceramic Processing Research, 10:669-673, 2009.

233. Anna S., Zofia P., Czesława P.; FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods; Journal of Molecular Structure 744–747, 657–661, 2005.

234. Wang H.X., Guan S.K., Wang X., Ren C.X., Wang L.G. ; In vitro degradation and mechanical integrity of Mg–Zn–Ca alloy coated with Ca-deficient hydroxyapatite by the pulse electrodeposition process; Acta Biomaterialia, 6:1743-1748, 2010.

235. Dietrich E., Oudadesse H., Lucas-Girot A., Le Gal Y., Jeanne G. S. ; Effects of Mg and Zn on the surface of doped melt-derived glass for biomaterials applications; Applied Surface Science, 255:391-395,2008

236. Kim S. R., Lee J. H., Kim Y. T., Riu D. H., Jung S. J., Lee Y. J., Chung S. C., Kim Y. H.; Synthesis of Si, Mg substituted hydroxyapatites and their sintering behaviors; Biomaterials, 24:1389-1398, 2003.

255. Mocanu A., Cernica I., Tomoaia Gh., Bobos L-D,, Horovitz O., Tomoaia-Cotisel M.; Selfassembly characteristics of gold nanoparticles in the presence of cysteine; Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects, 338: 93–101, 2009.

256. Yogita G., Mathur G. N., Sandeep V.; Biomimetic synthesis and ultrastructural characterization of a zerovalent gold–hydroxyapatite composite; Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 16:363–366, 2006.

257. Barbu-Tudoran L., Tomoaia Gh., Horovitz O., Mocanu A., Tomoaia-Cotisel M., Selfassembly characteristics of gold nanoparticles in the presence of arginine; Journal of optoelectronics and advanced materials, 10: 2293 – 2297, 2008.

262. Sionkowska A., Kozłowska J.; Characterization of collagen/hydroxyapatite composite sponges as a potential bone substitute; International Journal of Biological Macromolecules, 47:483–487, 2010.

263. Sena L. A., Caraballo M. M., Rossi A.M., Soares G.A ; Synthesis and characterization of biocompomposites with different hydroxyapatite-collagen ratios ; J. Mater Sci: Mater Med, 37:2395-2400, 2009.

264. Sionkowska A., Wisniewski M., Skopinska J., Mantovani D.; Effects of solar radiation on collagen-based biomaterials; International Journal of Photoenergy ,45:1–6; 2006.

265. Al-Sagheer F., Muslim D.; Thermal and Mechanical Properties of Chitosan/SiO₂ Hybrid Composites; Journal of Nanomaterials, Article ID 490679, 7 pages, 2010.

303.Tomoaia Gh., <u>L.-B. Pop</u>, Petean I., Tomoaia-Cotisel M.; Significance of surface structure on orthopedic materials; Materiale Plastice, 49:1-12, 2012.

317. Tomoaia Gh., Soritau O., Tomoaia-Cotisel M., <u>Pop L.-B.</u>, Pop A., Mocanu A., Horovitz O., Bobos L.-D.; The effect of self-assemblies based on nanostructured phosphates and collagen mixtures on cell cultures, in "Metal Elements in Environment, Medicine and Biology", Editors, G. Garban and R. Silaghi-Dumitrescu, Tome IX, pp. 135-140, 2009, Cluj-Napoca University Press, ISSN: 1583-4204.

318. Tomoaia Gh., <u>Pop L.-B.</u>, Tomoaia-Cotisel M.; Cell scaffolds mimic bone structure. The effect of calcium phosphates and collagen mixtures on osteoblasts cultures, in "Promovarea dezvoltarii durabile in spatiul Dunarean prin cooperare culturala si stiintifica", Humboldt-Kolleg Monography, Cluj-Napoca, 20-23 May, 2010; Monography, Mediamira Press, Cluj-Napoca, pp. 233-240, 2010.

319. Tomoaia Gh., Soritau O., Tomoaia-Cotisel M., <u>Pop L.-B.</u>, Pop A., Mocanu A., Horovitz O., Bobos L.-D.; Scaffolds made of nanostructured phosphates, collagen and chitosan for cell culture; Paper Identification P-126-Cotisel; "The 5th International Granulation Conference", Lausanne, Switzerland, June 20-22, 2011, 18 pagini.

320. Tomoaia Gh., Tomoaia-Cotisel M., Mocanu A., Horovitz., Bobos L-D., Crisan M., Petean I.; Supramolecular organization of collagen and anti-cancer drugs; J. Optoelectronics Advanced Materials, 10:961 – 964, 2008.

321. Tomoaia Gh., Soritau O., Tomoaia-Cotisel M., <u>Pop L.-B.</u>, Pop A., Mocanu A., Horovitz O., Bobos L.-D.; Nanostructured phosphates, collagen and chitosan scaffolds for cell culture; Journal Powder Technology, 2011, in press.

322. Prejmerean C., Tomoaia-Cotisel M., Vasile E., Furtos G., <u>Pop L-B</u>, Moldovan M., Sarosi C., Petean I.; Characterization of surface organization and morphology of some new experimental dental resin-based composites; International Journal of Nano and Biomaterials, 2011, in press.

323. Tomoaia Gh., Soritau O., Tomoaia-Cotisel M., <u>Pop L.-B.</u>, Pop A., Mocanu A., Horovitz, O., Bobos L.-D.; The effect of self-assemblies based on nanostructured phosphates and collagen mixtures on cell cultures; in "The 9th International Symposium of Roumanian Academy, Cluj-Napoca Branch and Timisoara Branch", on "Metal Elements in Environment, Medicine and Biology", Cluj-Napoca, October 16-17, 2009.

324. <u>Pop L.-B.</u>, Pop A., Tomoaia Gh., Mocanu A., Bobos L.-D., Horovitz O., Jumate N., Bratu I., Tomoaia-Cotisel M.; Synthesis and physico-chemical characterization of Inorganic powders of nano- and micro-structures based on calcium phosphates; in "The 9th International Symposium of Roumanian Academy, Cluj-Napoca Branch and Timisoara Branch", on "Metal Elements in Environment, Medicine and Biology", Cluj-Napoca, October 16-17, 2009.

325. Tomoaia Gh., <u>Pop L.-B.</u>, Tomoaia-Cotisel M., Cell scaffolds mimic bone structure. The effect of calcium phosphates and collagen mixtures on osteoblasts cultures, "Humboldt-Kolleg Conference", Cluj-Napoca, May 20-23, 2010.

326. Tomoaia Gh., Soritau O., Tomoaia-Cotisel M., <u>Pop L.-B.</u>, Pop A., Mocanu A., Horovitz O., Bobos L.-D.; Scaffolds made of nanostructured phosphates, collagen and chitosan for cell cultures; "International Physical Chemistry Conference", (ROMPHYSCHEM 14, 2010), Bucharest, June 2-4, 2010.

327. Furtos G., Tomoaia-Cotisel M., Prejmerean C., Baldea B., <u>Pop L.B.</u>, Pop A., Moldovan M.; New antimicrobial bone cement based on hydroxyapatite and silver; The 4th International Conference "Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices", BiomMedD'2010, Sinaia, 23-25 September, 2010.

328. Prejmerean C., Tomoaia-Cotisel M., Furtos G., <u>Pop L-.B.</u>, Trif M., Sarosi C., Petean I.; Characterization of surface organization and morphology of some new experimental dental resinbased composites; The 4th International Conference "Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices". (Poster: P89), Sinaia, 23-25 September, 2010. 329. Tomoaia Gh., Soritau O., <u>Pop L.-B.</u>, Furtos G., Prejmerean C., Mocanu A., Tomoaia-Cotisel M.; Scaffolds of hydroxyapatite, collagen and chitosan for improved adhesion and bioactivity of osteoblastic cells; COST Meeting, Action TD0906, University of Mons, Mons, Belgium, May 18-20, 2011.

330. Furtos G., Tomoaia-Cotisel M., Baldea B., <u>Pop L.-B.</u>, Jumate N., Prejmerean C., Barbu T.L.; The effect of CaF_2 content on mechanical properties of some bone cements based on hydroxyapatite; The annual meeting of the European Chapter of the Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society (TERMIS), in Granada Congress and Exhibition Centre, Spain, June 7-10, 2011.

331. Tomoaia Gh., Soritau O., Tomoaia-Cotisel M., <u>Pop L.B.</u>, Pop A., Mocanu A., Horovitz O., Bobos D.L.; The effect of self-assembled composites based on calcium phosphates and biopolymers on the adhesion of osteoblast cells; The 10th International Conference on Colloid and Surface Chemistry (Cea de a 10-a Conferinta de Chimia Coloizilor si a Suprafetelor cu Participare Internationala , Ediție omagială dedicată Anului Internațional al CHIMIEI – 2011), "Dunarea de jos" University of Galati, Galati, June 9-11, 2011.