



UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

DEPARTAMENTUL DE BIOCHIMIE SI BIOLOGIE MOLECULARA

Proiect PCCE248/2010

NOI CONCEPTE SI STRATEGII PENTRU DEZVOLTAREA CUNOASTERII UNOR NOI

STRUCTURI BIOCOMPATIBILE IN BIOINGINERIE

RAPORT ȘTIINȚIFIC CONSORȚIU

Site: www.pcce248.weebly.com

P1 – UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI și totodată coordonatorul echipei de cercetare a fost implicat în cea de a treia etapa a proiectului PCCE248/2010, în realizarea activităților științifice din cadrul **Obiectivului 3** - “*Studiul efectelor cultivării în sistem 3D și a factorilor de creștere asupra diferențierii condrogenice a celulelor stem izolate din țesut adipos (ADAS) în vederea obținerii unor modele de investigare a potențialului lor de regenerare a țesutului cartilajinos*”.

În acord cu planul de realizare, P1 a continuat și dezvoltat **activitatea 3.6 (Optimizarea metodelor de izolare a celulelor ADAS și de cultivare a lor în sisteme 2D)** urmărind modularea condițiilor de cultivare a celulelor ADAS în sistem 2D în vederea obținerii unei diferențieri adipogenice optime ca eficiența și durata. Această optimizare a metodei de cultivare a fost valorificată sub forma unui articol ISI, publicat în *International Journal of Molecular Sciences* (factor de impact 2.598 și Scor Relativ de Influență 1.6077).

Activitatea 3.7 a vizat **selectarea sistemului de cultivare a celulelor ADAS în vederea diferențierii condrogenice și monitorizarea procesului**. Pentru îndeplinirea acestei activități, P1 a testat (i) diferite rețete de inducere a procesului de diferențiere celulară pe cale condrogenică și (ii) diferite tipuri de cultivare a celulelor - în sistem bidimensional (2D) și în pellet - în vederea identificării sistemului care să permită desfășurarea optimă a condrogenezei.

Procesul de diferențiere condrogenică a fost monitorizat timp de 28 de zile post inducție : (i) La nivel genic, prin *RealTime RT-PCR* pentru evidențierea evoluției procesului de diferențiere în timp la nivelul markerilor condrogenezei Sox9, ColagenII, agrecan, CEP68 și CD151 ; (ii) La nivel proteic, prin *Western Blot*, a fost pusă în evidență expresia markerilor condrogenici Sox9, Colagen II și CEP68 la 7, 14 și 28 de zile post inducție în sistemul de cultură în pelet ; (iii) La nivel proteic, prin *imunofluorescență* realizată pe secțiuni din pelet la 14 și 28 de zile post inducție s-a urmărit evidențierea markerilor Sox9, colagen II, agrecan și CEP68. Studiile realizate din peletul obținut în cursul condrogenezei din celule ADAS au fost comparate în permanentă cu studiile realizate pe pelet obținut din condrocite izolate din cartilaj uman, utilizat în experiment ca și control.

Concluziile studiilor de condrogeneză *in vitro* a celulelor ADAS au relevat :

- (i) Celulele ADAS pot diferenția în celule de tip « chondrocyte-like » în condiții de cultură standard și sub influența unui mediu inductor al condrogenezei. Celulele diferențiate rezultate în urma procesului sunt capabile să producă matrice extracelulară specifică cartilajului.
- (ii) Din diferite rețete de medii de diferențiere testate pe celule ADAS, P1 a selectat compoziția MD2 ca fiind cea mai eficientă din punct de vedere al inducerii procesului de condrogeneză atât în sistem 2D, cât și în sistem pelet.



UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

- (iii) Sistemul de cultivare a celulelor ADAS care permite cea mai eficienta condrogeneza *in vitro* este sistemul in pelet, care asigura celulelor conditii tridimensionale similare celor din cartilaj.
- (iv) Factorul transcriptional Sox9 poate fi considerat marker timpuriu al procesului de condrogeneza, acesta fiind principalul inductor al procesului ; Colagen II, agrecanul si CEP68 pot fi considerati markeri condrogenici tarzii, caracteristici matricei extracelulare.

Concluziile studiilor de condrogeneza vor fi utilizate in etapa urmatoare a proiectului PCCE248, care vizeaza posibilitatea de diferentiere a celulelor ADAS pe cale condrogenica in sisteme de cultura tridimensionale originale, destinate aplicatiilor de reconstructie si regenerare a cartilajului. In acest sens, in cadrul **activitatii 3.4**, P1 **a stabilit**, impreuna cu echipele P3 si P7, **numarul de probe si forma de prezentare a sistemelor tridimensionale elaborate de acesti parteneri, in vederea parcurgerii complete in conditii optime a intregului set de teste pentru evaluarea biocompatibilitatii.**

Odata optimizate numarul si forma de prezentare a suporturilor, P1 a inceput **evaluarea biocompatibilitatii in vitro a structurilor scaffold 3D elaborate de P3 si P7 (activitatea 3.3)**. Testele de biocompatibilitate au fost efectuate de P1 utilizand celule ADAS aflate in pasajul 4 si au vizat :

- (i) Evaluarea potentialului citotoxic al suporturilor 3D furnizate prin cuantificarea spectrofotometrica a activitatii enzimei lactat dehidrogenaza (LDH), eliberata in mediul de cultura de catre celulele care nu mai prezinta integritate membranara
- (ii) Evaluarea viabilitatii si proliferarii celulare in contact cu materialele propuse de parteneri :
- prin cuantificarea spectrofotometrica a concentratiei de formazan rezultat prin metabolizarea compusului MTT de catre celulele viabile si metabolic active
 - evaluarea calitativa pe baza kitului Live/Dead (Invitrogen) pune in evidenta celulele vii (marcare cu calceină AM) și pe cele moarte (marcare cu bromură de etidiu).

Biocompatibilitatea suporturilor pe baza de chitosan furnizate de P7 a fost evaluata la 2, 4, 6 si 8 zile de cultura. Pe baza testelor cantitative si calitative efectuate, rezulta ca aceste suporturi sunt biocompatibile si pot fi utilizate in continuare pentru studii de diferentiere *in vitro*.

Biocompatibilitatea hidrogelurilor pe baza de colagen si sericina furnizate de P3 a fost evaluata la 2, 4 si 7 zile de la insamnatrea celulelor pe suprafata materialelor. Hidrogelurile pe baza de colagen si sericina in cele 4 compozitii diferite s-au dovedit a fi biocompatibile si au generat rezultatele foarte bune, si de aceea pot fi considerate retete originale valoroase pentru etapa ulterioara a testarii diferentierii condrogenice.

P2 – INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ "NICOLAE SIMIONESCU" a fost implicat în realizarea studiilor biologice *in vitro* din cadrul **Obiectivului 1: "Obținerea de noi structuri suport 3-D destinate cultivării de osteoblaste și celule stem din măduva osoasă umană (hMSC), în vederea obținerii de construcții celule-suport caracterizate arhitectural și mecanic, utilizabile în ingineria țesutului osos"**. In acest sens, s-a realizat testarea biocompatibilitatii si a capacitatii osteoinductive a doua tipuri principale de biomateriale: **materiale cu structura tridimensioanala** formate din colagen:sericina Coll:Ser = 100:20 si Coll:Ser = 100:40 (Coll:Ser) si colagen:sericina:hidroxiapatita (Coll:Ser:HA) Coll:Ser:HA = Coll 1.2%:Ser 20%:HA30% si Coll:Ser:HA = Coll 1.2%:Ser 40%:HA30% furnizate de P3 precum si



UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

colagen:sericina:ceramici bioactive (Coll:Ser:B30%) realizate de P3 impreuna cu P6 si materiale alcatuite din *polimeri sintetici* - poliuretan (PU) si polietilen glicol (PEG) *cu diferite concentratii de Zn* precum si un tip de biosticla cu urmatoarea compozitie $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ furnizate de P6. In vederea validarii biocompatibilitatii si a capacitatii osteoinductive a acestor materiale au fost utilizate o linie stabilizata de celule umane osteoblast-like MG63 cu caracteristici specifice osteoblastelor aflate in stadiile initiale de diferentiere precum si celule din măduva osoasă umană (*hMSC*) recoltate de la pacienti. Au fost realizate studii de colonizare si morfologie celulara, proliferare si diferentiere.

Pentru probele furnizate de P3, respectiv P3 in colaborare cu P6 s-au efectuat studii de colonizare, morfologie celulara, proliferare si diferentiere utilizandu-se initial linia MG63. Mai apoi in urma rezultatelor obtinute au fost selectate materiale care au fost ulterior testate cu celule din măduva osoasă umană. S-a constatat prin efectuarea testului MTT ca toate suporturile testate au sustinut respiratia celulara, fiind din acest punct de vedere citocompatibile cu celulele osteoblast-like. Desi proliferarea celulara a fost redusa in cazul materialelor 3D de Coll:Ser:B, celulele au evidentiat activitate ridicata pentru fosfataza alcalina (FA), enzima (marker al osteoblastelor) implicata in procesul de mineralizare, rezultat care poate fi explicat prin faptul ca odata cu inceperea diferentierii proliferarea celulara scade. Astfel putem concluziona ca probele pe baza de ceramici bioactive sustin viabilitatea celulara insa probabil induc o diferentiere prea rapida a celulelor, acestea neputand sa se multiplieze suficient inainte de a intra in procesul de diferentiere. Din acest motiv s-a renuntat la testarea biocompatibilitatii acestora cu hMSC. Diferentiere celulara cu activitate ridicata pentru FA precum si aparitia expresiei genice pentru osteocalcina si sialoglicoproteinelor osoase (BSPII) a fost inregistrata in cazul celulelor cultivate pe suporturile de Coll:Ser:HA. Celulele stem umane prezinta viabilitate crescuta pe matricile de Coll:Ser:HA, aditia HA inducand cresterea semnificativa a viabilitatii celulare imbunatatind totodata si proliferarea. Odata cu scaderea proliferarii apare o crestere a activitatii enzimatice a fosfatazei alcaline, astfel ca cea mai crescuta activitate enzimatica a fost inregistrata in cazul celulelor cultivate timp de 7 zile pe matricile de Coll:Ser40% precum si pe cea de Coll: Ser40%:HA. Comparativ cu celulele martor (cele nediferentiate, cultivate 11 zile in mediul fara agenti de diferentiere) s-a observat o crestere a expresiei genice pentru osteocalcina in cazul celulelor diferentiate pe matricile Coll:HA, Coll:Ser20% precum si aparitia expresiei genice in celulele cultivate pe Coll:Ser20%:HA. In cazul matricei de Coll:Ser40%:HA nu a fost identificata expresie genica pentru OC; probabil concentratia crescuta de sericina determinand o diferentiere accentuata a celulelor care totodata induce si moartea acestora. Nu a fost identificata expresie genica pentru osteonectina si sialoglicoproteinele osoase nici in celulele nediferentiate si nici in cele diferentiate. Urmeaza ca aceste teste sa fie efectuate si cu alte celule stem umane prelevate de la un alt pacient deoarece nici in cazul celulelor martor (celule cultivate pe godeu de polistiren) aceste gene nu s-au exprimat.

Pentru validarea biocompatibilitatii si a capacitatii osteoinductive a probelor de biosticla ata a celei de CaPHA cat si a celor de PU si PEG cu diferite concentratii de Zn s-a intrebuintat linia MG63. In cazul biosticelilor de CaPHA s-a constatat ca acestea au fost citocompatibile cu celulele liniei



UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

MG63 însă nu au indus diferențierea acestor celule către osteoblaste mature, fapt dovedit de cuantificarea activității enzimice a fosfatazei alcaline. În cazul probelor de PU și PEG cu diferite concentrații de Zn s-a observat că acestea sunt citocompatibile cu celulele osteoblast-like, însă datorită compoziției neomogene a probelor de PU și PEG este greu de apreciat viabilitatea, proliferarea și diferențierea celulară. În urma experimentelor de microscopie de fluorescență s-a constatat că celulele nu sunt uniform repartizate la nivelul suprafețelor, fiind concentrate în clustere în anumite zone care probabil coincid cu prezența ionilor de Zn. Distribuția celulelor necrotice a fost semnalată cu precădere în interiorul clusterelor datorită unei oxigenări insuficiente, celulele de la marginea clusterului fiind viabile.

P3 – UNIVERSITATEA POLITEHNICA BUCUREȘTI – FACULTATEA DE CHIMIE APLICĂȚĂ ȘI ȘTIINȚA MATERIALELOR

a realizat **suporturi polimerice sub forma de filme și membrane, hidrogeluri sau rețele 3D poroase** obținute din diverse componente naturale polimerice (colagen, sericina, acid hialuronic, condroitin sulfat) sau minerale (nano-hidroxiapatita și bioceramica activă furnizată de partenerul P6) care au fost caracterizate complet din punct de vedere fizico-chimic (FTIR, XPS), termic (DSC și TGA/DTG), morfologic (SEM, absorbție de apă – cinetică și la echilibru), mecanic, al biodegradabilității și eliberării de proteină. Dintre toate probele sintetizate și caracterizate, P3 a selectat pentru testare biologică mai multe tipuri de suporturi polimerice cu proprietăți adecvate obiectivelor propuse în anul 2012.

Astfel, în vederea realizării **obiectivului 1 (activități 1.1, 1.3, 1.5)** al proiectului, **P3 a realizat** mai multe serii de **suporturi utilizabile în ingineria țesutului osos**. În urma analizelor fizico-chimice, termice, morfologice și mecanice efectuate de P3 pe suporturile polimerice sub forma de filme și membrane, hidrogeluri sau rețele 3D poroase au fost selectate 9 tipuri de suporturi superporoase liofilizate. Acestea au avut la baza **colagen (1,2%), colagen-sericina (Coll:SS – 100:20 și 100:40), colagen-sericina-hidroxiapatita (Coll:SS:HA – 100:0:30, 100:20:30 și 100:40:30) și colagen-sericina-ceramică bioactivă (Coll:SS:HA – 100:0:30, 100:20:30 și 100:40:30)** și au fost furnizate **către partenerul P2 cu scopul evaluării proprietăților biologice și a utilizării acestora pentru ingineria țesuturilor osoase**.

În cadrul **obiectivului 3**, P3 s-a implicat activ în activitățile **3.1, 3.2, 3.4 și 3.5** prin sintetizarea și caracterizarea unor hidrogeluri binare și / sau ternare care au fost **furnizate către P1** în vederea efectuării de teste biologice specifice. Suporturile poroase sub forma de hidrogeluri au avut la baza 4 biopolimeri: colagen, sericina, acid hialuronic și condroitin sulfat, în diferite concentrații. În urma analizelor efectuate s-au selectat 5 compoziții de hidrogeluri, astfel: **colagen-sericina (Coll:SS – 100:40), colagen-sericina-acid hialuronic (Coll:SS:AH - 100:40:10 și 100:40:5) și colagen-sericina-condroitin sulfat (Coll:SS: CHS - 100:40:10 și 100:40:5)**. Hidrogelurile 3D au fost trimise **către partenerul P1 pentru evaluarea proprietăților de biocompatibilitate și a utilizării acestora pentru ingineria țesuturilor cartilajinoase**.

P4 – UNIVERSITATEA POLITEHNICA BUCUREȘTI – CENTRUL DE PROTECȚIA MEDIULUI ȘI TEHNOLOGII ECOLOGICE. Corespunzător temei propuse pentru etapa 2012,



UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

obiectivele împreuna cu activitatile la care a participat P4 in aceasta etapa s-au axat cu precadere pe activitatile **1.4. Procesarea unor aliaje metalice in vederea cresterii biocompatibilitatii lor prin** "Determinarea biocompatibilitatii electrozilor modificati pe aliaj Ti prin capacitatea de a forma fosfati in solutie SBF, -pentru structuri de nanotub, pentru acoperiri polimerice hibride, pentru electrozi modificati prin ablatie laser. si pentru suprafete modificate prin adaos de nanoparticole". Contributia P4 in etapa III a proiectului PCCE248/2010 a constat in realizarea in totalitate a activitatilor prognozate si prin publicarea in reviste ISI cu factor de impact cumulat corespunzator echipei > 8. Raportul a analizat determinarea biocompatibilitatii electrozilor modificati pe baza aliaj Ti prin capacitatea de a forma fosfati in SBF pe baza conceptului Kokubo asupra bioactivitatii materialelor. Avand in vedere ca in 2012 conceptul a fost revizuit de Kokubo, capitolul introductiv a raportului este o trecere in revista a lucrarilor care au stat la baza conceptului pentru a putea aborda activitatile prezentei etape la nivelul anului 2012. Kokubo a indicat initial reactia chimica de formare a apatitei la suprafata ceramicii vitroase precum si efectul catalitic al gruparilor care nucleaza apatita introducand notiunea de metal bioactiv care s-a aplicat Ti in ciuda conceptiei care include metalele in categoria materialelor bioinerte. Testul a fost completat in 2012 cu limitarea ca s-a observat formare de apatita pe suprafata metalului in SBF, numai in conditiile in care metalul (Ti) a fost expus solutiilor cu un pH < 1.1 ori >13.6; formarea de apatita in cazul solutiilor puternic acide sau alcaline a fost atribuita valorii pozitive sau negative a sarcinii la suprafata. Raportul priveste testul prin prisma efectului de imbunatatire a efectului protector a stratului format.

Electrozi modificati prin formare structuri de nanotub. O prima parte a investigatiilor s-a axat pe obtinerea unor anume morfologii de nanotub (diametre intre 20-40 nm si lungimi 0,4-0.85 μm) de imersat in SBF prin selectarea conditiilor de anodizare. O noutate obtinerea de straturi multiple de nanotuburi. Conform parametrilor electrochimici obtinuti (Tafel), imersarea pe perioade diferite in SBF duce la strate de protectie diferite si poate constitui un tratament de sine statator. Au fost identificati si parametrii circuitului electric echivalent (EIS) iar parametrii obtinuti prin fitare au indicat un caracter pseudo-capacitiv al stratului poros de oxid si al stratului bariera.

Electrozi modificati prin ablatie laser. S-au selectat 2 conditii A si B de de modificare cu laser cu viteze de scanare 10 $\mu\text{m}/\text{sec}$; capacitate de: 30% si respectiv 5 $\mu\text{m}/\text{sec}$; capacitate de: 20%. S-au caracterizat noile structuri obtinute la timpul initial si dupa 28 zile imersie in SBF. **Metodele de caracterizare a suprafetei au inclus 1) Microscopia de Forță Atomică (AFM) 2) Analiza spectrofotometrică în infraroșu cu transformata Fourier (FT-IR) cu care s-a caracterizat structura moleculară a acoperirilor cu apatita de pe aliajul Ti6Al7Nb tratat si netratat, 3) Analiza unghiului de contact si 4) Microscopia Electronică de Baleiaj (SEM)** Dupa 13 zile imersare in SBF cele trei suprafete studiate prezinta structuri caracteristice apatitei. In cazul aliajului tratat in conditiile A, gradul de acoperire a suprafetei cu apatita este mai mare fata de suprafata tratata in conditiile B, iar suprafata aliajului netratat are gradul de acoperire cu apatita cel mai redus si este mai putin stabila electrochimic.



UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

Structuri de polipirol (PPy) pe Ti6Al7Nb și caracterizarea lor la 28 zile imersie in SBF.

Dupa 28 de zile imersie in SBF toti parametri de coroziune sunt imbunatatiti: rezistenta de polarizare (R_p) este marita cu doua ordine de marime fata de timpul initial, potentialul de coroziune (E_{cor}) este deplasat in domeniu mai electropozitiv, iar densitatea de curent (i_{cor}) si viteza de coroziune (V_{cor}) sunt mai mici. Valoarea impedantei corespunzatoare filmului de PPy este mai ridicata datorita formarii apatitei pe suprafata.

Suprafete modificate prin adaos de nanoparticule. Nanoparticulele care au fost adaugate pe suporturi pe baza de Ti si a caror biocompatibilitate a fost urmarita in aceasta etapa au fost cele de Ag care au si efect antibacterian. In acest scop s-a depus hidroxiapatita pe suport de TiAlZr si apoi au fost introduse nanoparticulele de Ag. Acoperirea obtinuta a fost analizata prin TEM, SEM, FT-IR si electrochimic. Concomitent s-a urmarit efectul antibacterian in contextul incercarii de optimizare a bioperformantelor. Investigatia a fost deosebit de complexa si cercetarile au subliniat meritele si nemeritele in performanta acestor noi tipuri de acoperiri nAg-HA datorita prezentei HA si a nanoparticulelor de Ag.

P5 – INSTITUTUL DE CHIMIE FIZICĂ "ILIE MURGULESCU" a fost implicat in activitatea **1.5.d. Stabilirea prin metode electrochimice a comportării pe termen lung a filmelor obținute pe suporturi de Ti și TiAlV.** Curbele de voltametrie ciclică dovedesc îmbunătățirea comportării biomaterialelor în timp, adică stratul de HA format devine mai compact și se îngroașă în timp, deci este mai bioactiv. Spectrele Nyquist arată o comportare capacitivă, un strat protector foarte rezistent. Impedanța crește cu timpul de imersie, deci crește și grosimea filmului de HA. **1.5.g. Caracterizarea morfologică pe termen lung cu metoda SEM a suprafețelor activate pe suporturi Ti și TiAlV.** Studiul SEM a relevat îngroșarea acoperiri de HA de pe suprafața titanului și a aliajului Ti-6Al-4V după imersie timp de 3000 ore în soluțiile fiziologice. Acoperirile s-au compactizat, au un aspect omogen indicând un strat gros bidimensional cu particule rotunde și pori cu diametre de circa 100-250 nm.

1.5.j. Comportarea pe termen mediu prin metode electrochimice a filmelor obținute pe suporturi de TiNbZrTa. Pentru aliajul acoperit, toți parametri electrochimici au devenit mai favorabili în timp ca rezultat al depunerii de noi straturi protectoare de HA. Spectrele EIS confirmă abilitatea de a stimula formarea de HA, deci bioactivitate, osteoinducție și osteoconductivitate ridicate ale acoperirii. **1.5.l. Caracterizarea morfologică pe termen mediu cu metoda SEM a suprafețelor activate pe suporturi de TiNbZrTa.** Modificări importante ale morfologiei acoperirii au rezultat după 2000 h: nanocristalele de HA au căpătat formă sferică cu morfologie spon-gioasă cu diametre de ≈ 60 nm, indicând că a avut loc un proces de creștere graduală de HA.

P6 – UNIVERSITATEA BABES BOLYAI CLUJ NAPOCA a realizat sinteza unor sticle oxidice in sistemul ternar pe baza de zinc-calcium-fosfor prin metoda clasica a subracirii topiturilor, si au fost caracterizate prin difracție de raze X, microscopie electronica de baleiaj, analiza elementala prin spectroscopia de dispersie de raze X după energie, spectroscopie in infrarosu si spectroscopie Raman. S-a urmarit stabilirea particularitatilor structurale ale acestui sistem, dat fiind faptul ca inca nu este pe deplin elucidat efectul zincului in medii biologice, in special in cazul sticlelor considerate pentru refacerea tesutului osos. Reactivitatea probelor a fost testata in fluid biologic simulat. Formarea stratului bioactiv de hidroxiapatita a fost corelata cu concentratia de zinc si modificarile



UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

structurale induse de cresterea progresiva a continutului sau in matricea calco-fosfatica. Aceste modificari determinate de bioactivitatea probelor sunt bine evidentiate si in difractogramele de raze X, spectrele in infrarosu si spectrele Raman. De asemenea, au fost studiate nanocompozite obtinute din faza anorganica aluminosilicata preponderent caolinitica si alcool polivinilic. Atasarea proteinelor de aceste compozite s-a urmarit prin spectroscopie fotoelectronica de raze X (XPS) si spectroscopie in infrarosu cu transformata Fourier (FTIR). Compozitele au fost sintetizate urmand metoda intercalarii in solutie (compozit_{sol}) si metoda amestecului mecanic (compozit_{mm}). Rezultatele XPS au indicat dispunerea semnificativa a polimerului intre straturile silicaticice. Atat datele XPS cat si cele FTIR au aratat ca atasarea proteinei se produce mai rapid pe probele sintetizate prin metoda intercalarii in solutie, aparand un efect de saturare dupa 2 ore de imersie in mediul biologic simulat in care au fost testate, pe cand in cazul probelor obtinute prin amestec mecanic atasarea s-a prelungit la 24 ore. Componentele obtinute in urma deconvolutiei acestor spectre indica diferite tipuri de legaturi stabilite conform energiei de legatura (BE). Aceste rezultate spectroscopice recomanda nanocompozitele cercetate, obtinute din faza anorganica aluminosilicata preponderent caolinitica si alcool polivinilic, pentru considerarea lor in aplicatii biomedicale.

P7 – INSTITUTUL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU CHIMIE ȘI PETROCHIMIE – ICECHIM

S-au studiat posibilitatile de alterare a balantei hidrofil – hidrofob specifica solutiilor unui biopoliaminozaharid natural in vederea generarii unei tranzitii sol-gel pentru obtinerea unor hidrogeluri pH si termosensitizate destinate regenerarii tesutului cartilajinos. S-a studiat posibilitatile de realizare a unor hidrogeluri pe baza de chitosan, la temperatura fiziologica de 37 °C, la un pH variabil intre 6.9 si 7.4 in aprox.3 ore. Alte conditii urmarite au fost ca hidrogelurile sa aiba o consistenta variabila, de la situatia sa nu fie miscibile cu mediul de cultura pana la cea in care sa fie manipulabile, sa nu fie citotoxice pentru celule si sa aiba proprietati mecanice care sa permita utilizarea in ingineria tesutului cartilajinos.

In studiile efectuate s-a urmarit sa se identifice posibilitatile de reducere a cantitatii de protonant si implicit de neutralizant cu conditia pastrarii conditiilor in care are loc tranzitia sol – gel adica 37 °C si pH= 6.9 – 7.4 .

Studiile efectuate au avut in vedere selectia noilor hidrogeluri in mai multe trepte inclusiv cea de testare a comportarii ca suport pentru cresterea celulelor. Aceasta testare a fost efectuata de coordonatorul de proiect. In prima etapa s-au eliminat toate variantele in care tranzitia sol – gel nu se producea la 37 °C si pH intre 6.9 – 7.4. Deasemeni s-au eliminat toate variantele cu consistenta in afara limitelor de interes.

Un criteriu important de selectie a noilor hidrogeluri a fost eficienta acestora ca suporturi pentru dezvoltare celulara. Rezultatele testelor de crestere celulara au demonstrat ca eficienta noilor hidrogelurilor ca suporturi 3 – D pentru cresterea celulelor este conditionata de urmatorii parametri: tipul acidului cu care se efectueaza protonarea chitosanului in solutii apoase si concentratia acestuia, gradul de indepartare a componentilor polimerici mic molecular din solutia de chitosan, concentratia



UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

si tipul sarurilor folosite pentru neutralizarea chitosanului protonat, morfologia hidrogelurilor, modul de realizare a nivelului dorit pentru proprietatile mecanice.

Un alt criteriu important de selectie a fost omogenitatea microarhitecturii porilor noilor hidrogeluri si nivelul proprietatilor elastice. S-a reusit sa se realizeze hidrogeluri cu pori sferici, uniformi, interconectati si cu dimensiuni sub 100 μm . Suporturile realizate in acest mod au asigurat bune conditii de crestere si dezvoltare celulara. Gradul de gonflare la echilibru a acestor hidrogeluri a fost de 38 – 40 % iar cel de hidratare de 83 %

Sunt in curs de efectuare studii pentru elucidarea mecanismului de reactie si de control a proprietatilor elastice si morfologice ale noilor hidrogeluri in vederea unei eficiente adecvante a proprietatilor acestora la cerintele tesuturilor cartilaginease.

-Workshop-ul PCCE248-

P1, in calitate de coordonator de proiect, a organizat workshop-ul "NOI CONCEPTE SI STRATEGII PENTRU DEZVOLTAREA CUNOASTERII UNOR NOI STRUCTURI BIOCOMPATIBILE IN BIOINGINERIE" dedicat diseminarii rezultatelor PCCE248 pe data de 13 iulie 2012, la Bucuresti, in colaborare cu partenerii din consortiu. Intalnirea a avut un caracter deosebit de constructiv, reunind la Bucuresti intreg consortiuul de parteneri pentru prezentarea rezultatelor obtinute in proiect si elaborarea unor strategii eficiente de valorificare a acestor rezultate in viitor.



UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

SITUATIA PUBLICATIILOR RAPORTATE LA ETAPA III

-Articole acceptate spre publicare in reviste cotate ISI-

- 1) Galateanu B., Dimonie D., Vasile E., Nae S., Cimpean A., Costache M., Layer-shaped alginate hydrogels enhance the biological performance of human adipose-derived stem cells, *BMC Biotechnology*, **2012**, 12:35 **IF 2,35**
- 2) Galateanu B., Dinescu S., Cimpean A., Dinischiotu A., Costache M., Modulation of Adipogenic Conditions for Prospective Use of hADSCs in Adipose Tissue Engineering, *Int. J. Mol. Sci.*, **2012**, 13, 15881-15900 **IF 2,598**
- 3) Dinescu S., Galateanu B., Albu M., Cimpean A., Dinischiotu A., Costache M., Sericin enhances the bioperformance of collagen-based matrices preseeded with hADSCs, *Int. J. Mol. Sci.*, **2012**, accepted **IF 2,598**
- 4) Lungu A., Albu M.G., Stancu I.C., Florea N.M., Vasile E., Iovu H., Innovative superporous collagen-silk sericin materials, *Journal of Applied Polymer Science*, **2012** **IF 1,289**
- 5) Zaharia C., Tudora M.R., Stancu I.C., Galateanu B., Lungu A., Cincu C., Characterization and deposition behavior of silk hydrogels soaked in simulated body fluid, *Mat Sci and Eng C*, **2012**, 3:945-952 **IF 2,686**
- 6) Ionita D., Dilea M., Titorencu I., Demetrescu I., Merit and demerit effects of silver nanoparticles in the bioperformance of an electrodeposited hydroxyapatite: Nanosilver composite coating, *J. Nanoparticle*, **2012**, 14:1152 **IF 3,287**
- 7) Mazare A., Dilea M., Ionita D., Titorencu I., Trusca V., Vasile E., Changing bioperformance of TiO₂ amorphous nanotubes as an effect of inducing crystallinity, *Bioelectrochemistry*, **2012** **IF 3,75**
- 8) Dilea M., Mazare A., Ionita D., Demetrescu I., Comparison between corrosion behaviour of implant alloys Ti6Al7Nb and Ti6Al4Zr in artificial saliva, *Materials and Corrosion*, **2012** **IF 1,077**
- 9) Mîndroiu M., Pîrvu C., Cîmpean A., Demetrescu I., Corrosion and biocompatibility of PPy/PEG coating electrodeposited on Ti6Al7Nb alloy, *Materials and Corrosion*, **2012**, 63 **IF 1,077**
- 10) Ungureanu, C., Pîrvu, C., Mîndroiu, M., Demetrescu, I., Antibacterial polymeric coating based on polypyrrole and polyethylene glycol on a new alloy TiAlZr, *Progress in Organic Coatings*, **2012**, 75(4), 349-355 **IF 1,977**
- 11) Vasilescu C., Drob S.I., Neacsu E. I., Mirza Rosca J. C., Surface analysis and corrosion resistance of a new titanium base alloy in simulated body fluids, *Corros. Sci.*, **2012**, 65 (12), 431-440 **IF 3,734**



UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

- 12) Tămășan M., Radu T., Simon V. Spectroscopic characterisation and *in vitro* behaviour of kaolinite polyvinyl alcohol nanocomposite, *Applied Clay Science*, manuscript recommended for revision **IF 2,474**
- 13) Tămășan M., Simon V., Thermal and structural characterization of montmorillonite – poly(vinyl alcohol) nanocomposites, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, **2012**, 14 (11- 12), 1053 – 1058 **IF 0,457**
- 14) Lucacel R. C., Ponta O., Simon V., Short-range structure and in vitro behavior of ZnO–CaO–P2O5 bioglasses, *Journal of Non-Crystalline Solids*, **2012**, 358:2803–2809 **IF 1,537**
- 15) Dimonie D., Gabor R., Mitran V., Vasile E., Trusca R., Petrache M., Doncea S., Fierascu R.C., Fierascu I., Nicolae C., Layered shaped alginate hydrogels for soft tissue engineering based on chemical control of the crosslinking rate, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **2012**, accepted for publication. **IF 1,2**
- 16) Dimonie D., Petrache M., Trusca R., Vasile E., Costache M., Fierascu R.C., Modulation of Iontropic Alginate hydrogel microarchitecture by controlling the crosslinker ions migration, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, **2012**, accepted for publication. **IF 1,2**

IF cumulat = 33.29

-Comunicări la conferințe naționale și internaționale-

-P1-

- 1) 3D Cell Culture 2012 DECHEMA, 13-17.03.2012, Zurich, Elvetia:
 - **Sorina Dinescu**, Bianca Galateanu, Oana Calciu, Madalina Albu, Anisoara Cimpean, Marieta Costache, 2012- Cell viability and adipogenic differentiation assessment in collagen-sericin-based 3D culture systems (poster)
 - **Bianca Galateanu**, Sorina Dinescu, Izabela Stancu, Adriana Lungu, Oana Andreea Calciu, Anisoara Cimpean and Marieta Costache, 2012- New porous interpenetrating polymeric network designed for adipose-derived stem cells 3D culture (poster)
- 2) A VIII-a Conferinta Nationala de Citometrie, 11-12.05.2012, Bucuresti:
 - **Bianca Galateanu**, Sorina Dinescu, Valentina Mitran, Oana Andreea Calciu, Patricia Neacsu, Rebeca Gustin, Anisoara Cimpean si Marieta Costache, 2012- hADSCs adipogenic differentiation potential in 3D culture systems (poster)
- 3) Al 4-lea Congres și a 30-a Sesiune Stiintifica Anuala a Societatii Romane de Biologie Celulara (SRBC), 13-17.06.2012, Satu Mare (Romania)- Debrecen (Ungaria):



UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

- **Sorina Dinescu**, Rebeca Gustin, Bianca Galateanu, Madalina Albu, Anisoara Cimpean, Marieta Costache, 2012- Late adipogenic marker perilipin expression proves hADSC's differentiation potential (prezentare orala si poster)
 - **Bianca Galateanu**, Rebeca Gustin, Sorina Dinescu, Oana Calciu, Anisoara Cimpean, Marieta Costache, 2012- PPAR γ 2 enhances adipogenesis in 2D and 3D culture systems (poster)
- 4) Workshop-ul organizat in cadrul PCCE248, 13.07.2012, Bucuresti, Romania:
- **S. Dinescu**, B. Galateanu, R. Gustin, A. Cimpean, D.Iordachescu, M. Costache, 2012- hADSC viability and adipogenic potential in collagen and collagen-sericin biomatrices (prezentare orala)
 - **B.Galateanu**, O.A.Calcu, S.Dinescu, R.Gustin, A. Cimpean, D. Dimonie, A. Lungu, I.C. Stancu, D. Iordachescu, M.Costache, 2012- Biocompatibility evaluation of new layer-shaped alginate hydrogels and gelatin-alginate-polyacrylamide hybrid matrices
- 5) 22 IUMBM and 37th FEBS Congress "From Single Molecules to Systems Biology", 04-10.09.2012, Sevilla, Spania:
- **Sorina Dinescu**, Bianca Galateanu, Rebeca Gustin, Madalina Albu, Anisoara Cimpean, Marieta Costache, 2012- Collagen-sericin 3D scaffold enhances adipogenic differentiation of hADSCs (poster)

-P2-

- 1) Workshop-ul organizat in cadrul PCCE248, 13.07.2012, Bucuresti, Romania:
1. prezentari orale:
 - **I. Titorencu**, V. Pruna, M. G. Albu, V. Jinga, M. Simionescu, "Cytocompatibility evaluation of composite collagen-sericin three dimensional scaffolds for bone tissue engineering",
 - **I. Titorencu, V. Trusca, E. Vasile**, "Changing bioperformance of TiO₂ amorphous nanotubes" A. Mazare, M. Dilea, D. Ionita (prezentare realizata in colaborare cu partenerul P4)
 2. postere:
 - **V. Pruna**, I. Titorencu, V. Trusca, V.V. Jinga, V. Simon, M. Simionescu, "In vitro bioactivity and cytocompatibility of two types of glass-ceramics with MG63 cell line"
 - **I. Titorencu, V. Pruna, V.V. Jinga, M. Simionescu**, "The relation between human osteoprogenitor cells and human endothelial cells studied in vitro in two-chambers models in normal and hypoxic conditions"
- 2) 5th International Conference "Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices" Conference, 29 august-1septembrie 2012 cu prezentarea unui poster in colaborare cu partenerul P3:
- **M.G. Albu, A. Lungu, I. Titorencu, I.C. Stancu, E. Vasile, V. Pruna, H. Iovu** "Collagen-sericin-hydroxyapatite composites for bone tissue engineering",

-P3-

- 1) 9th World Biomaterials Congress (WBC), 1-5 iunie 2012, Chengdu, China
- 2) 5th International Conference "Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices" BiomMedD'2012, 29 august – 1 septembrie 2012, Constanta, Romania;



UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

3) 6th International Meeting on Molecular Electronic, 02-07.12.2012, Grenoble, Franta

-P4-

- 1) 63rd Annual Meeting of the International Society of Electrochemistry Praga
 - **Mirela Dilea**, Daniela Ionita and Ioana Demetrescu, *Electrochemical Deposition of Organic – Inorganic Coating on Ti6Al4Zr for Medical Application.*
 - **Anca Mazare**, Daniela Ionita, Ioana Demetrescu, *Influence of anodizing conditions on morphology and stability of Ti6Al7Nb TiO₂ nanotubes obtained in organic electrolytes.*
 - **Sabina Grigorescu, Camelia Ungureanu**, Ioana Demetrescu, Patrick Schmuki *Antibacterial Activity of TiO₂ Nanotubes Formed Via Anodizing in Two Steps on TiZr Surface.*
 - **Camelia Ungureanu**, Daniela Ionita, Madalina Caposi, Ioana Demetrescu, *Corrosion aspect of TiNi in oral cavity.*
 - **Mihaela Mindroiu**, Cristian Pirvu, Ioana Demetrescu, *The apatite formation in SBF solution on TiAlNb alloys after surface modification with laser ablation.*
 - **Claudiu Constantin Manole**, Cristian Pirvu, Francis Maury, Ioana Demetrescu, *Hybrid organic/inorganic thin film of TiO₂/PPy grown through a single-step electrochemical process*
 - **Andrei Bogdan Stoian**, Daniela Ionita, Mirela Dilea, Anca Mazare, Mihaela Mindroiu, Cristian Pirvu, Camelia Ungureanu, *Processing implant metal alloy for a better antibacterial activity*
- 2) XIV IME & XVII MPES Electrochemistry & Meeting of the Portuguese Electrochemical Society, 11-14 aprilie 2012, Funchal, Portugalia
 - **M. Dilea**, A. Mazare, D. Ionita and I. Demetrescu, "IMPLANT DENTAL ALLOYS STABILITY AS A FUNCTION OF ORAL ENVIRONMENT". (POSTER)
 - **A. Mazare**, M. Dilea, D. Ioniță, I. Demetrescu, *Prezentare orală: Influence of anodizing conditions and morphology on the electrochemical behaviour of Ti6Al7Nb TiO₂ nanotubes XIV*
- 3) BiomMedD'12, 28 august-1septembrie 2012, Constanța, România
 - **A. Mazare**, M. Dilea, D. Ioniță, I. Demetrescu, *Prezentare orală: About stability in simulated body fluid of controlled diameter TiO₂ nanotubes*, International Conference "Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices "BiomMedD'2012, 29 august- 01 septembrie 2012, Constanța, România
 - **M. Dilea**, D. Ionita, C. Ungureanu and I. Demetrescu, *Performance of CoCrMo alloy coated with hydroxyapatite and/or silver nanoparticles*, International Conference "Biomaterials, Tissue Engineering & Medical Devices "BiomMedD'2012, 29 august- 01 septembrie 2012, Constanța, România
- 4) Nanomaterials for Biomedical Technologies 2012, 6 – 7 martie 2012, Frankfurt, Germania.
 - **A. Mazare**, M. Dilea, D. Ioniță, *Characterization of thermal treated TiO₂ nanotubes on TiAlNb*, NANOBIO MED 2012: Third Regional Symposium on Electrochemistry South-East Europe, 13-17 mai, 2012 Bucharest, ROMANIA.
 - **A. Mazare**, M. Dilea, D. Ionita, I. Demetrescu, *Prezentare orală: Crystallinity influence on the behaviour of tio2 nanotubes obtained on TI6AL7NB.*



UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

-P5-

- 1) 2nd International Advances in Applied Physics & Materials Science Congress
 - M. Popa, E. Vasilescu, P. Drob, J. M. Calderon Moreno, C. Vasilescu, S. I. Drob *Behaviour of some biocompatible coatings in physiological fluids*, Book of Abstracts APMAS 2012, Turkey, Paper No 181, pag. 126.
- 2) Workshop-ul organizat in cadrul PCCE248, 13.07.2012, Bucuresti, Romania
 - M.V. Popa, E. Vasilescu, P. Drob, C. Vasilescu, S. I. Drob, *Long term stability of passive film on new Ti-20Nb-10Zr-5Ta alloy surface by XPS and electrochemical methods*
 - M.V. Popa, E. Vasilescu, P. Drob, M. Popa, J. M. Calderon Moreno, C. Vasilescu, S. I. Drob, *Preparation, characterization and electrochemical behaviour of chemically deposited hydroxyapatite coating on new Ti-20Nb-10Zr-5Ta alloy*

-P6-

- 1) International conference on competitive materials and technology processes / Miskolc-Lillafüred, Hungary, October 8-12, 2012:
 - **V. Simon**, R. Ciceo-Lucacel, S. Cavalu, Surface structure and corrosion properties of calcium-phosphate glasses and vitroceraamics in simulated body fluids
- 2) NanoFormulation 2012 Conference, Barcelona, Spain, 28 May - 1 June 2012
 - **M. Tamasan**, V. Simon, Thermal and structural characterization of montmorillonite – poly(vinyl alcohol) nanocomposites for biomedical applications
- 3) EUCMOS 2012- 31-st European Congress on Molecular Spectroscopy, Cluj-Napoca, Romania, August 26-31, 2012
 - **M. Tămășan**, T. Radu, L. Țârle, V. Simon Spectroscopic investigations of protein attachment on the surface of montmorillonite – poly(vinyl alcohol) nanocomposites
- 4) 3rd TERMIS World Congress 2012; Tissue Engineering and Regenerative Medicine Vienna - Austria, September 5 - 8, 2012,
 - **E. Vanea**, C. Morar, S. Cavalu, V. Simon, Insulin entrapment and release from zinc silica microparticles

-P7-

- 1) Materials Science and Engineering Congress, 25 - 27 Sept.2012 Darmstadt, Germany
“New method to control the morphology of ionically crosslinked alginate hydrogels for soft tissue regeneration”

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

ANEXA I:
PARTENERUL P1

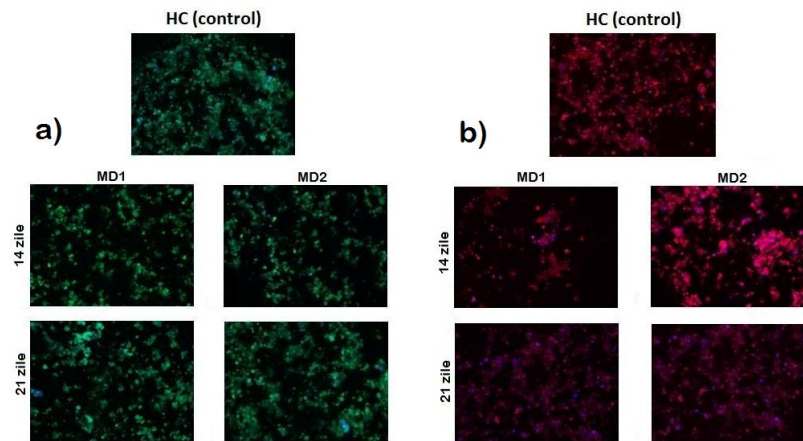


Fig. 1 : Imagini de microscopie in fluorescenta care evidentiaza (a) prezenta markerului condrogenic Matrilina1 si (b) prezenta markerului condrogenic Sox9 la 14 si 21 de zile post inductie in prezenta MD1 si MD2.

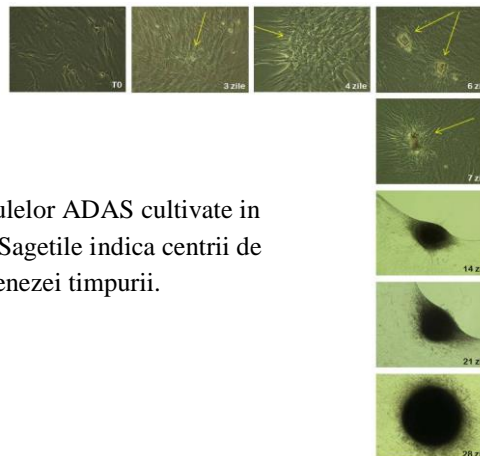


Fig. 2 : Micrografii reprezentand evolutia celulelor ADAS cultivate in sistem 2D in prezenta MD2 timp de 28 de zile. Sagetile indica centrii de condensare celulara specificei condrogenzei timpurii.

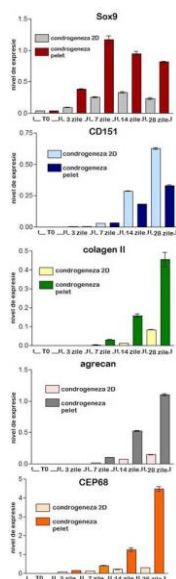


Fig.3 : Profilele de expresie genica pentru Sox9, CD151, collagen II, agrecan si CEP68 rezultate in urma reactiei RealTime RT-PCR desfasurata comparativ pentru sistemul de cultura 2D si sistemul pelet.

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

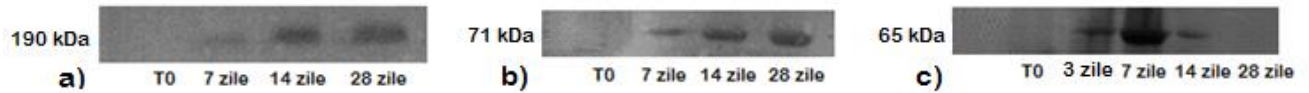


Fig. 4 : Profilul expresiei proteice obtinut prin Western Blot pentru (a) collagen II ; (b) CEP68 si (c) Sox9 pe parcursul condrogenezei induse in vitro celulelor ADAS cultivate in pelet.

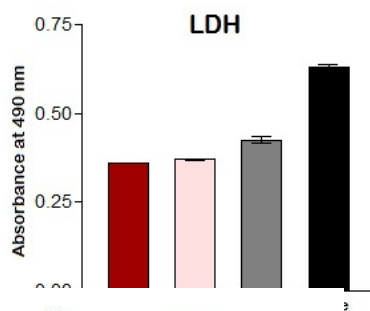


Fig. 5 : Evidentierea activitatii LDH in mediul de cultura la 2, 4, 6 si 8 zile de la insamantare pentru suporturile pe baza de chitosan.

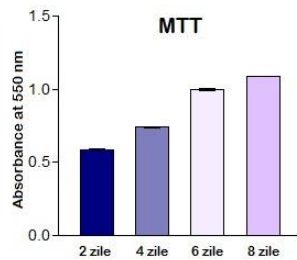


Fig. 6 : Evaluarea viabilitatii si proliferarii celulare prin testul MTT la 2, 4, 6 si 8 zile de la insamantarea celulelor ADAS pe suprafata suporturilor pe baza de chitosan

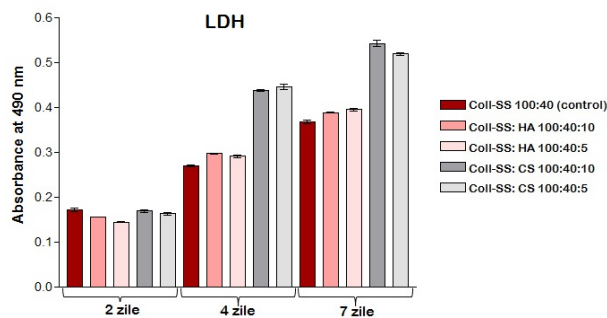


Fig. 7 : Evidentierea activitatii LDH la 2, 4 si 7 zile de cultura in cele 4 compozitii de hidrogeluri pe baza de collagen si sericina

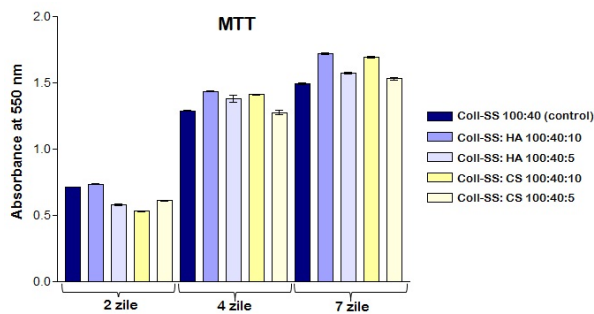


Fig. 8 : Evaluarea viabilitatii si proliferarii celulare a celulelor ADAS in contact cu cele 4 compozitii de hidrogeluri pe baza de collagen si sericina la 2, 4 si 7 zile de cultura

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

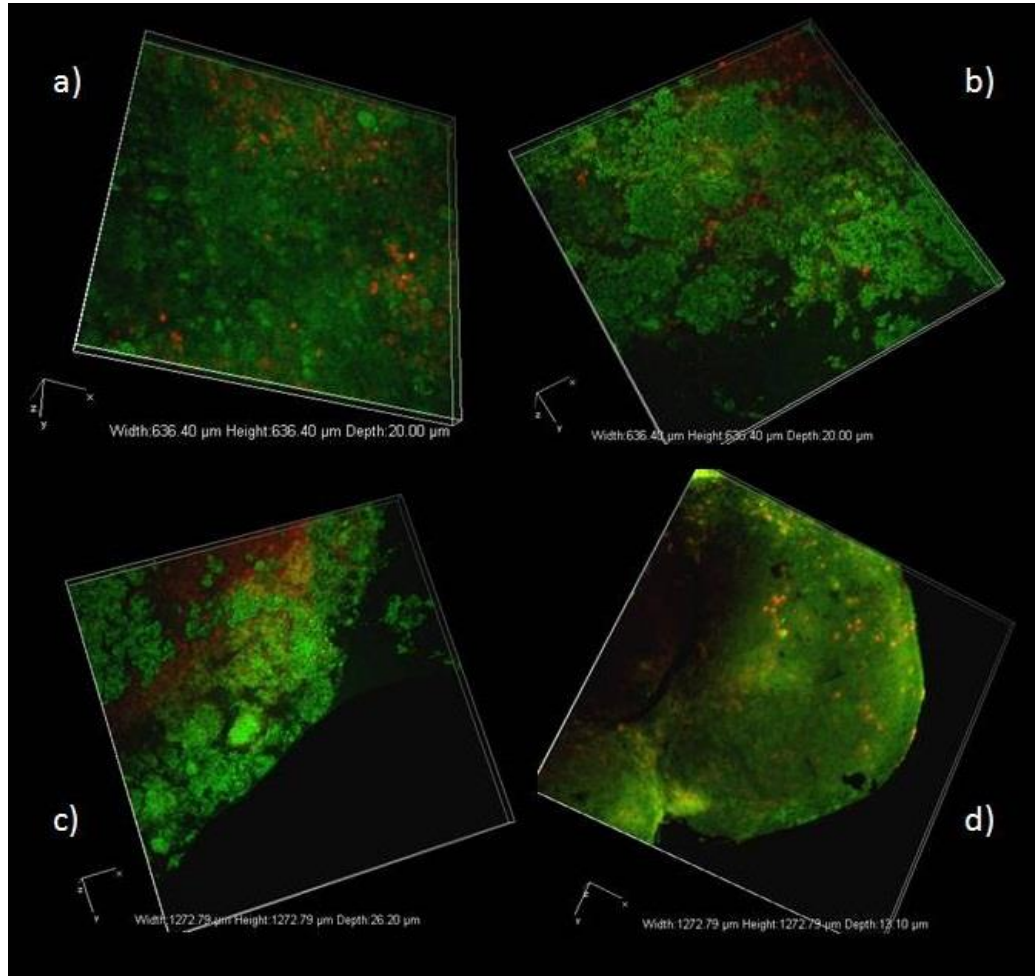


Fig. 9 : Imagini tridimensionale obtinute la microscopul confocal prin scanarea laser a peletelor obtinute din celule ADAS in cursul condrogenezei la (a) 4 zile ; (b) 7 zile ; (c) 14 zile si (d) 28 zile post inductie cu MD2.

**UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
 FACULTATEA DE BIOLOGIE**

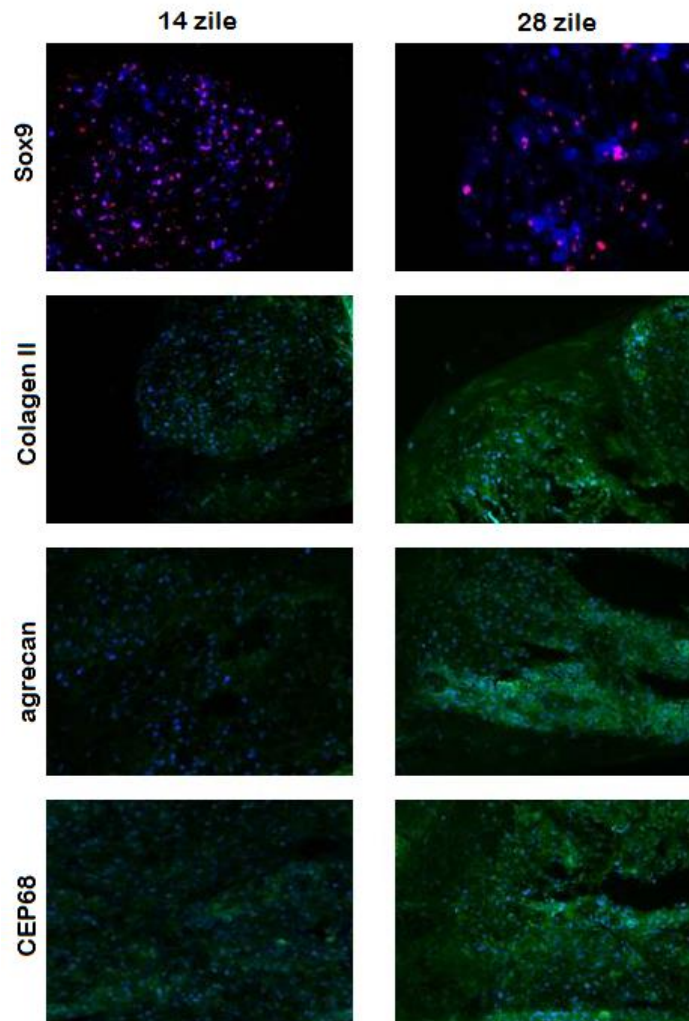


Fig. 10 : Evidențierea prin microscopie în fluorescență a expresiei markerilor condrogenici Sox9, colagen II, agrecan și CEP68 în celulele ADAS diferențiate în pelet la 14 și 28 de zile post-inducție

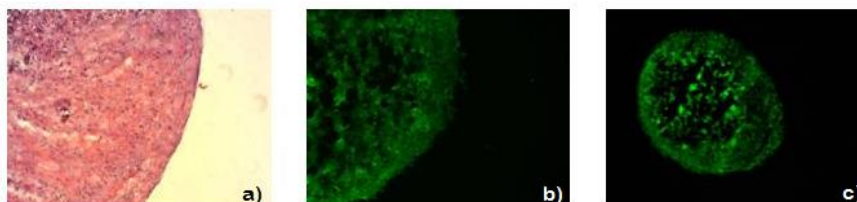


Fig. 11 : Imagini obținute prin criosecționarea peletului rezultat prin condensarea condrocitelor izolate din cartilaj uman [CONTROL] (a) colorație hematoxilina-eosina ; (b) imunomarcarea colagenului II ; (c) aspectul general al peletului de condrocite imunomarcate pentru colagen tip II, vizualizat prin microscopie în fluorescență.

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

PARTENERUL 2 PARTENERUL 3

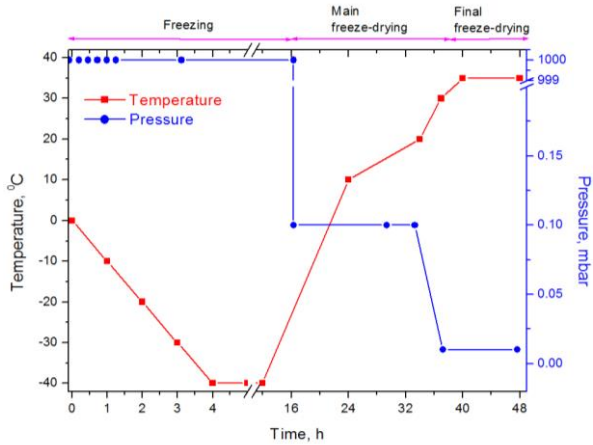


Fig. 1 : Diagrama procesului de liofilizare

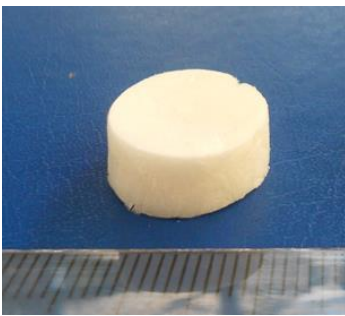


Fig. 2: Suport 3D superporos

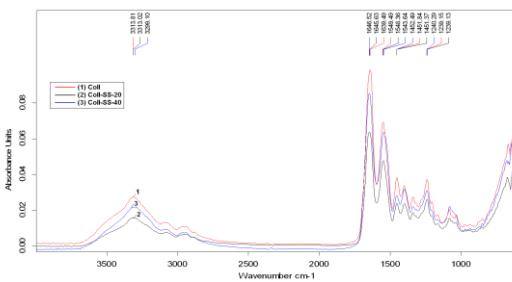


Fig. 3 : Spectrele FT-IR ale suporturilor Coll-SS

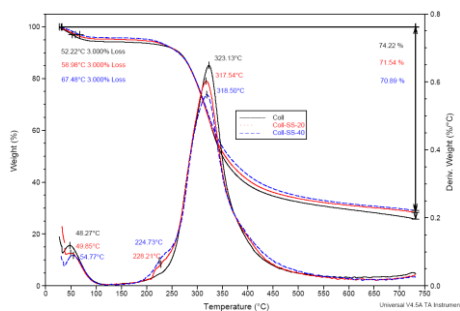


Fig. 4 : Curbele TGA și DTG pentru suporturile Coll, Coll-SS-20 și Coll-SS-40

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

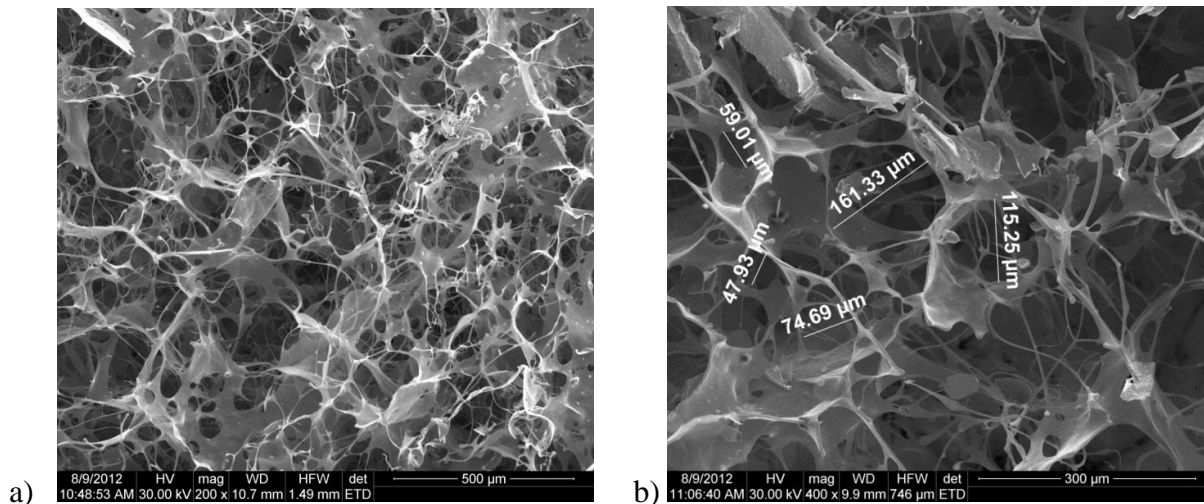


Fig. 5: Morfologie generala a suportului Coll-SS-20-HA - imagini SEM la mariri de:
a) 200 x si b) 400 x

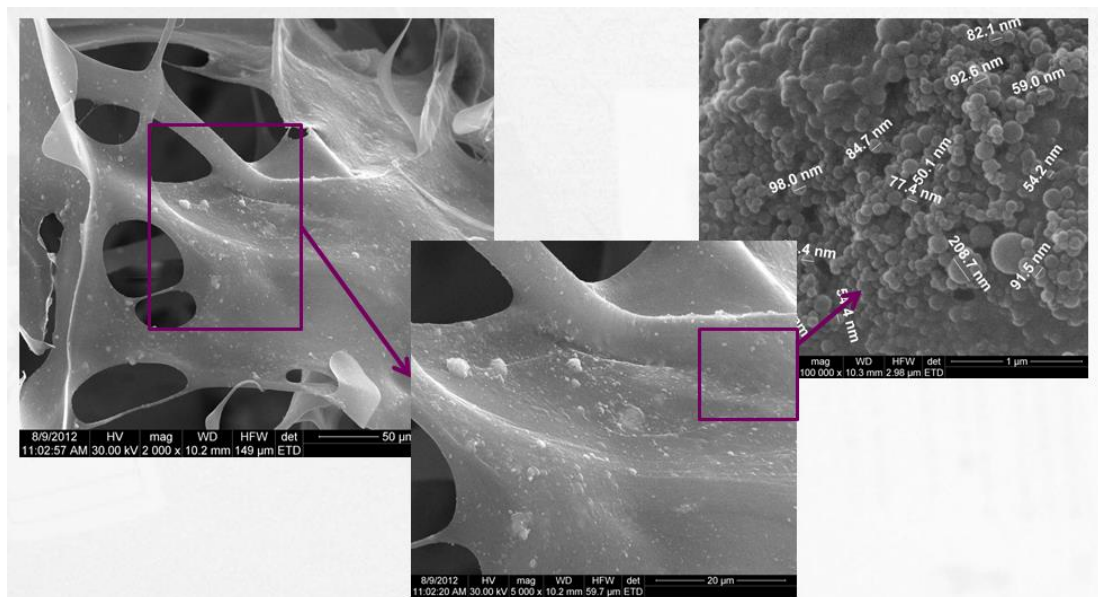


Fig. 6: Morfologie detaliata pentru Coll-SS-20-HA - imagini SEM la mariri de:
2000 x, 5000 x si 100000 x

**UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE**

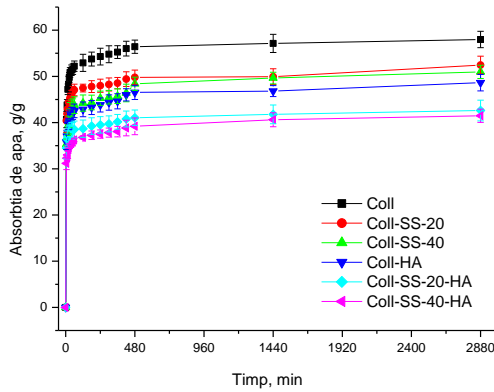


Fig. 7 : Absorbția de apă în timp pentru suporturile 3D

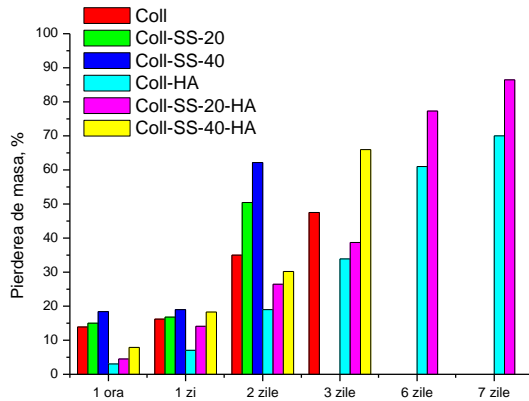


Fig. 8 : Degradarea in vitro a suporturilor 3D

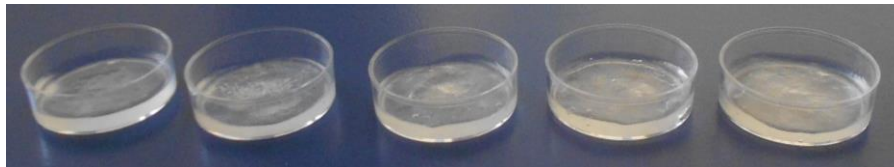


Fig. 9: Hidrogeluri 3D pentru ingineria tesutului cartilajinos

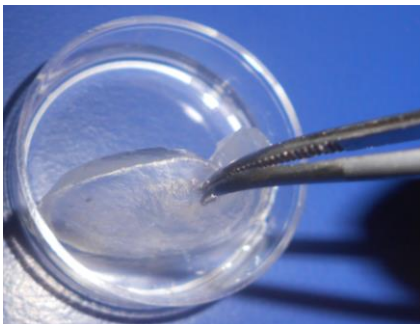


Fig. 10 : Hidrogel Coll:SS: CHS = 100:40:5

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

PARTENERUL P4

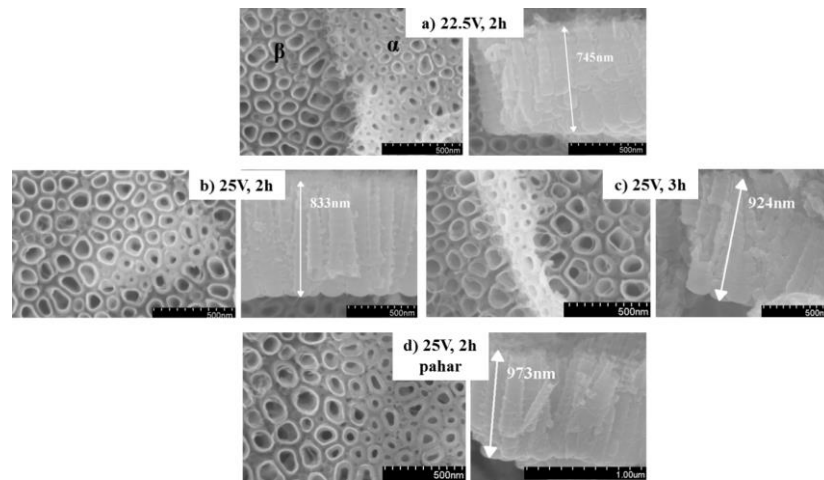


Fig. 1: Morfologii obținute pentru adaptarea nanotuburilor obținute pe Ti6Al7Nb la $d_{\text{faza } \alpha} = 78\text{nm}$, $L = 1\mu\text{m}$

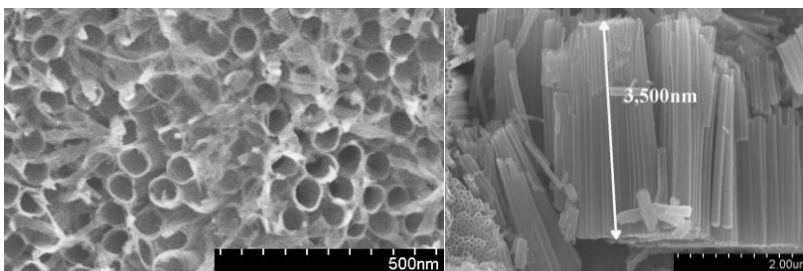


Fig. 2: Morfologia obținută pe Ti, anodizat la 50V, 15min

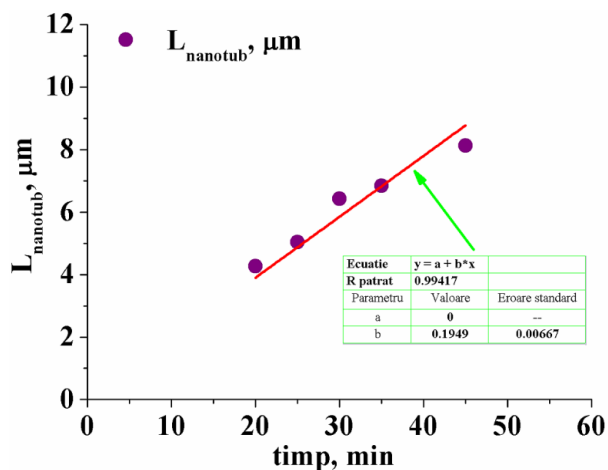


Fig. 3 : Dependenta lungimii nanotuburilor de timpul de anodizare

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

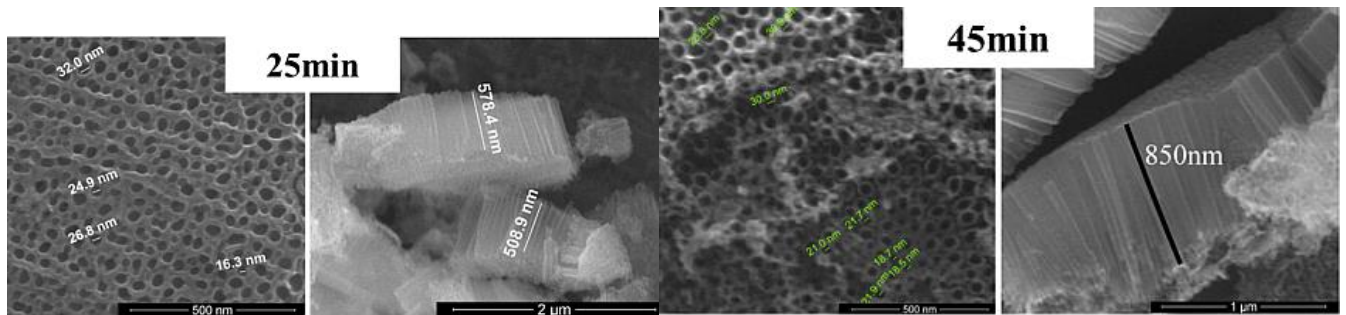


Fig. 4 : Imagini SEM cu nanotuburi obținute pe Ti6Al7Nb, anodizat la 20V
Ti/Ti6Al7Nb – nanotuburi multistrat

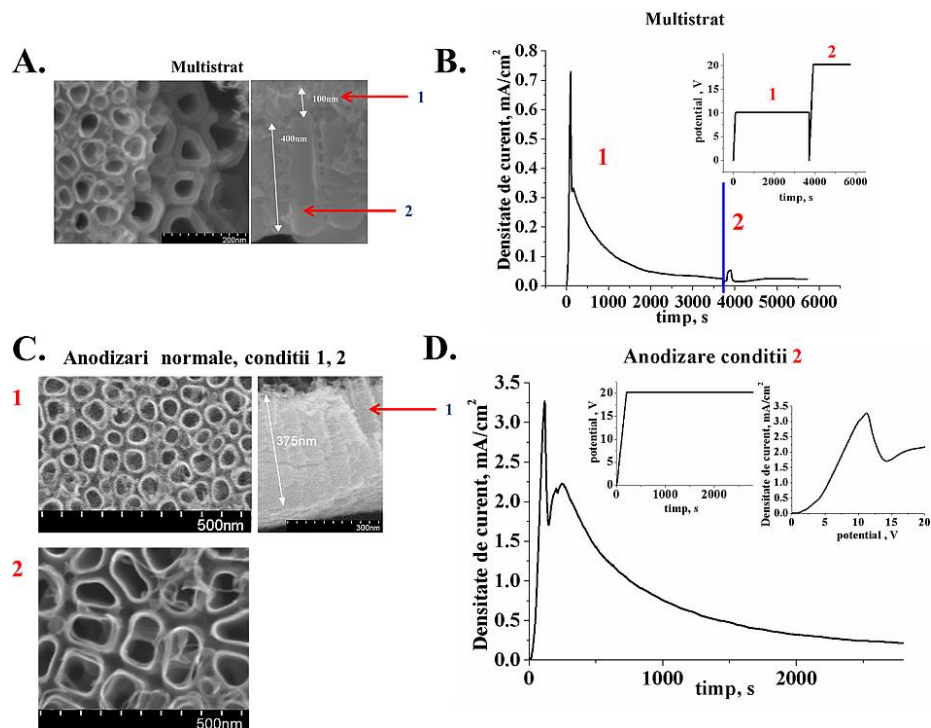


Fig. 5: Condiții de anodizare pe substrat de Ti – 10V, 1h și 20V, 45min:

A. Morfologie nanotuburi multistrat; B. Evoluția densității de curent pe parcursul timpului de anodizare pentru nanotuburile de la A., inset: variația potențialului de anodizare în timp; C. Morfologie nanotuburi obținute în condițiile de la fiecare pas; D. Evoluția densității de curent pe parcursul timpului de anodizare pentru anodizare la condițiile din pas 2 (20V, 45 min), inset: variația potențialului de anodizare în timp și variația densității de curent cu potențialul pe intervalul 0-20V cu viteza de 0.1V/s

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

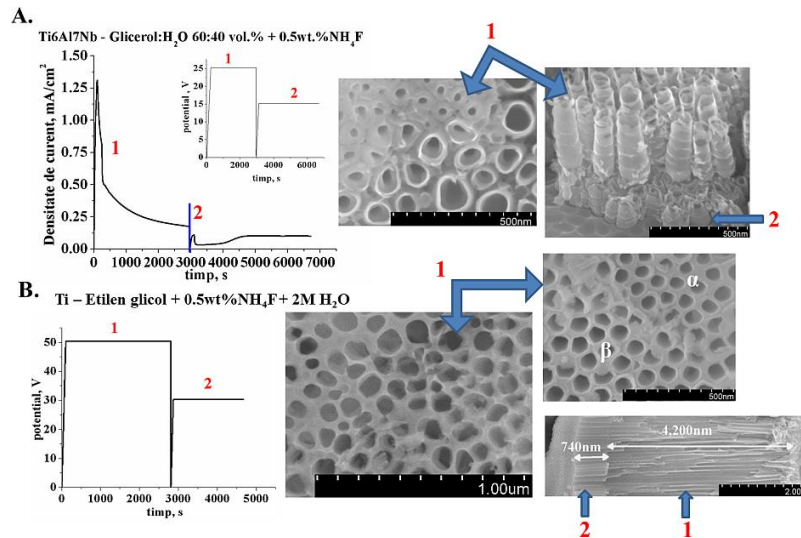


Fig. 6: Substrat de Ti6Al7Nb: A. Evoluția densității de curent pe parcursul timpului de anodizare, inset: variația potențialului de anodizare în timp și imagini SEM de suprafață și cross-sectiune pentru nanotuburi multistrat; Substrat de Ti: B. Variația potențialului de anodizare în timp și imagini SEM de suprafață la vârful stratului 1 și aproape de vârful strat 1, precum și în cross-sectiune.

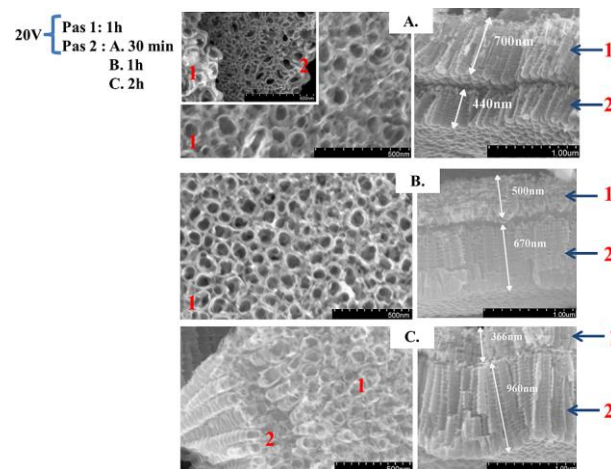


Fig. 7: Substrat de Ti: Nanotuburi multistrat obținute în electroliți diferiți prin anodizare la 20V - timp de 1h (pasul 1) apoi pentru pasul 2 s-a variat timpul de anodizare astfel A. 30min, B. 1h, C. 2h

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

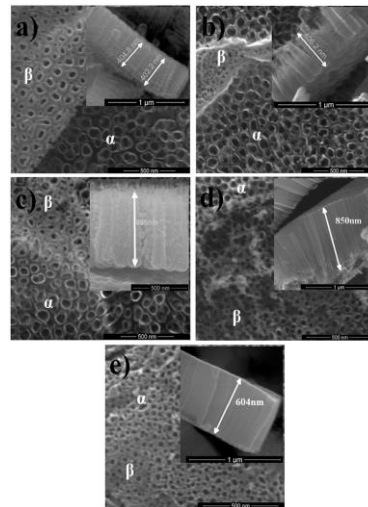


Fig. 8: Imagini SEM de suprafață și de cross-secțiune (inset) pentru: a) S1, b) S2 , c) S3 , d) S4, e) S5

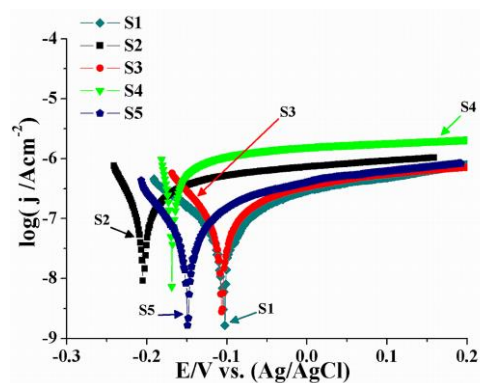


Fig. 9: Grafice Tafel pentru nanotuburile de TiO₂: a) S1 b) S2 , c) S3 , d) S4 , e) S5

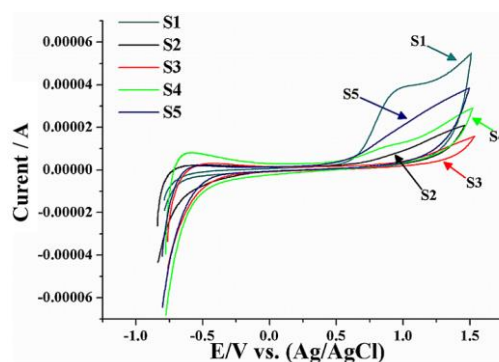


Fig. 10: Curbe de voltametrie ciclică pentru nanotuburile de TiO₂ S1-S5

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

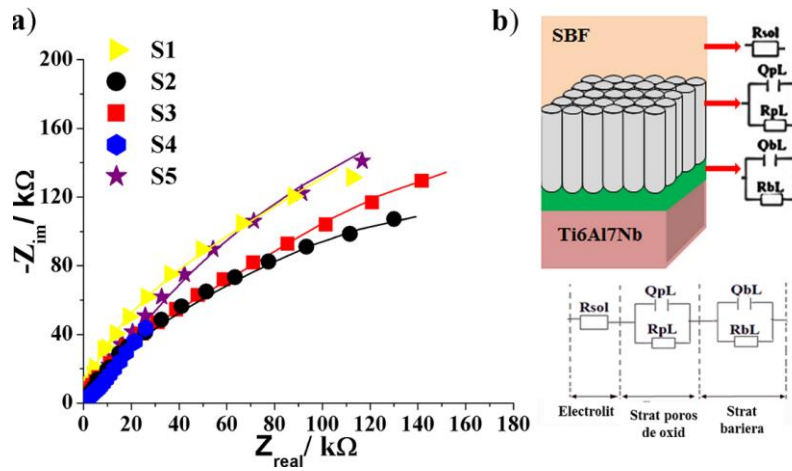


Fig. 11: Curbe Nyquist pentru probele S1-S5, b) circuitul electric echivalent

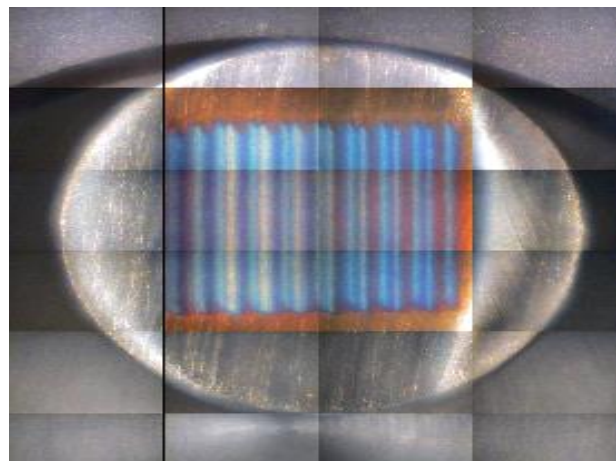


Fig. 12: Modificarea suprafetei aliajului Ti6Al7Nb prin ablație laser

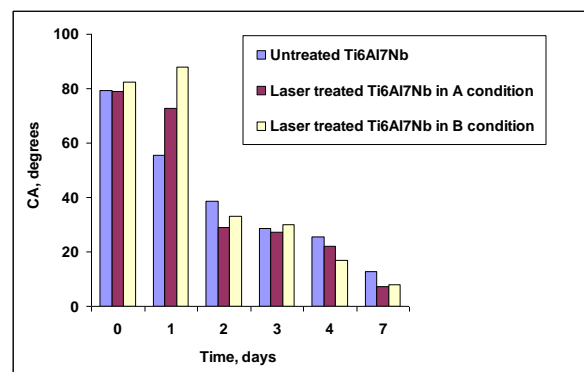


Fig. 13: Variatia unghiului de contact cu timpul de imersie in SBF

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

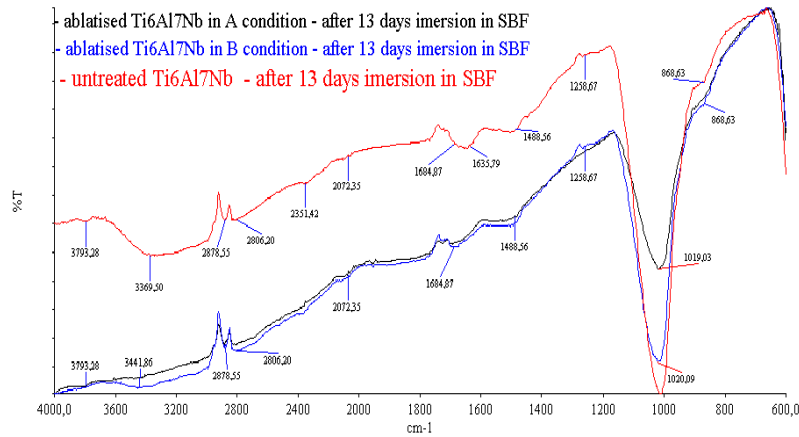


Fig. 14: Spectrele ATR/FT-IR dupa 13 zile imersie in SBF

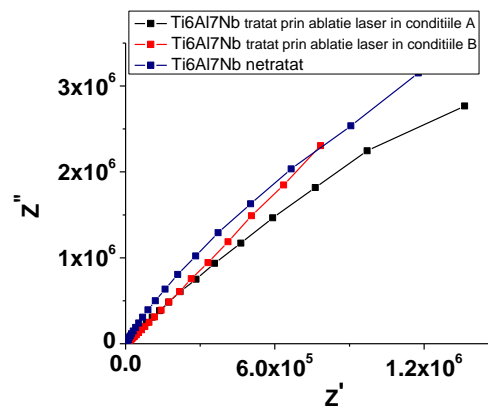


Fig. 15: Diagramele Nyquist în soluție SBF pentru Ti6Al7Nb netratat si modificat prin ablatie laser, la timpul inițial de imersie în soluție SBF

PARTENERUL 5

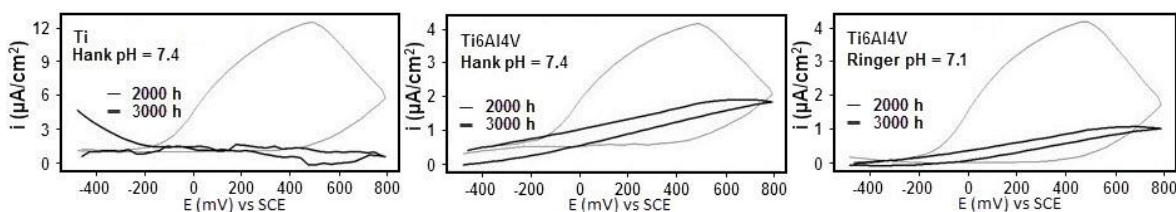


Fig. 1: Curbele de voltametrie ciclică dovedesc îmbunătățirea comportării biomaterialelor în timp, adică stratul de HA format devine mai compact și se îngroașă în timp, deci este mai bioactiv.

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

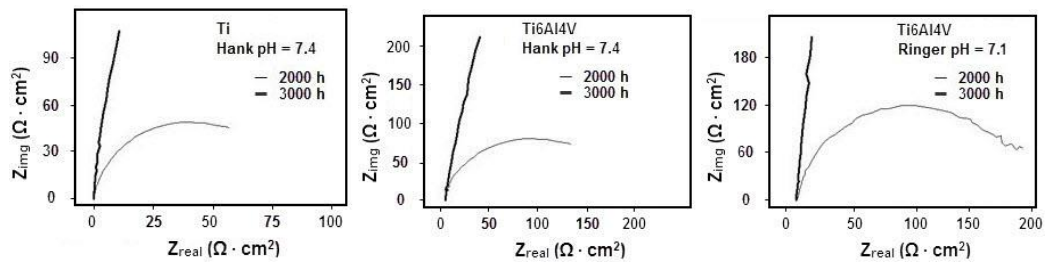


Fig. 2: Spectrele Nyquist arată o comportare capacitivă, un strat protector foarte rezistent. Impedanța crește cu timpul de imersie, deci crește și grosimea filmului de HA.

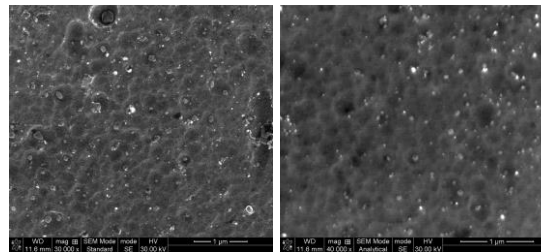


Fig. 3: Imagini SEM

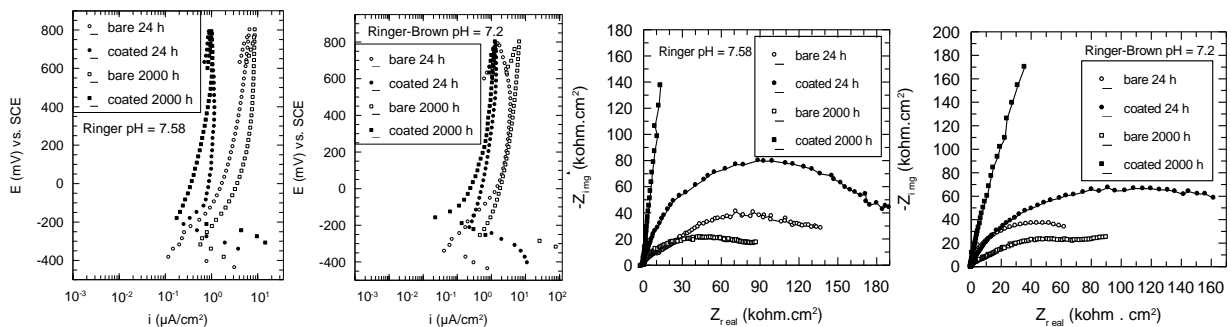


Fig. 4: Spectrele EIS confirmă abilitatea de a stimula formarea de HA, deci bioactivitate, osteoinducție și osteoconductivitate ridicate ale acoperirii.

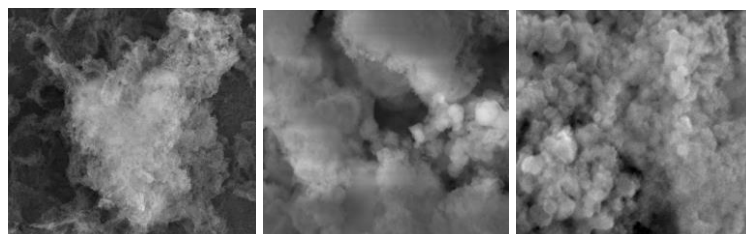


Fig. 5: Modificări importante ale morfolo-giei acoperirii au rezultat după 2000 h: nanocristalele de HA au căpătat formă sferică cu morfologie spon-gioasă cu diametre de ≈ 60 nm, indicând că a avut loc un proces de creștere graduală de HA.

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

PARTENERUL 6

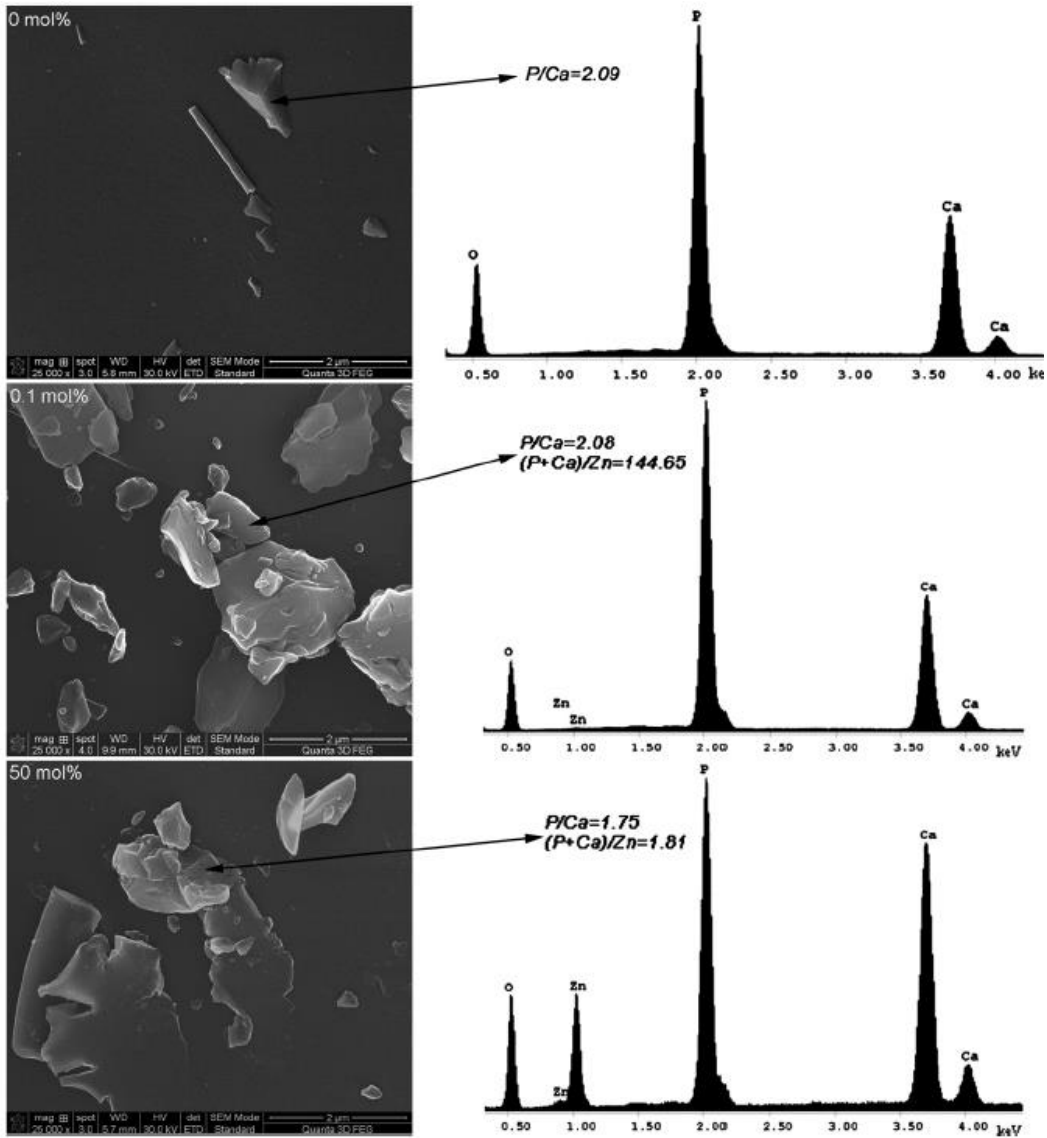


Fig. 1: Imagini SEM si analiza elementală a unor sticlele din sistemul $x\text{ZnO} \cdot (100-x)[\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5]$

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

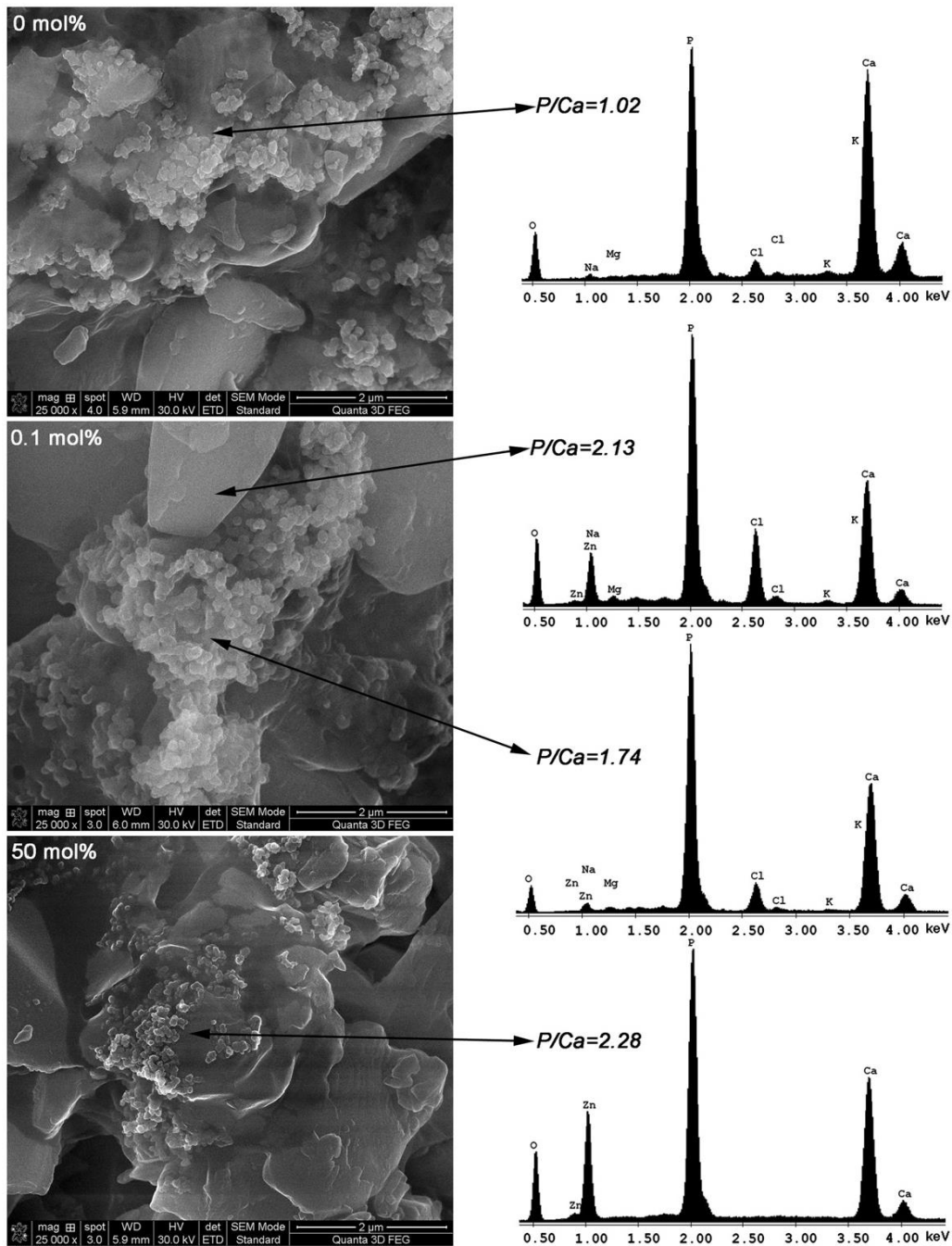


Fig. 2: Imagini SEM și analiza elementală a unor sticlele din sistemul $x\text{ZnO} \cdot (100-x)[\text{CaO} \cdot \text{P}_2\text{O}_5]$ după 15 zile de imersie în fluid biologic simulat

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

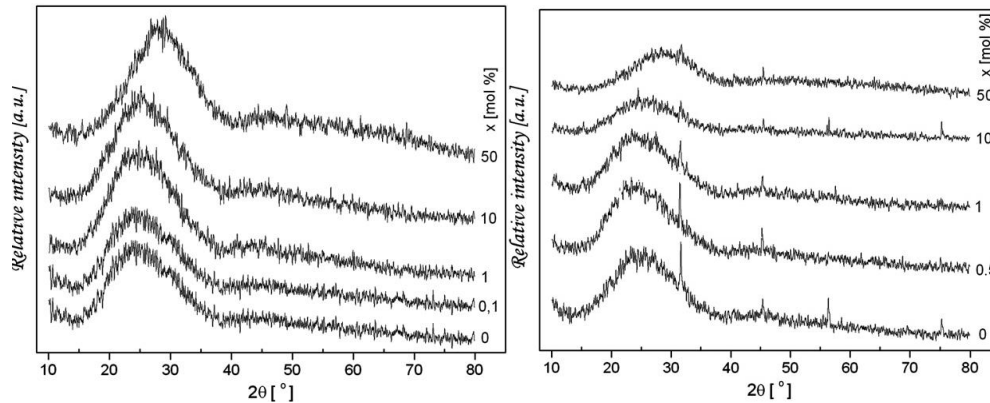


Fig. 3: Difractogramele de raze X inainte si dupa 15 zile de imersie in fluid biologic simulat

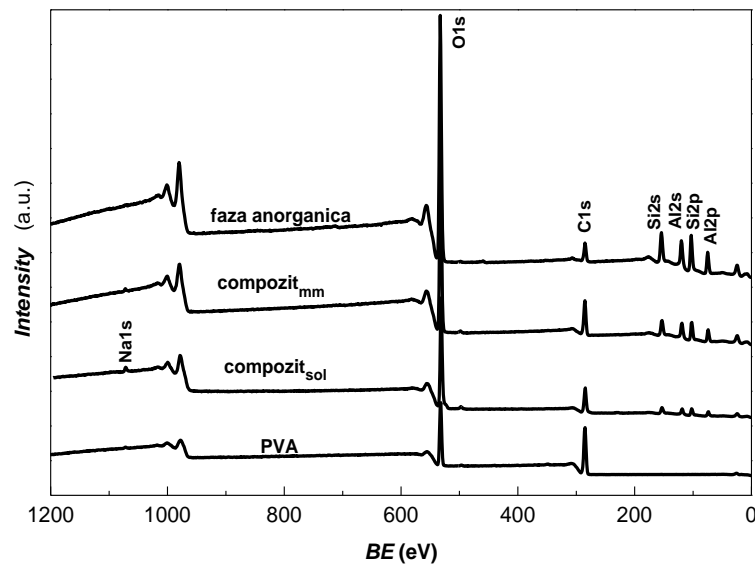
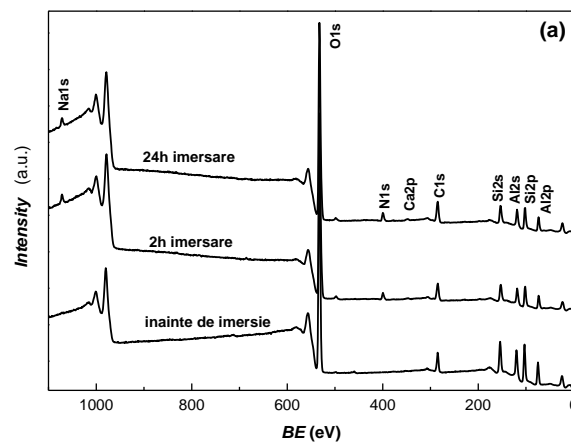


Fig. 4: Spectrele XPS survey ale celor doua faze si ale compozitelor obtinute in solutie si prin amestec mecanic inainte de imersia in fluid biologic simulat (protocol Kokubo) cu proteina (ASB)



UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

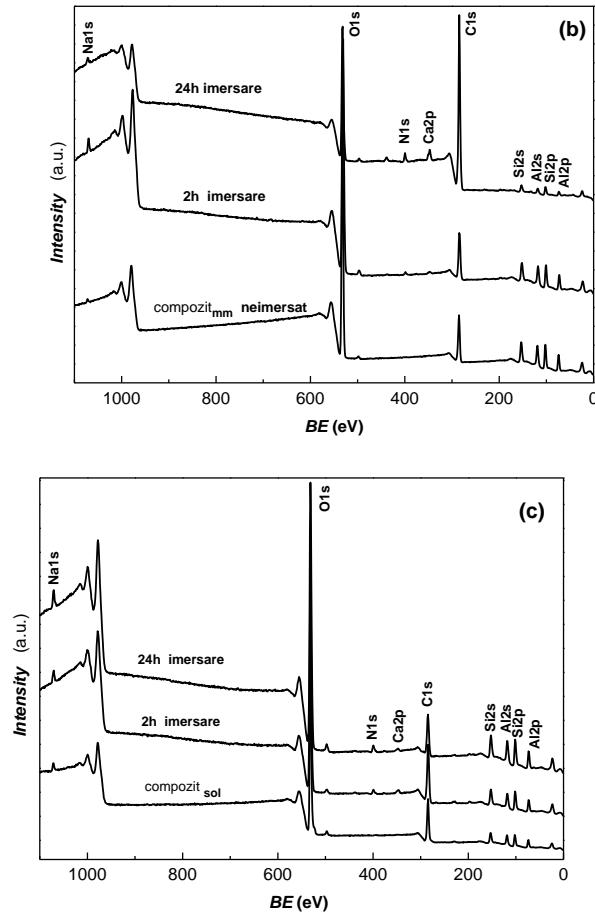
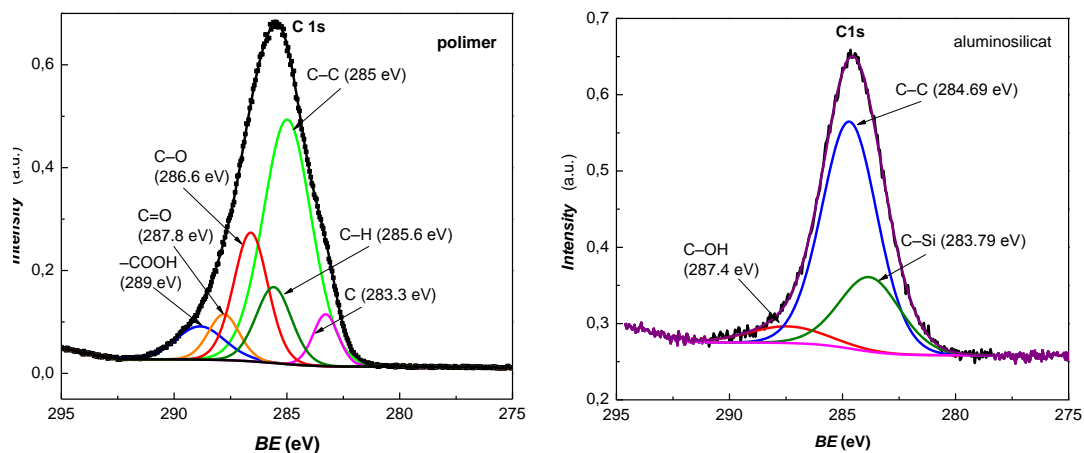


Fig. 5: Spectrele XPS survey ale fazei aluminosilicatic (a) si ale compozitelor obtinute prin amestec mecanic (b) si in solutie (c) inainte si dupa 2 si respectiv 24 ore de incubare in fluid biologic simulat la care s-a adaugat ASB



UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

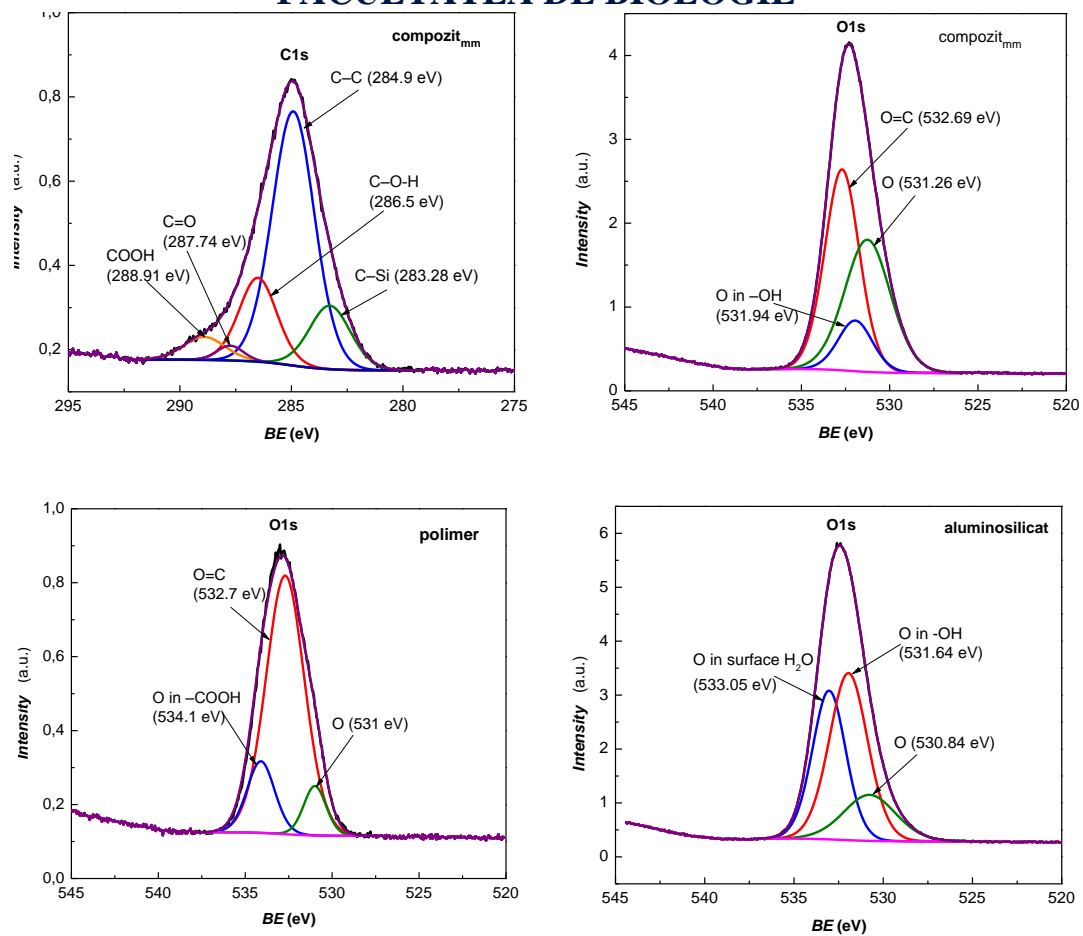
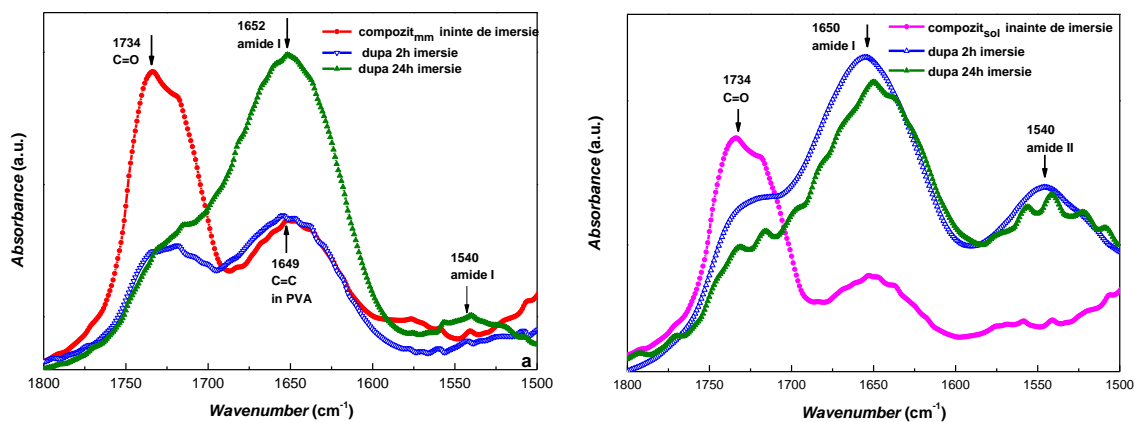


Fig. 6: Deconvolutia spectrelor de inalta rezolutie C 1s și O 1s inregistrate înainte de incubarea probelor



UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

Fig. 7: Spectrele FTIR ale celor două compozite înainte și după incubarea în fluid biologic simulat la care s-a adăugat ASB (detalii din domeniul spectral al benzilor de absorbție IR ale amidei I și II).

PARTENERUL 7

