



UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

DEPARTAMENTUL DE BIOCHIMIE ȘI BIOLOGIE MOLECULARĂ

Proiect PCCE248/2010

NOI CONCEPTE ȘI STRATEGII PENTRU DEZVOLTAREA CUNOASTERII

UNOR NOI STRUCTURI BIOCOMPATIBILE ÎN BIOINGINERIE

RAPORT ȘTIINȚIFIC CONSORȚIU

Site: www.pcce248.weebly.com

P1 – UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI și totodată coordonatorul echipei de cercetare a fost implicat în realizarea activităților 2.3, 2.4, 2.6, 2.8, 2.10 și 2.11 din cadrul **Obiectivului 2: “Dezvoltarea unor strategii de regenerare a țesutului adipos prin implantarea celulelor stem adulte derivate din țesut adipos uman (ADAS) în structuri scaffold 3-D, care mimează matricea extracelulară (ECM), destinate reconstrucției unor defecte ale țesuturilor moi (traume severe, arsuri profunde sau rezecții de tumori)”**.

În această sinteză activitățile vor fi prezentate în ordinea cronologică a desfășurării lor deoarece o parte din acestea reprezintă continuările ale activităților raportate în etapa I (2010)

Activitatea 2.6 a presupus continuarea și îmbogățirea rezultatelor obținute în etapa I, prin efectuarea unor studii de senescență și de imunofenotipare prin tehnici noi (citometrie în flux). Aceste studii au furnizat informații importante (alegerea pasajului optim de lucru cu celulele ADAS), necesare pentru realizarea în bune condiții a studiilor în sisteme 3-D.

În cadrul **activității 2.11** a fost pus în evidență profilul MMP2 prin gelatin-zimografie. Rezultatele obținute indică o creștere a activității enzimice a MMP2 excretată în mediu pe parcursul celor 21 de zile de inducție adipogenică. Pentru o mai bună înțelegere a mecanismelor care stau la baza acestei activări sunt necesare studii suplimentare de dozare a metaloproteinazelor matriciale prin ELISA, ce vor fi efectuate în etapa următoare a proiectului.

Activitatea 2.4 a jucat un rol cheie în optimizarea colaborării științifice între P1 și fiecare dintre cei doi parteneri implicați în sinteza de materiale (P3 și P7), pentru a asigura o foarte bună comunicare privind parametrii impusi de studiile *in vitro* cât și posibilitățile de punere în practică a modelelor teoretice concepute.

Un prim demers în vederea evaluării biocompatibilității și diferențierii celulare în sistemele propuse de partenerii **P3** și **P7** a fost optimizarea metodelor de însămânțare a suporturilor 3-D selectate (**activitatea 2.8**), care a constat în identificarea modalității de populare a suporturilor cu celule, a densității celulare optime la însămânțare, etc.



UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

Activitatea 2.3 a fost cea mai laborioasă datorită numărului foarte mare de probe și a variabilității metodelor și protocoalelor de testare. Cele mai promițătoare rezultate au fost obținute pentru patru sisteme care au la bază componente diferite, două de la fiecare dintre cei doi parteneri. Studiile de biocompatibilitate realizate de echipa P1 au vizat:

- i) evaluarea potențialului citotoxic al suporturilor prin cuantificarea spectrofotometrică a activității enzimei LDH eliberată în mediu de celulele cu membrana celulară deteriorată
- ii) evaluarea viabilității și proliferării celulare prin: testul MTT (cuantificare spectrofotometrică a concentrației de formazan format de celulele metabolice active și vizualizarea în contrast de fază a acestora) și prin marcarea fluorescent, simultană a celulelor vii cu calceină AM și a celor moarte cu bromură de etidiu (vizualizare prin microscopie de fluorescență și cuantificarea raportului dintre celulele vii și moarte prin citometrie în flux)
- iii) evaluarea morfologiei sistemului celule-suport prin SEM.

Performanțele biologice ale sistemelor propuse de parteneri s-au dovedit a fi superioare suporturilor control propuse în experimentele de evaluare a biocompatibilității.

Activitatea 2.8 a fost realizată utilizând structurile 3-D selectate anterior. Până în acest moment au fost finalizate studiile pe două dintre cele patru sisteme propuse: collagen (Coll-H) / collagen-sericină (Coll-Ser-H) și alginat înrețelat cu CaCl_2 (RH) / alginat înrețelat cu gluconat de Ca (CGH), câte unul de la fiecare partener implicat. Diferențierea adipogenică a fost evaluată prin evidențierea acumulării intracitoplasmice de lipide, prin colorația cu Oil Red O, și prin studiul expresiei unor markeri adipogenici cum ar fi: PPAR γ 2, aP2 și perilipină prin RT-PCR și/sau citometrie în flux. Rezultatele studiilor de evaluare procesului de adipogeneză indică o mai bună exprimare a markerilor adipogenici în Coll-Ser-H și CGH față de controalele lor Coll-H și respectiv RH. Acumularea de lipide vizualizată în urma colorației cu Oil Red este de asemenea mai evidentă și mai precoce în cazul coll-Ser-H și CGH.

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"**. În acest sens au fost testate următoarele biomateriale: i) collagen:sericină (Coll-Ser) și collagen:sericină:hidroxiapatită (Coll-Ser-HA) furnizate de P3, ii) polimeri sintetici - acid polilactic (PLA) și alcool polivinilic (PVA) și cu diferite concentrații de Ag furnizate de P6, iii) Ti și aliaje de Ti (TiAlNb) cu acoperiri de nanotuburi de TiO_2 și Glicerol: H_2O (60:40 vol. %) + 0.5 wt.% NH_4F depus la 5V, 10V, 15V și 20 furnizate de P4, iv) Ti cu depunere de hidroxiapatită (HA) furnizate de P5; v) biosticle de SiCaP și SiCaPNa-300, $56\text{SiO}_2 \cdot (40-x)\text{CaO} \cdot 4\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Ag}_2\text{O}$ furnizate de P6.



UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

Pentru studiile de colonizare, morfologie și proliferare (**activitatea 1.8**) au fost folosite liniile celulare: hFOB1.19 pentru materialele cu structură 3-D (Coll-Ser și Coll-Ser-HA) și MG63 pentru polimerii sintetici cu diferite concentrații de Ag. Rezultatele colorației Hoechst indică faptul că cel mai ridicat nivel de colonizare, atât cu celule osteoprogenitoare (hFOB la 34 °C) cât și cu osteoblaste (hFOB la 39°C) s-a înregistrat pe matricile Coll-Ser cu rapoartele colagen:sericină de 100:20 și 100:40 și Coll-Ser-HA cu rapoartele de colagen:sericină:hidroxiapatită de 1.2%:20%:30% și 1.2%:40%:30%. Aceste rezultate au fost confirmate și prin testul MTT. În cazul probelor PLA:PVA:Ag viabilitatea celulelor osteoblast-like scade odată cu creșterea concentrației de Ag, astfel la o concentrație de 10% Ag, în probe, s-a înregistrat o viabilitate celulară de aproximativ 5%.

Pentru evaluarea biocompatibilității (**activitatea 1.9**) și a capacității osteoinductive (**activitatea 1.11**) a probelor de biosticle și a celor de Ti și TiAlNb cu acoperiri de nanotuburi, s-a utilizat linia celulară de osteoblaste umane MG63.

În cazul biosticlelor s-a constatat că proba de SiCaPNa-300 a fost citocompatibilă cu celulele acestei linii, obținându-se o viabilitate celulară de aproximativ 95% comparativ cu proba de SiCaP unde viabilitatea a fost mai redusă de aproximativ 70%. Din punct de vedere al diferențierii osteogenice, a fost detectată doar expresia genică a unui marker timpuriu, osteonectină, ușor mai scăzută în cazul celulelor cultivate pe suporturile de SiCaPNa-300.

Probele de Ti cu acoperiri de nanotuburi de TiO₂, calcinate și necalcinate, au permis colonizarea, dezvoltarea și proliferarea celulelor osteoblast-like, cu menținerea morfologiei la interacția cu aceste suprafețe. Nanotuburile de TiO₂ calcinate au indus creșterea expresiei genice pentru osteonectină și osteocalcină în celulele liniei MG63 cultivate timp de 7 zile în contact cu suporturile. Astfel, putem concluziona că acoperirile cu nanotuburi TiO₂ calcinate induc o reactivitate crescută suprafețelor de Ti astfel tratate, ceea ce favorizează diferențierea osteogenică.

În cazul probelor de Ti cu depuneri de Glicerol:H₂O (60:40 vol. %) + 0.5 wt.% NH₄F realizate la 5V, 10V, 15V și 20V s-a constatat că toate suprafețele testate au fost colonizate cu celule osteoblast-like, celulele păstrându-și morfologia nemodificată. S-a observat că depunerile de Glicerol:H₂O (60:40 vol. %) + 0.5 wt.% NH₄F pe piesele de Ti realizate la 5V, 10V, 15V și 20V nu influențează expresia genică a osteonectinei în cazul celulelor MG63 în comparație cu Ti. Expresia genică pentru osteocalcină a scăzut comparativ cu cea observată în celulele cultivate pe Ti neacoperit. Depunerile de Glicerol:H₂O (60:40 vol. %) + 0.5 wt.% NH₄F pe Ti, realizate la 5V, 10V, 15V și 20V s-au dovedit a fi citocompatibile, permițând dezvoltarea și multiplicarea acestora, însă efectul osteoinductor al acestora nu a fost sesizat în celulele osteoblast-like cultivate timp de 7 zile pe nanotuburile mai sus amintite. Același rezultat a fost obținut și în cazul acelorasi depuneri realizate pe aliajul de TiAlNb.

Probele de Ti cu acoperiri de hidroxiapatită au fost testate pentru citocompatibilitate și pentru elucidarea capacității osteoinductive cu celule osteoprogenitoare din linia hFOB1.19. S-a observant



UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

că acoperirile de HA furnizate de P5 au fost parțial citotoxice. Nu a fost detectată nici diferențierea osteogenică a acestor celule în interacție cu hidroxiapatita depusă.

P3 – UNIVERSITATEA POLITEHNICA BUCUREȘTI – FACULTATEA DE CHIMIE APLICATĂ ȘI ȘTIINȚA MATERIALELOR a realizat mai multe serii de suporturi polimerice inovative sub formă de hidrogeluri gonflabile (sisteme 2-D) sau rețele 3-D poroase, obținute din diverse componente naturale (colagen, sericină, gelatină, alginat, glicozaminoglicani) sau sintetice (poliacrilamidă). Dintre toate probele sintetizate, pentru testare biologică au fost selectate mai multe tipuri de suporturi polimerice cu proprietăți adecvate obiectivelor propuse în anul 2011.

Astfel, în vederea realizării **obiectivului 1 (activitățile 1.1, 1.3, 1.5)**, au fost sintetizate mai multe serii de hidrogeluri cu conținut constant de colagen și cantități variabile de sericină, destinate studiilor *in vitro* de evaluare a proprietăților biologice, realizate de **P2**. Analizele fizico-chimice, termice, morfologice și mecanice efectuate pe aceste materiale demonstrează faptul că ele sunt adecvate pentru ingineria țesuturilor osoase. A fost testat de asemenea și efectul incorporării de hidroxiapatită în vederea îmbunătățirii rezistenței acestora.

În cadrul **obiectivului 2, P3** s-a implicat activ în activitățile **2.1, 2.4, 2.5 și 2.9** prevăzute în planul de realizare prin sintetizarea și caracterizarea avansată a unor hidrogeluri binare sau ternare care au fost furnizate echipei **P1** în vederea efectuării de teste biologice specifice. Inițial s-au testat diverse compoziții pe bază de gelatină-alginat la care ulterior s-a mai introdus o componentă sintetică, poliacrilamida. Suporturile poroase pe baza de gelatină-alginat-poliacrilamida (PAA:Gel:Alg) au fost realizate sub formă de rețele interpenetrante și au fost obținute printr-o procedură în mai mulți pași pentru polimerizarea acrilamidei și respectiv pentru reticularea componentelor naturale. De asemenea au fost furnizate către **P1** și diverse compoziții pe bază de colagen și cantități variabile de sericină. Materialele obținute atât sub formă de hidrogeluri gonflabile cât și sub formă de suporturi 3-D poroase au fost caracterizate complet pentru determinarea proprietăților fizico-chimice (FTIR, UV-VIS, XPS), termice (DSC și TGA/DTG), morfologice (SEM) și mecanice.

Principalele aspecte care au fost urmărite în micrografiile SEM au fost omogenitatea micro-arhitecturii, orientarea, gradul de interconecare, dimensiunea și forma porilor. Morfologia suporturilor este foarte importantă deoarece influențează o serie de caracteristici precum capacitatea de gonflare, degradarea chimică sau proprietățile mecanice. Materialele obținute pot fi folosite ca și suporturi pentru cultivarea a diferite tipuri celulare, în funcție de raportul inițial al polimerilor folosiți, care modulează proprietățile acestora.

P4 – UNIVERSITATEA POLITEHNICA BUCUREȘTI – CENTRUL DE PROTECȚIA MEDIULUI ȘI TEHNOLOGII ECOLOGICE a fost implicat în realizarea **activității 1.4** din cadrul **Obiectivului 1** al proiectului. Astfel, a fost realizată analiza de suprafață (AFM, SEM, unghi de contact) și caracterizarea electrochimică (eliberare de ioni evaluați prin ICP-MS) a electrozilor tip



UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

nanotuburi obținuți pe aliaje TiAlNb. S-au obținut și caracterizat pe aliaje TiAlNb: i) *nanotuburi de TiO₂ - obținute în (NH₄)₂SO₄ 1M + NH₄F 0.5 wt% (electrolit1) și ii) în glicerină + 4 % H₂O + NH₄F 0.36 wt %, (electrolit2)*. Analiza elementală indică compoziții diferite în funcție de electrolitul de obținere. Prin metoda în regim Contact a tehnicii AFM s-a evaluat rugozitatea suprafețelor studiate, iar parametrii de rugozitate au fost calculați cu ajutorul programului Gwyddion. Unghiul de contact determinat a indicat balanța hidrofil-hidrofob a suprafeței. Cantitatea ionilor de Ti și Al eliberați în soluție fiziologică Hank la 37°C a fost determinată prin metoda ICP-MS până la timpul de 46 zile și s-au obținut viteze de coroziune comparabile cu cele obținute electrochimic din pante Tafel.

Caracterizarea structurală (FTIR) și analiza de suprafață (AFM, SEM, unghi contact) a electrodepunerilor de compozite polimerice obținute prin electrodepunere potențiostatică și potențiodinamică pe aliaje de titan (TiAlNb și TiAlZr) indică faptul că structura filmului de PPy obținut din soluție apoasă 0.2 M acid oxalic este formată din grăunți de dimensiuni mai mici. Filmul este mai compact decât cel obținut din soluție apoasă de 0.1 M LiClO₄, unde grăunții au dimensiuni mai mari și rugozitatea filmului este mai mare. La toate metodele de electrodepunere al PPy pe aliaje se observă prezența benzilor caracteristice.

Cantitățile de ioni de Al eliberate sunt mult mai mici decât cele pentru ionii de Ti. În cazul aliajului de Ti6Al7Nb acoperit cu filme de polimer, cantitățile ionilor de Ti și Al crește, datorită dizolvării stratului de polimer și eliberării de produși de coroziune formați din compușii de Ti și Al iar după 14 zile de la imersie cantitatea ionilor studiați este constantă până la 46 zile. Ordinea stabilității filmelor de polimer studiate este: PPy/PEG > PPy/surfactant NaPSS. Comportarea acoperirilor polimerice pe TiAlZr este quasisimilară. Creșterea stabilității stratului de la suprafața aliajului de implant procesat nu înseamnă însă și asigurarea unei mai bune oseeintegrări sau îndepărtarea pericolului de infecție, ceea ce a condus la necesitate introducerii în stratul procesat a unor substanțe cu caracter antibacterian (Nanoparticule Ag). Proprietățile antibacteriene ale suprafeței nAg -TiAlZr au fost evaluate prin expunerea substratului la culturi de E. Coli. În ceea ce privește proprietățile de stabilitate ale stratului procesat cu particule Ag, acestea sunt superioare stratului lipsit de nanoparticulele.

Caracterizarea straturilor procesate a condus la creșterea bioperformanțelor cuantificate în stabilitate și efect antibacterian.

P5 – INSTITUTUL DE CHIMIE FIZICĂ "ILIE MURGULESCU" a fost implicat în realizarea **activității 1.5** din cadrul **Obiectivului 1**.

Stabilirea prin metode electrochimice a comportării pe termen mediu a filmelor obținute pe suporturi de Ti și TiAlV: curbele de voltametrie ciclică ale filmelor obținute pe suporturi de Ti și Ti6Al4V relevă o comportare de metal pasiv care devine mai nobilă în timp. Spectrele de impedanță Nyquist evidențiază semicercuri incomplete cu raze de curbura foarte mari, care arată o comportare capacitivă, un strat protector foarte rezistent.



UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

Caracterizarea morfologică pe termen mediu a suprafețelor activate pe suporturi Ti și TiAlV prin SEM a relevat prezența unei acoperiri groase pe suprafața suporturilor de Ti și Ti6Al4V după imersie timp de 500 ore în soluțiile fiziologice.

Obținerea filmelor pasive activate pe suporturi de TiNbZrTa prin metode chimice a fost confirmată prin analiza elementală EDX. Rezultatele indică formarea hidroxiapatitei prin prezența ionilor de calciu și fosfor, iar în urma analizei au fost detectate și cantități mici de ioni de sodiu și elementele constituente ale aliajului.

Comportarea pe termen scurt prin metode electrochimice a filmelor obținute pe suporturi de TiNbZrTa: Curbele de voltametrie ciclică pentru filmele pasive activate caracterizează o stare de pasivitate stabilă cu potențiale de coroziune și de pasivare mai electropozitive și curenți de pasivitate mai reduși decât pentru aliajul neprocesat datorită acțiunii benefice a acoperirii depuse chimic.

Caracterizarea morfologică pe termen scurt a suprafețelor activate pe suporturi de TiNbZrTa prin SEM indică faptul că după 48 ore de imersie a suprafețelor activate în soluțiile fiziologice acestea arată o morfologie globulară formată din elemente circulare interconectate cu cristale aciculare, acoperind complet suprafața suportului.

P6 – UNIVERSITATEA BABES BOLYAI CLUJ NAPOCA a sintetizat sisteme vitroceramice pornind de la sticle calco-fosfosilicaticice și sodo-calco-fosfosilicaticice calcinate la 500 °C. În primele s-au structurat nanocristalite de tip hidroxiapatită, iar în cele sodo-calco-fosfosilicaticice predomină faza de tip calcit. Analizele prin spectroscopie în infrarosu pun în evidență prezența structurii de tip hidroxiapatită în ambele sisteme. Distribuția unităților structurale desemnate ca specii Q^n , în notația numărului de atomi de oxigen punctați la două unități structurale, arată o conectivitate mai mare a unităților $[SiO_4]$ în probele sodo-calco-fosfosilicaticice, ceea ce ar putea diminua bioactivitatea acestora. Raspunsul celular *in vitro* a arătat că ambele compozitii permit dezvoltarea celulelor testate. Au fost analizate și compozite aluminosilicaticice cu alcool polivinilic, obținute în aceeași compoziție prin metode diferite: intercalarea în soluție și amestecul mecanic. Rezultatele analizei termice diferențiale și termogravimetrice pun în evidență o stabilitate termică mai bună a compozitului față de cea a componentei polimerice. Comparativ, stabilitatea termică a probelor este similară, indiferent de modul de obținere a compozitelor. Studiile prin difracție de raze X și prin microscopie electronică indică în ambele compozite o separare microstructurală de fază, cu o tendință ușoară de intercalare în cazul probelor preparate în soluție.

P7 – INSTITUTUL DE CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU CHIMIE SI PETROCHIMIE – ICECHIM a fost implicat în **activitățile 2.1, 2.2 și 2.4 ale Obiectivului 2**, având ca obiectiv principal realizarea de hidrogeluri utilizate ca suporturi pentru imobilizarea, creșterea și proliferarea celulelor ADAS. Într-o primă instanță s-a hotărât, de comun acord **P1** în cadrul **activității 2.4**, realizarea (**activitatea 2.1**) și studierea (**activitatea 2.2**) hidrogelurilor pe bază de alginat și chitosan obținute în prezența unor agenți de reticulare diferiți.



UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

Hidrogelurile de pe bază de alginat au fost realizate pornind de la optimizarea metodei de gelifiere a polimerului. Reacția care are loc în prezența ionilor de Ca^{2+} este extrem de rapidă și decurge în mod necontrolabil în momentul punerii în contact a soluțiilor celor doi reactanți. Scăderea vitezei de reacție în limite dorite, se poate realiza prin controlul concentrației ionilor de Ca^{2+} , prin metode chimice sau fizice. Metodele chimice au la bază generarea ionilor de Ca^{2+} *in situ* prin reacții mai lente decât cea de reticulare. Un exemplu în acest sens este sistemul: carbonat de Ca –glucono δ lactona, care în urma studiilor de evaluare a biocompatibilității s-a dovedit a fi citotoxic. Metodele fizice implică introducerea ionilor de Ca^{2+} în sistem prin intermediul unui proces fizic lent, cum ar fi difuzia. Această strategie s-a dovedit a fi corespunzătoare atât din punctul de vedere al cineticii reacției cât și al biocompatibilității. Lucrările efectuate au demonstrat că rezultatele depind foarte mult de sarea de Ca folosită și de modul de introducere al acesteia în sistem. Astfel pentru studiile de biocompatibilitate și de evaluare a diferențierii adiogenice a celulelor ADAS înglobate au fost utilizate hidrogeluri pe bază de alginat, reticulate cu CaCl_2 (RH) și cu gluconat de calciu (CGH). Valoarea finală a modulului de elasticitate este apreciabil mai ridicată în cazul gluconatului. În ambele cazuri hidrogelurilor liofilizate au același tip de morfologie “coaja de ou”. Dimensiunea cavitațiilor hidrogelurilor obținute cu gluconat este însă, de sute de ori mai mare decât a celor obținute cu clorură. Având în vedere rezultatele testelor de biocompatibilitate raportate de P1, concluzia la care se ajunge este aceea că dimensiunea cavitației reprezintă un factor deosebit de important în supraviețuirea, proliferarea și diferențierea celulelor ADAS înglobate.

Hidrogelurile termosensibile pe bază de chitosan pot fi realizate prin adăugarea unui complex poliolic dibasic precum β -glycerol phosphate disodium (β GP). S-a arătat că soluțiile de chitosan neutralizate cu β GP formează gelifiant care ramane lichid lungi perioade de timp la temperatura camerei și care se transformă într-un gel macroporos atunci când temperatura atinge 37°C . Combinația chitosan- β GP disodium beneficiază de efecte sinergetice favorabile formării gelului cum ar fi legături de hidrogen, interacțiuni electrostatice și hidrofobe. Caracterul unic al acestei combinații este reprezentat de depășirea barierei de pH pentru soluțiile de chitosan, bariera care timp îndelungat a constituit o limitare majoră pentru multe aplicații. Mecanismul formării gelului nu este cunoscut în detaliu, iar studiile *in vitro* realizate până în prezent au indicat necesitatea optimizării concentrației de β GP în vederea obținerii unor performanțe biologice satisfăcătoare.

Hidrogelurile de chitosan reticulate cu genipin sunt insolubile în apă și cu mult mai puțin toxice decât cele preparate cu glutaraldehida sau alți agenți de reticulare sintetici.

Experiențele realizate au confirmat faptul că genipinul este activ în concentrații foarte mici și că reticularea se realizează prin legături chimice. Comparativ cu sistemele termosensibile, viteza de formare a gelurilor reticulate cu genipin este sensibil mai redusă.



UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

DISEMINAREA REZULTATELOR - ETAPA II

Articole:

1. *The effect of BMP-4 loaded in 3D collagen-hyaluronic acid scaffolds on biocompatibility assessed with MG 63 osteoblast-like cells*, A. Lungu, I. Titorencu, M. G. Albu, N. M. Florea, E. Vasile, H. Iovu, V. Jinga, M. Simionescu, **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, 6(4), 2011, p. 1897 – 1908 (IF 2.079)
2. *Porous gelatin-alginate-polyacrylamide scaffolds with interpenetrating network structure: synthesis and characterization*, I. Stancu, A. Lungu, D. Dragusin, E. Vasile, C. Petrea, H. Iovu, **Soft Materials – in press** (IF 2.088)
3. *The influence of glycosaminoglycan type on the collagen-glycosaminoglycan porous scaffolds*, A. Lungu, M. G. Albu, N. M. Florea, I. C. Stancu, E. Vasile, H. Iovu, **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, 6(4), 2011, p.1867-1875 (IF 2.079)
4. *Processing Ti-25Ta-5Zr Bioalloy via Anodic Oxidation Procedure at High Voltage*, D. Ionita, M. Grecu, M. Dilea, V. D. Cojocar, I. Demetrescu, **Metall Mater Trans B**, 42(6), 2011, 1352-1358 (IF 0.963)
5. *Modifying the TiAlZr biomaterial surface with coating, for a better anticorrosive and antibacterial performance*, D. Ionita, M. Grecu, C. Ungureanu, I Demetrescu, **Appl. Surf. Sci**, 257, p. 9164, 2011 (IF 1.793)
6. *Antimicrobial activity of the surface coatings on TiAlZr implant biomaterial*, D. Ionita, M. Grecu, C. Ungureanu, I. Demetrescu, **J. Biosci. Bioeng.**, 135, D, 2342-2357, 2011 (IF 1.707)
7. *From nanoscale engineering to biomedical application - characterization of pulse electrodeposited biomimetic antibacterial coating on Ti6Al4Zr*, C. Ungureanu, D. Ionita, N. Badea, I. Demetrescu, **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, 6(3), 2011, p. 1273 – 1279 (IF 2.079)
8. *Synthesis, mechanical and structural, properties and biological activity of some nanostructured bone scaffolds*, C. Vasilescu, A. Campean, B. Galateanu, S.I. Drob, **Digest J. Nanomat. Biost.**, 2011, 523 (IF 2.079)
9. *Electrochemical deposition of bioactive coatings on Ti and Ti-6Al-4V surfaces*, M.V. Popa, J.M. Calderon Moreno, M. Popa, E. Vasilescu, P. Drob, C. Vasilescu, S.I. Drob, **Surf. Coat. Techn.**, 2011, 4776 (IF 2.135)
10. *Corrosion behaviour in physiological fluids of surface films formed on titanium alloys*, J.C. Mirza Rosca, E. Vasilescu, P. Drob, C. Vasilescu, S.I. Drob, **Mater. Corros.** DOI:10.1002/maco.201106086 (IF 1.077)
11. *Thermal and structural characterization of polyvinyl alcohol-kaolinite nanocomposites*, M. Tămășan, V. Simon, **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, 6(3), 2011, p 1311-1316 (IF 2.079)



UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

12. *Adsorption and release studies of tetracycline from a bioactive glass*, E. Vanea, S. Cavalu, F. Bănică, Z. Benyey, G. Goller, V. Simon, **Studia Chimica**, in press nr. 3/2011 (IF 0.231)

13. *Physical properties and biological performance of bioactive glasses and glass-ceramics tested in vitro*, V. Simon, R. Ciceo Lucacel, I. Titorencu, V. Jinga, **Key Engineering Materials**, 493-494 in press (IF 0.224)

IF cumulat = 20.613

Articole submitse

1. *Innovative superporous collagen-silk sericin materials*, M. G. Albu, A. Lungu, I.C. Stancu, E. Vasile, H. Iovu - submit la **Journal of Applied Polymer Science** (IF 1.24)

2. *Characterization and deposition behaviour of silk hydrogels soaked in simulated body fluid*, C. Zaharia, M. R. Tudora, I. C. Stancu, B. Galateanu, A. Lungu, C. Cincu - submit la **Materials Science and Engineering C** (IF 2.18)

3. *Layer-shaped Alginate Hydrogels Enhance the Biological Performance of Human Adipose-Derived Stem Cells*, B. Galateanu, D. Dimonie, E. Vasile, S. Nae, A. Cimpean, M. Costache - submit la **BMC Biotechnology** (IF 2.86)

4. *New alginate hydrogels with controlled morphology and properties for soft tissue regeneration*, Doina Dimonie, Raluca Gabor, Bianca Galateanu, Roxana Trusca, Vasile Eugeniu, Radu Fierascu, Inna Trandafir, Marius Petrache, Anisoara Campean, Cosmin Corobea, Marieta Costache, submit la **BMC Biotechnology** (IF 2.86)

Comunicări la conferințe naționale și internaționale

1. Second International Conference on Multifunctional, Hybrid and Nanomaterials, 6-10 martie 2011, Strasbourg, Franța;
2. Congresul Asociației de Citometrie, 5-7 mai 2011, București, România
3. Al III-lea congres internațional și a XXIX-a sesiune anuală a SRBC, 8-12 iunie 2011, Arad-Szeged, Ro-Hu
4. The 36th *FEBS* Congress, 25 - 30 iunie 2011, Torino, Italia
5. European Polymer Congress, 26 iunie – 1 iulie 2011, Granada, Spania;
6. 17th Romanian International Conference on Chemistry and Chemical Engineering (RICCCE 17), 7-10 septembrie 2011, Sinaia, România;
7. 15e congrès annuel "Cytométrie 2011", 26-28 octombrie 2011, Paris, Franța
8. PRIOCHEM 27-28 oct 2011, București, România
9. BIOFUTURE 2011, 15-19 noiembrie 2011, Ghent, Belgia



UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

2. Cerere de brevet P1 : A /01357/08.12.2011, “ Procedeu de activare a proliferării celulare, ce efect asupra regenerării țesutului ars și rănit, și a metaloproteinazelor matriciale, prin stimularea adeziunii și diferențierii celulare, sub acțiunea levanului produs de către bacteria ZYMOMONAS MOBILIS crescută pe extracte de sorg zaharat (*Sorghum bicolor var Saccharum*).

CERERE DE BREVET DE INVENTIE
In referinta la inventia: Procedeu de activare a proliferării celulare 08-12-2011

OSIM

Se completeaza de catre OSIM

Numarul cererii de brevet de inventie: 14/1357

Data primirii la Registratura Generala a OSIM: 08.12.2011

Data de depozit: 08.12.2011

Data primirii partii I la Registratura Generala a OSIM: 08.12.2011

Data de depozit după primirea părții I la Registratura Generala a OSIM: 08.12.2011

Data primirii cererii de retragere a părții I la Registratura Generala a OSIM: 08.12.2011

Data de depozit a părții II a cererii de brevet: 08.12.2011

1. Solicitant (nume și prenume sau adresă, telefon, fax, e-mail):
Universitatea din București - Direcția juridică, Școlii Mihail Kogălniceanu nr. 36-46, sector 5, București.
Revizoria, cod poștal 206107, cod fiscal 4050920. Tel. +40-21-307 73.00. Fax +40-21-313 11 00. e-mail: contenios@unibuc.ro. Web site: www.unibuc.ro

2. Solicitant în baza Legii nr. 64/1991 privind brevetele de inventie, republicată acordarea unui brevet de inventie pentru inventia cu titlu:
PROCEDUL DE ACTIVARE A PROLIFERĂRII CELULARE CU EFECT ASUPRA REGENERĂRII ȚESUTULUI ARS ȘI RĂNIT ȘI A METALOPROTEINAZELOR MATRICIALE, PRIN STIMULAREA ADZIUNII ȘI DIFERENȚIERII CELULARE SUB ACȚIUNEA LEVANULUI PRODUS DE CĂTRE BACTERIA ZYMOMONAS MOBILIS CREȘCUTĂ PE EXTRACTE DE SORG ZAHARAT (SORGHUM BICOLOR VAR SACCHARUM)

2.1. Inventia a fost creată în baza art.3, art.5^a alin. 1 și al. art.5^a alin. 1 și b), art.5^a alin. 2

2.2. Referința la o cerere anterioară (numar, data de depozit, tara/cara) nu este cazul

3. Decizia privind invenția este:
3.1. Inventia este noua și are caracter de invenție

3.2. Persoanele din "Declarația privind desemnarea inventatorilor" ancași și/să fi transmisă ulterior

4. Declaram ca inventia conține informații care au fost clasificate de către deținerea, așa și în cazul în care nu e cazul

5. Rezumatul invenției se publică împreună cu figura numărul 1, 2, 3, 4

FORM. B 01 - (cib) Ghidul de completare

6. Revendicăm prioritatea convențională (numar, tara, data): nu este cazul

7. Revendicăm prioritatea interna (numar, tara, data): nu este cazul

8. Cererea de brevet este:
 o traducere din cererea de brevet european (cu sau cu condiții)
 rezultatul din convenția unei cereri de înregistrare a unui model de utilitate (cu sau cu condiții)

9. Procedul solicitat la data depunerii cererii:
9.1. Publicarea de urgență a cererii de brevet de invenție
9.2. Întocmirea unui raport de documentare
9.3. Întocmirea unui raport de documentare cu opinie scrisă
9.4. Examinarea cererii cerută la data de depozit

10. Mandatar autorizat (nume, semn):
prin procura sau procura generală (cu semn)

11. Solicitantul/reprezentantul desemnat de solicitant/mandatar autorizat (nume, prenume, semn, semn sau pentru corespondența cu OSIM):
Prof. dr. Ioan Plăzaru
Rector al Universității din București
Data: 08.12.2011

12. Semnătură solicitant/mandatar autorizat:
Prof. dr. Ioan Plăzaru
Rector al Universității din București
Data: 08.12.2011

FORM. B 01 - (cib) Ghidul de completare

13. Documente depuse la OSIM de solicitant/mandatar	14. Documente primite la OSIM		
13.1. Formular de cerere	in 1 exemplar, a 3 file	14.1. Certificat de depunere	in 1 exemplar, a 3 file
13.2. Descriere	in 1 exemplar, a 3 file	14.2. Declarație privind desemnarea inventatorilor	in 1 exemplar, a 3 file
13.3. Rezumatul	in 1 exemplar, a 3 file	14.3. Declarație privind desemnarea inventatorilor	in 1 exemplar, a 3 file
13.4. Desene	in 1 exemplar, a 4 file	14.4. Declarație privind desemnarea inventatorilor	in 1 exemplar, a 3 file
13.5. Rezumat	in 1 exemplar, a 3 file	14.5. Declarație privind desemnarea inventatorilor	in 1 exemplar, a 3 file
13.6. Lista de soviete de nucleotide și/sau aminoacizi (pentru a descrie)	in 1 exemplar, a 3 file	14.6. Declarație privind desemnarea inventatorilor	in 1 exemplar, a 3 file
13.6.1. pe suport fizic	in 1 exemplar, a 3 file	14.7. Declarație privind desemnarea inventatorilor	in 1 exemplar, a 3 file
13.6.2. pe suport electronic	in 1 exemplar, a 3 file	14.8. Declarație privind desemnarea inventatorilor	in 1 exemplar, a 3 file
13.7. Declarație privind desemnarea inventatorilor	in 1 exemplar, a 3 file	14.9. Declarație privind desemnarea inventatorilor	in 1 exemplar, a 3 file
13.8. Declarație privind desemnarea inventatorilor	in 1 exemplar, a 3 file	14.10. Document referitor la plata taxelor	in 1 exemplar, a 3 file
13.9. Procuropoza procură generală	in 1 exemplar, a 3 file	14.11. Act privind acordarea reducerii taxelor	in 1 exemplar, a 3 file
13.10. Document referitor la plata taxelor	in 1 exemplar, a 3 file	14.12. Autorizația privind transmiterea dreptului de prioritate	in 1 exemplar, a 3 file
13.11. Act privind acordarea reducerii taxelor	in 1 exemplar, a 3 file	14.13. Act de prioritate	in 1 exemplar, a 3 file
13.12. Autorizația privind transmiterea dreptului de prioritate	in 1 exemplar, a 3 file	14.14. Act referitor la depozitul microorganismului/materialului biologic	in 1 exemplar, a 3 file
13.13. Act de prioritate	in 1 exemplar, a 3 file	14.15. Document privind o divulgare a invenției, conform art. 11 din lege	in 1 exemplar, a 3 file
13.14. Act referitor la depozitul microorganismului/materialului biologic	in 1 exemplar, a 3 file	14.16. Copie/traducere a cererii anterioare de la rubrica 2.1	in 1 exemplar, a 3 file
13.15. Document privind o divulgare a invenției, conform art. 11 din lege	in 1 exemplar, a 3 file	14.17. Alte documente	in 1 exemplar, a 3 file
13.16. Copie/traducere a cererii anterioare de la rubrica 2.1	in 1 exemplar, a 3 file		
13.17. Alte documente	in 1 exemplar, a 3 file		

Confirmare OSIM (nume, prenume și semn)



FORM. B 01 - (cib) Ghidul de completare

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

ANEXA I: Rezultate P1

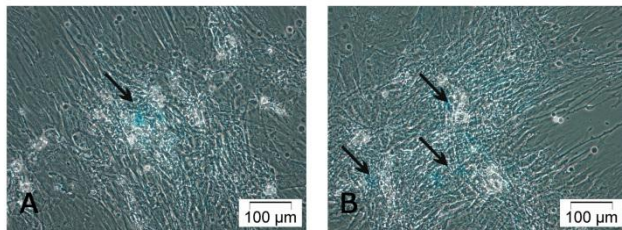


Fig. 1: Imagini în contrast de fază reprezentând insule de celule ADAS în pasajul opt (A) și în pasajul nouă (B), marcate pozitiv pentru β-galactozidază

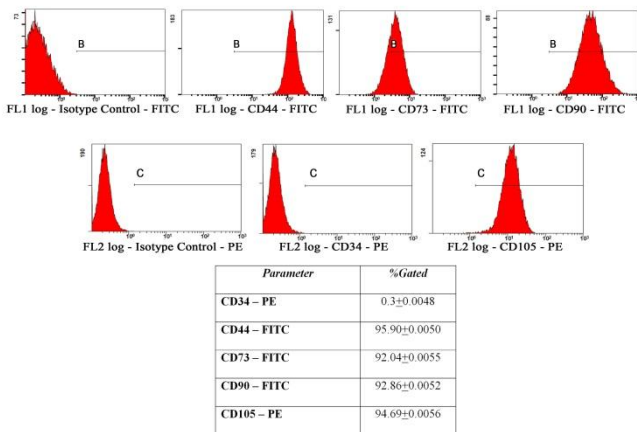


Fig. 2: Histograme de citometrie în flux obținute la imunofenotiparea celulelor ADAS în pasajul al treilea.

SUS: Nivelul fluorescenței înregistrat pe detectorul FL1 pentru markerii CD44, CD73 și CD90, studiați prin marcarea cu anticorpi conjugați cu FITC (Santa Cruz Biotechnology) față de Controlul de izotip (Beckman Coulter)

JOS: Nivelul fluorescenței înregistrat pe detectorul FL2 pentru markerii CD34 și CD105 studiați prin marcarea cu anticorpi conjugați

cu PE față de Controlul de izotip (Beckman Coulter)

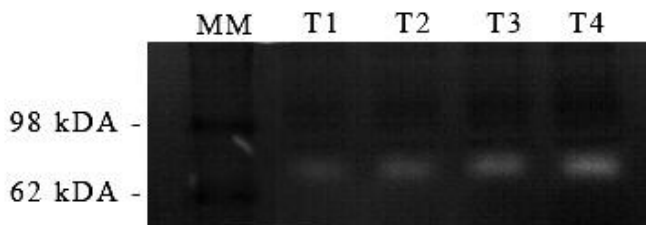


Fig. 3: Expresia activității gelatinolitice specifice MMP2 – forma activată (MM ~ 64 kDa) pentru: MD₂ recoltat la 3 zile (T1), 7 zile (T2), 14 zile (T3) și respectiv 21 zile (T4) de la inducția adipogenezei.

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

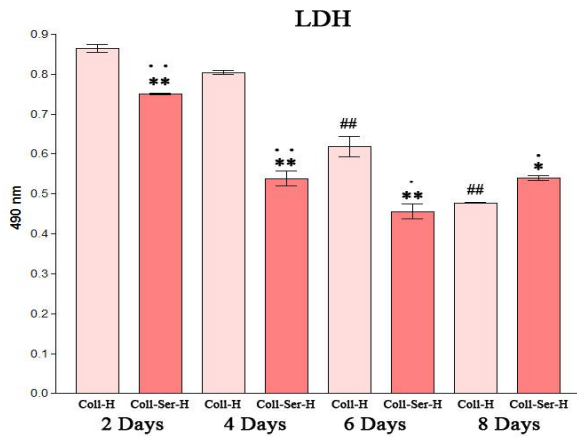


Fig. 4: Evidențierea activității LDH în mediul de cultură la 2,4,6 și 8 zile de la însămânțare.

Coll – Ser – H vs Coll – Ser – H: “. ”

. – p<0.05

. . – p<0.001

Coll – Ser – H vs Coll – H: “”*

** – p<0.05*

*** – p<0.001*

Coll – H vs Coll – H: “#”

- p<0.001

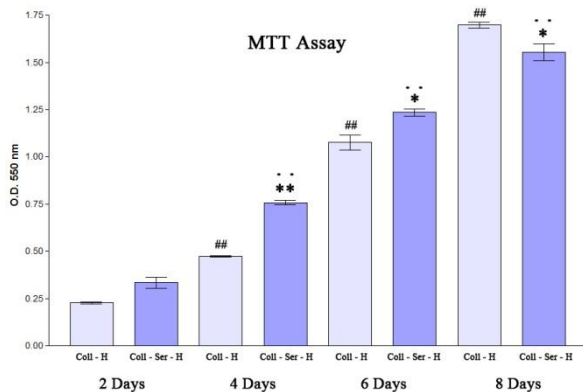


Fig. 5: Evaluarea viabilității și proliferării celulare la 2,4,6 și 8 zile de la însămânțare în Coll-H și Coll-Ser-H prin testul MTT

Coll – Ser – H vs Coll – Ser – H: “. ”

. . – p<0.001

*Coll – Ser – H vs Coll – H: “**”*

** – p<0.05*

*** – p<0.001*

Coll – H vs Coll – H: “#”

- p<0.001

**UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE**

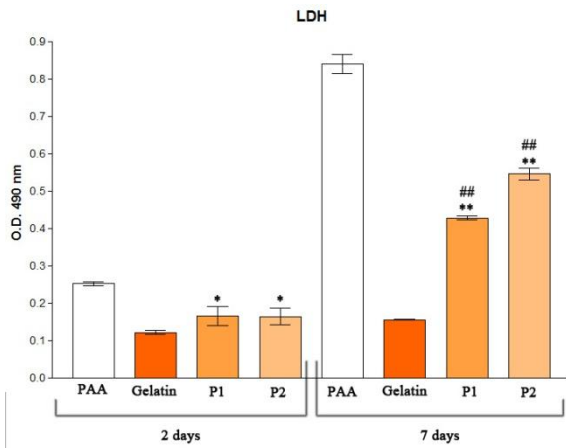


Fig. 6: Evidențierea activității LDH în mediul de cultură la 2 și 7 zile de la însămânțare.

P1 și P2 vs PAA: “”*

** - p<0.05*

*** - p<0.001*

P1 și P1 vs Gel: “#”

- p<0.001

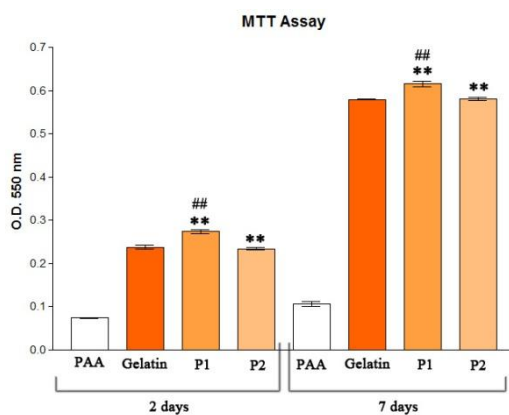


Fig. 7: Evaluarea viabilității și proliferării celulare la 2 și la 7 zile de la însămânțarea preadipocitelor 3T3-L1 pe suprafața hidrogelurilor pe bază de PAA/Gel/Alg

P1 și P2 vs PAA: “”*

*** - p<0.001*

P1 și P1 vs Gel: “#”

- p<0.001

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

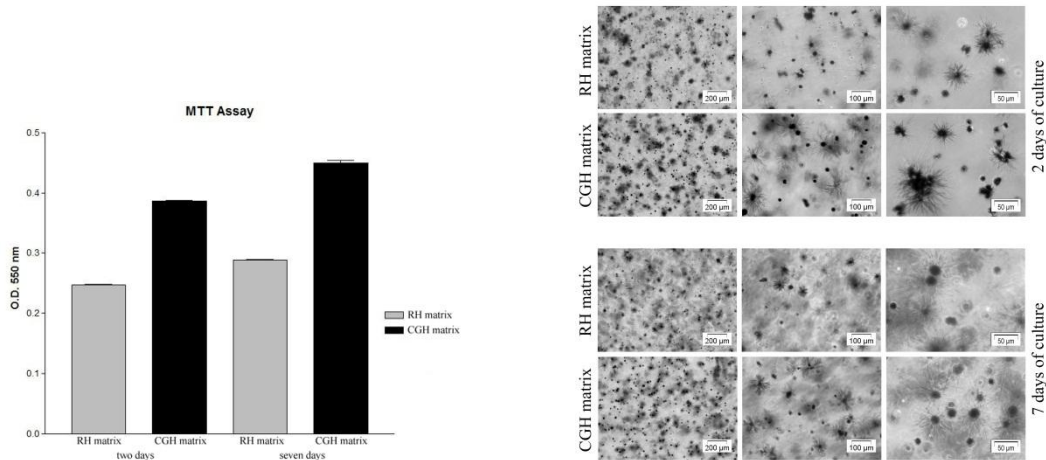


Fig. 8: Evaluarea viabilității și proliferării celulare la 2 și 7 zile de la însămânțarea celulelor ADAS în RH și CGH prin testul MTT spectrofotometric (stanga); Imagini de microscopie în contrast de fază ale celulelor ADAS. înglobate în RH și CGH după metabolizarea MTT și formarea cristalelor de formazani (dreapta)

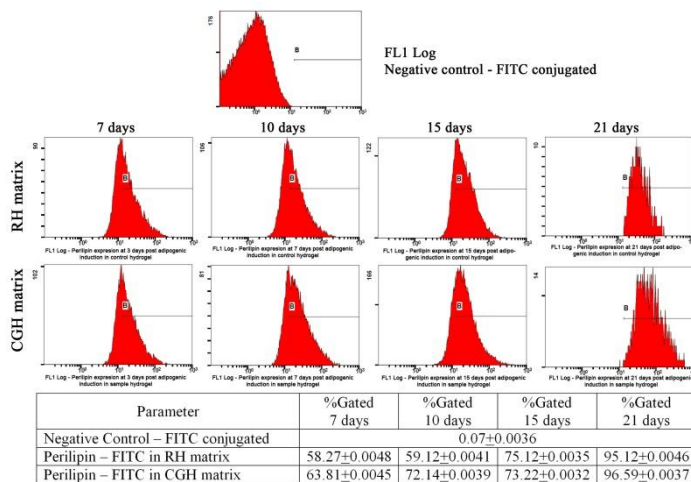
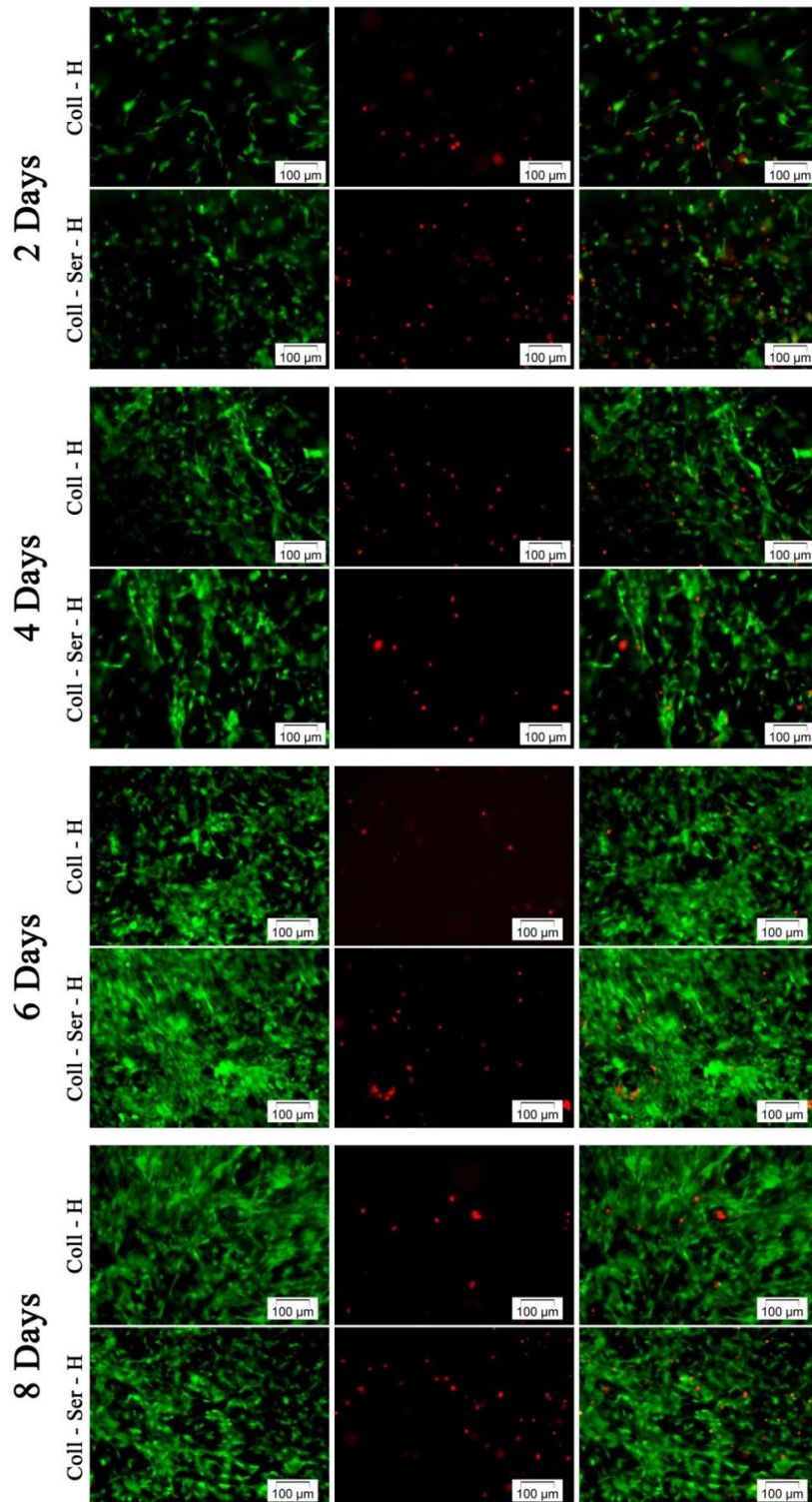


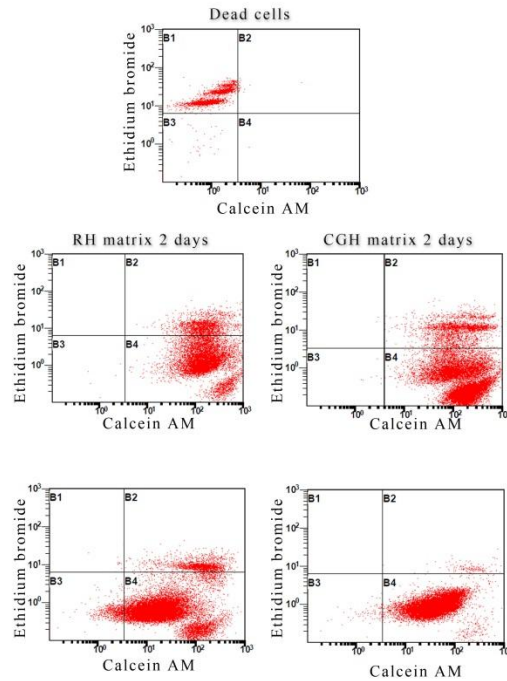
Fig. 9: Histograme indicând nivelul de fluorescență pe detectorul FL1 la citirea probelor provenite din RH și CGH la 7, 10, 15 și 21 zile de la inducția adipogenezei

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE



Evidențierea prin microscopie de fluorescență a celulelor vii și a celor moarte de pe suprafața Coll-H și Coll-Ser-H la 2,4,6 și 8 zile de la însămânțare

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI FACULTATEA DE BIOLOGIE

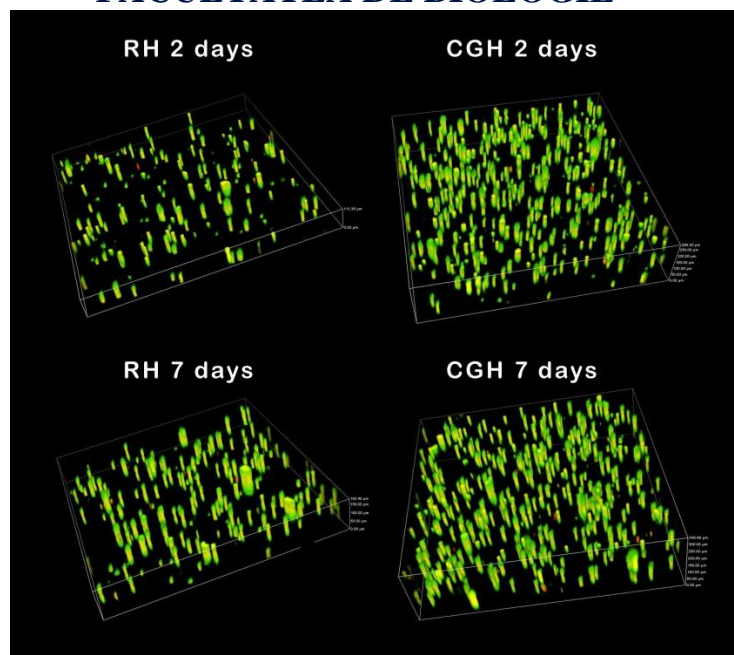


	RH 2 days %	CGH 2 days %	RH 7 days %	CGH 7 days %
B2	19,49±0.0016	15,68±0.0024	9,10±0.0018	0,66±0.0020
B4	80,47±0.0018	84,23±0.0021	88,94±0.0031	87,40±0.0027

Evaluarea viabilității celulelor ADAS înglobate în RH și CGH după 2 și 7 zile de la inițierea culturii prin citometrie în flux

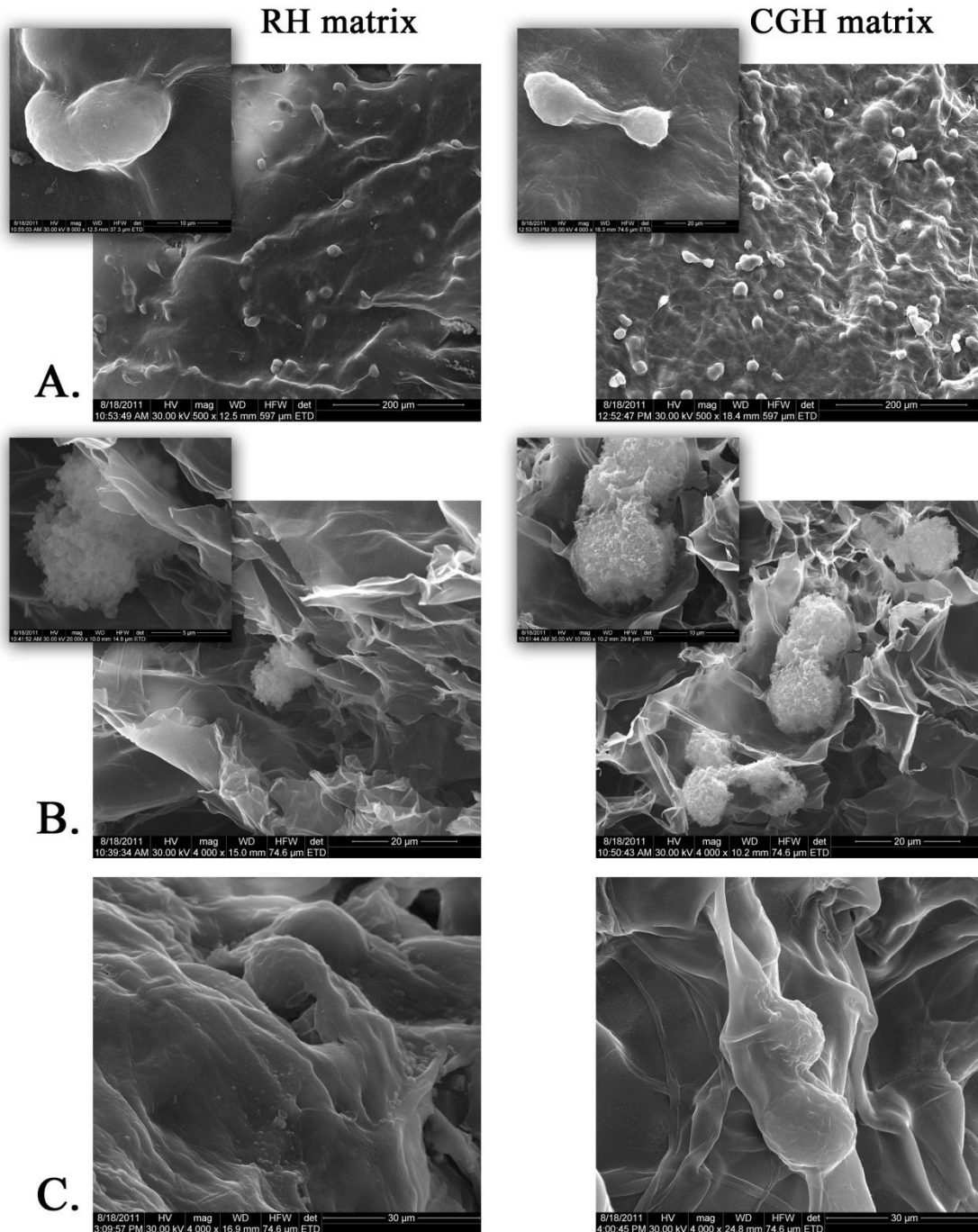


UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI FACULTATEA DE BIOLOGIE



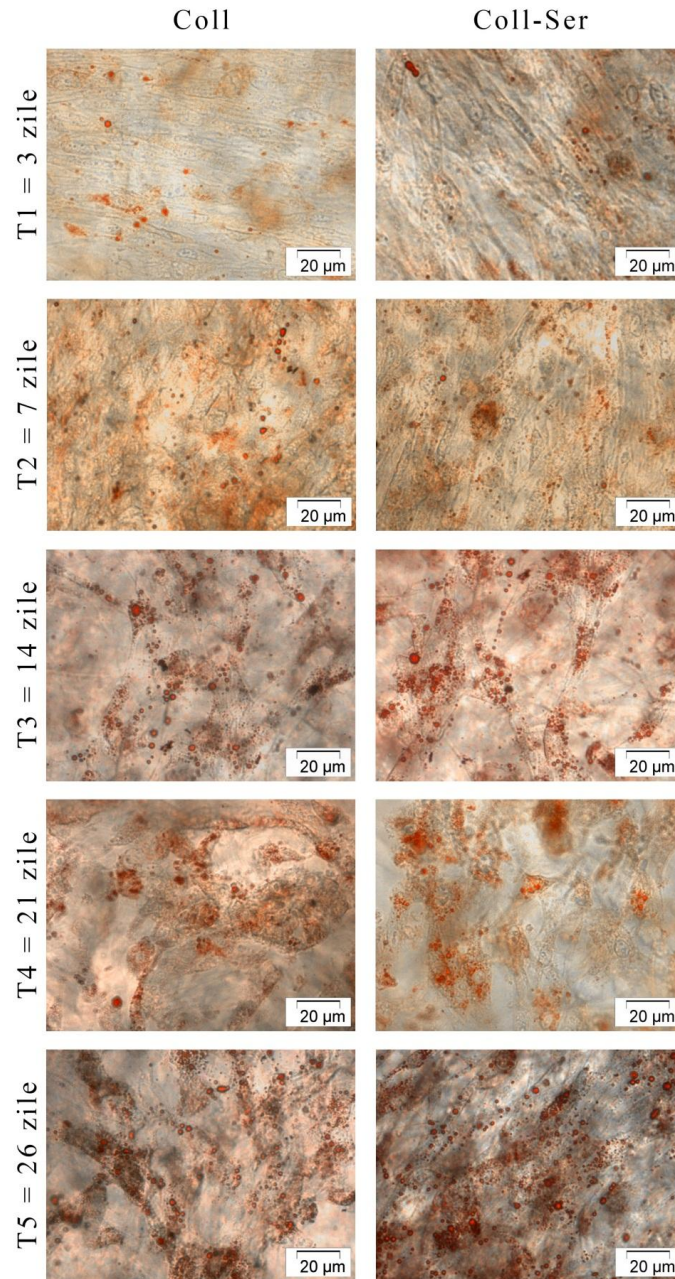
Imagini tridimensionale obținute prin scanarea laser a hidrogelurilor pe bază de alginat la microscopul confocal

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE



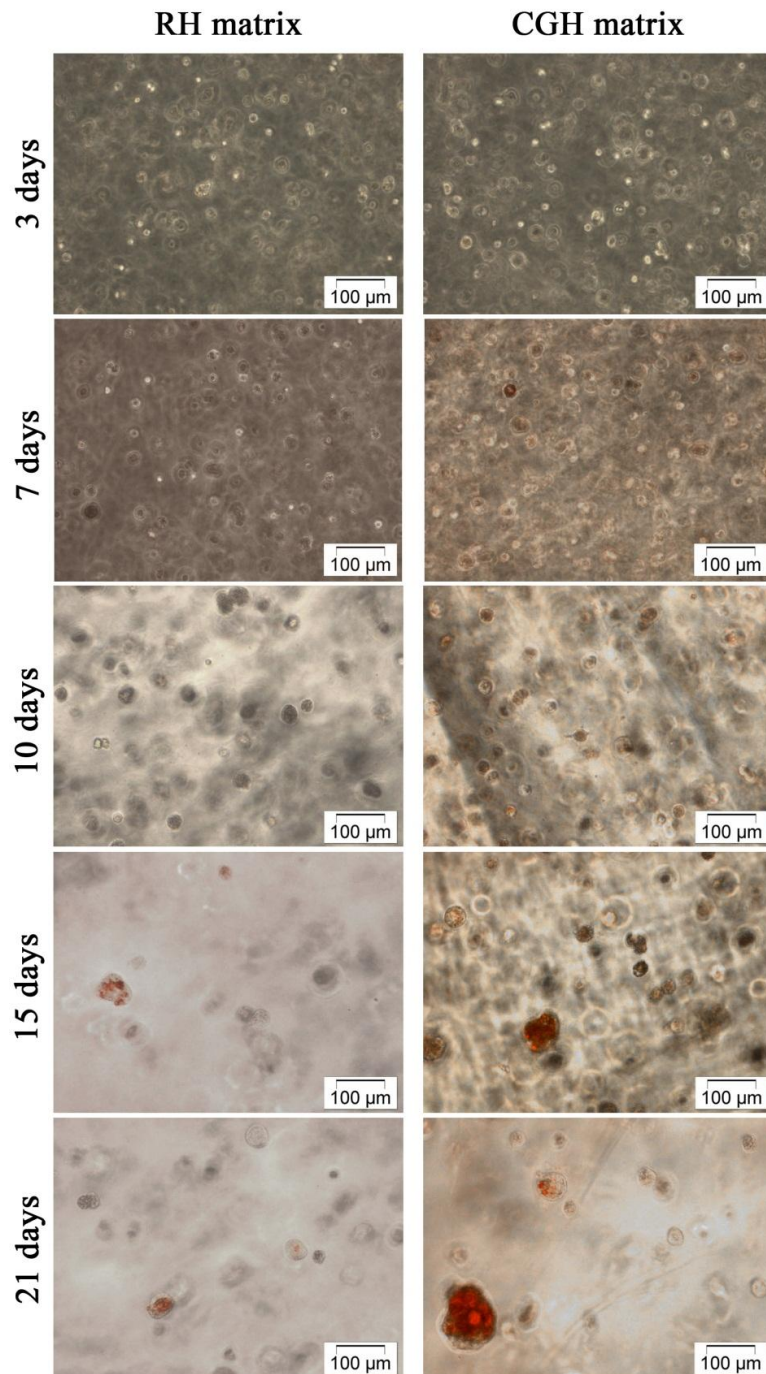
Imagini ale sistemelor ADAS-suporturi pe bază de alginat obținute prin SEM; suprafața hidrogelurilor populată de celule (A), secțiune populată de celule ADAS la 2 zile de la însămânțare (B) și secțiune populată cu celule ADAS la 7 zile de cultivare (C).

**UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
 FACULTATEA DE BIOLOGIE**



Imagini de microscopie în contrast de fază reprezentând celule ADAS cultivate pe suprafața Coll-H și Coll-Ser-H, supuse adipogenezei timp de 26 de zile și marcate cu Oil Red O pentru evidențierea acumulării intracitoplasmice de lipide

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI FACULTATEA DE BIOLOGIE



Imagini de microscopie în contrast de fază reprezentând celule ADAS înglobate în RH și CGH, supuse adipogenezei timp de 21 de zile și marcate cu Oil Red O pentru evidențierea acumulării intracitoplasmatică de lipide neutre

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

ANEXA I: Rezultate P2

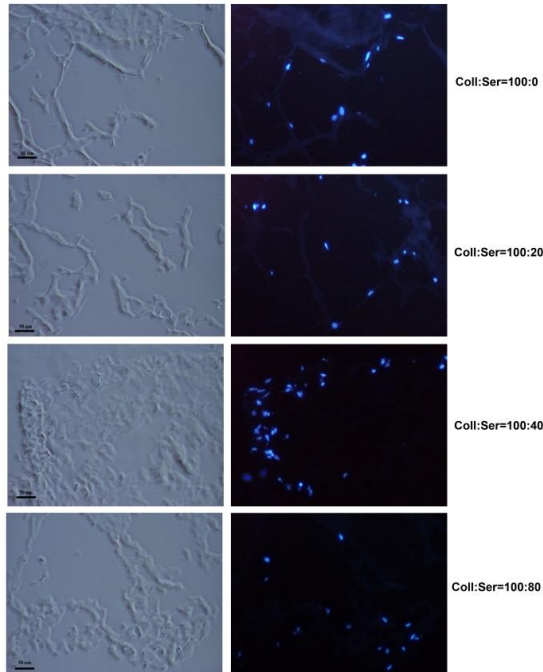


Fig. 1: Celule hFOB1.19 - 7de zile de la însămânțarea pe matricile colagenice cu sericină (34°C) – Coloratie Hoechst

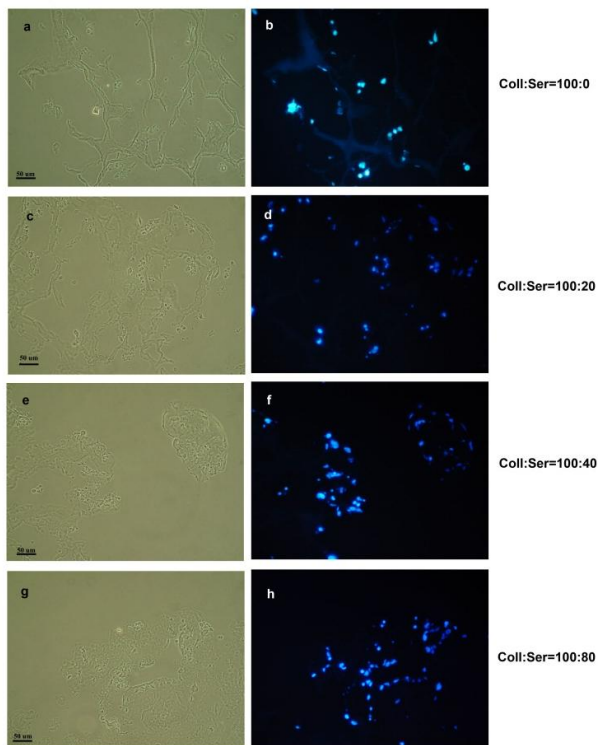


Fig. 2: Celule hFOB1.19 - 21 de zile de la însămânțarea pe matricile colagenice cu sericină (39°C) – Coloratie Hoechst

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

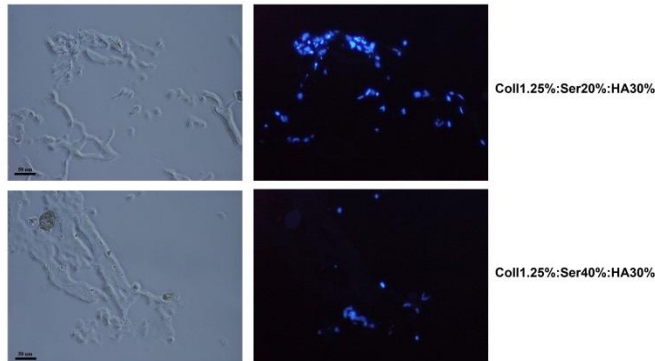


Fig. 3: Celule hFOB1.19 - 21 de zile de la însămânțarea pe matricile colagenice cu sericină (39°C) – Coloratie Hoechst panelul din stanga– contrast de faza; panelul din dreapta - fluorescena

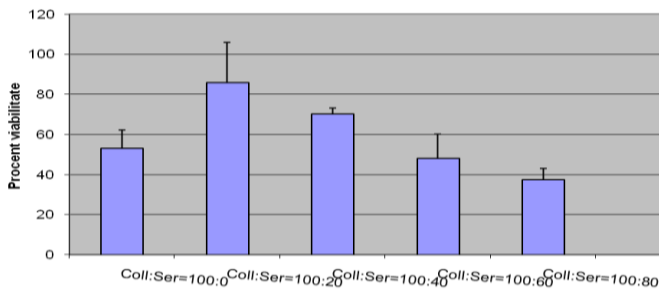


Fig. 4: Viabilitatea celulelor hFOB1.19 la 7 zile de la însămânțarea pe matricile colagenice cu sericină (34°C)

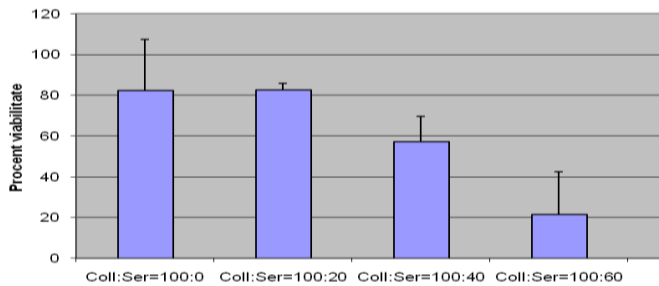


Fig. 5: Viabilitatea osteoblastelor hFOB1.19 la 21 zile de la însămânțarea pe matricile colagenice cu sericină (39°C); 2 săptămâni de la diferențiere.

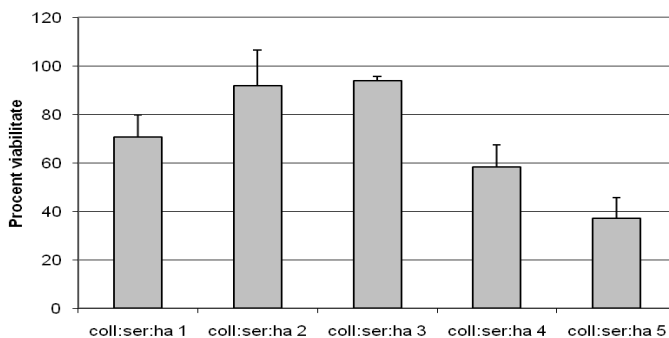


Fig. 6: Viabilitatea celulelor hFOB1.19 la 7 zile de la însămânțarea pe matricile colagenice cu sericină și hidroxiapatită (34°C)

*coll:ser:ha1 = Coll 1.2%; Ser 20%; HA30%;
coll:ser:ha2 = Coll 1.2%; Ser 40%; HA30%;
coll:ser:ha3 = Coll 1.2%; Ser 60%; HA30%;
coll:ser:ha4 = Coll 1.2%; Ser 80%; HA30%;
coll:ser:ha5 = Coll 1.2%; Ser 100%; HA30%.*

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

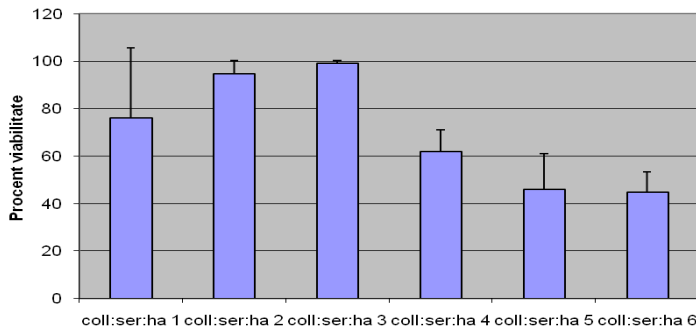


Fig. 7: Viabilitatea osteoblastelor hFOB1.19 la 21 zile de la însămânțarea pe matricile colagenice cu sericină și hidroxiapatită (39°C) coll:ser:ha1= Coll 1.2%; HA30%; coll:ser:ha2 = Coll 1.2%;Ser 20%; HA30%;coll:ser:ha3 = Coll 1.2%;Ser40%; HA30%; coll:ser:ha4 = Coll 1.2%;Ser 60%; HA30%;coll:ser:ha5 = Coll 1.2%;Ser 80%; HA30%; coll:ser:ha6 = Coll 1.2%;Ser 100%; HA30%;

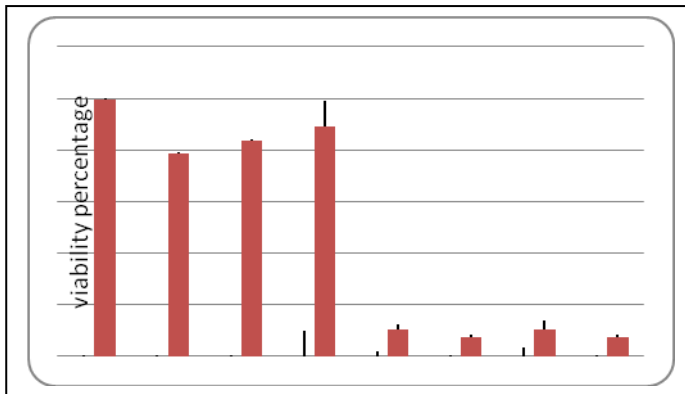


Fig. 8: Viabilitatea celulelor osteoblast like la șapte zile de la însămânțarea pe matricile tridimensionale din polimeri sintetici

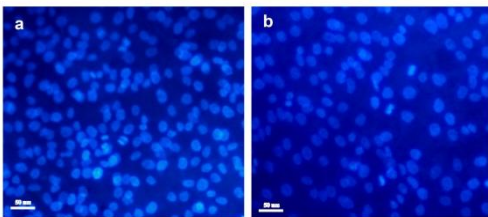


Fig. 9: Colonizarea probelor de SiCaP (a) și SiCaPNa-300 (b) cu celule osteoblast-like – 5 zile de la însămânțare; Coloratie Hoechst

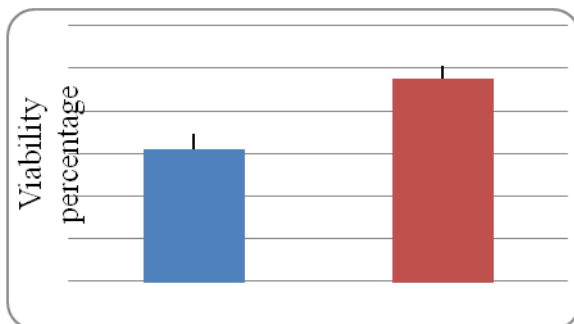


Fig. 10: Viabilitatea celulelor osteoblast like la șapte zile de la însămânțarea pe probele de SiCaP și SiCaPNa-300; p=0.000643

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

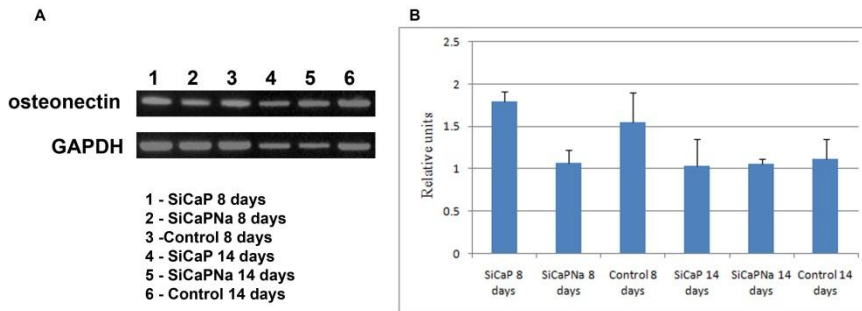


Fig. 11: Expresia genica pentru osteonectina in celulele liniei MG63 la 8, respectiv 14 zile de la insamantarea pe probele de SiCaP si SiCaPNa-300; controlul-celule cultivate pe sticla; A - Imaginea unui gel reprezentativ

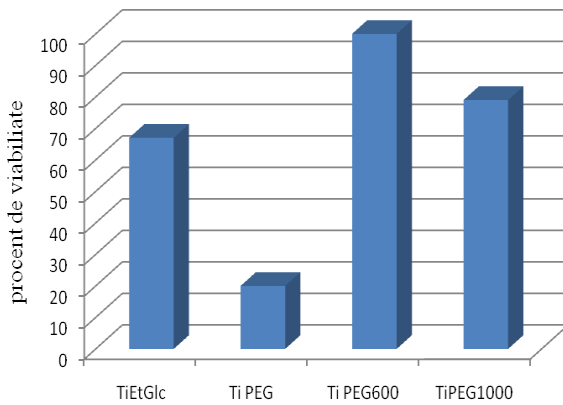


Fig. 12: Viabilitatea celulelor osteoblast like la saptete zile de la insamantarea pe probele de Ti acoperite cu diferite tipuri de polietilenglicol.

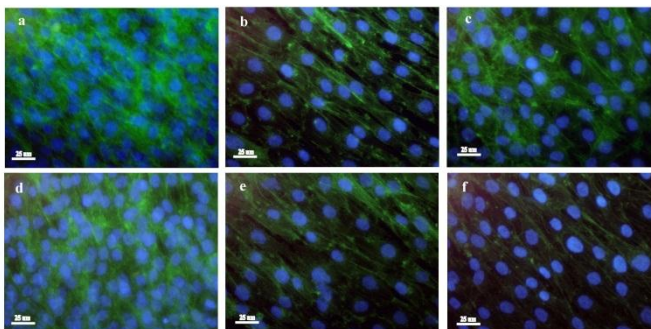


Fig. 13: Celule osteoblast-like cultivate timp de 7 zile pe Ti si aliaje de TiAlNb cu acoperiri de nanotuburi TiO₂ calcinate si necaldate; Coloratie Hoechst si faloidina

Celule de osteosarcom uman (MG63) cultivate timp de o saptamana pe Ti si aliaj de TiAlNb
a - proba de Ti, b - proba 4 (nanotuburi TiO₂ calcinate), c - proba 10 (nanotuburi TiO₂ necaldate)
d - aliaj TiAlNb; e - TiAlNb -TiO₂ calcinate; f -TiAlNb -TiO₂ necaldate

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

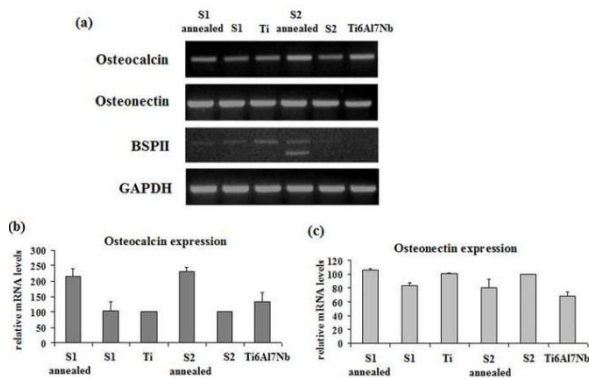


Fig. 14: Expresia genica pentru osteocalcina si osteonectina in celulele liniei MG63 la 7 zile de la insamantarea pe probele de Ti si TiAlNb cu acoperiri de TiO₂ calcinate si necalcinate

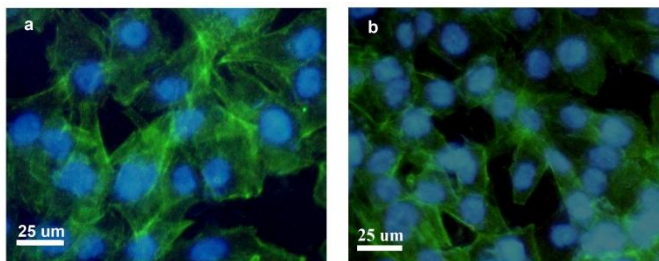


Fig.15: Evidentierea filamentelor de actina (verde) si a nucleilor (bleu) prin microscopie de fluorescanta Celule MG63 cultivate pe (a) TiAlZr si (b) nAg-HA/TiAlZr

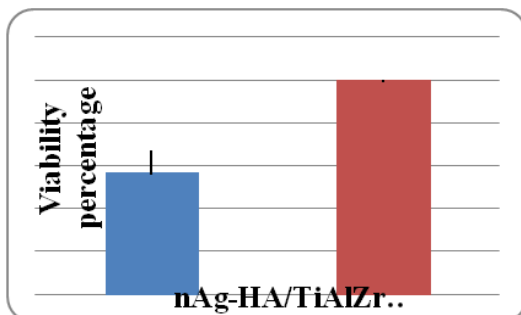


Fig. 16: Viabilitatea celulelor osteoblast like la cinci zile de la insamantarea pe probele de TiAlZr si nAg-HA/TiAlZr

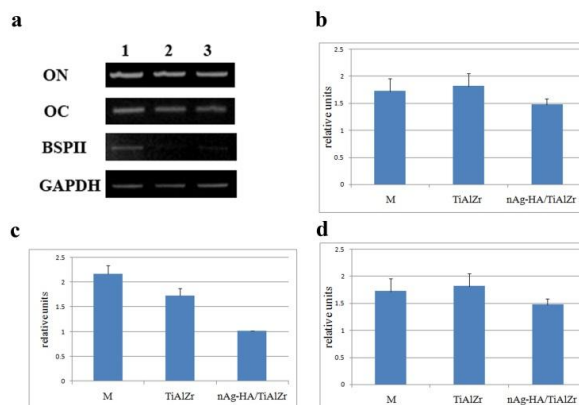


Fig. 17: Expresia genica pentru osteocalcina si osteonectina in celulele liniei MG63 la 7 zile de la insamantarea pe probele de Ti si TiAlNb cu acoperiri de TiO₂ calcinate si necalcinate; a – imaginea unui gel reprezentativ, cuantificarea expresiei genice pentru osteonectina (b), osteocalcina (c) si BSP II (d)

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

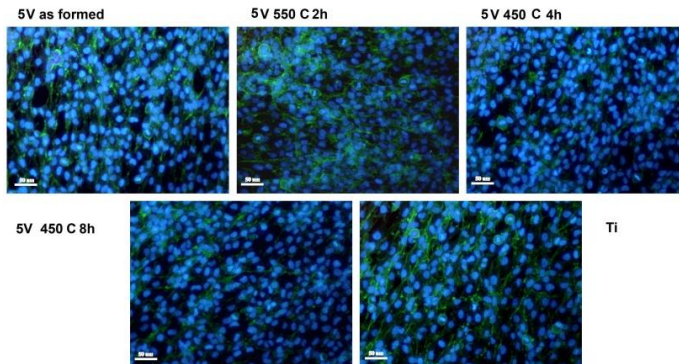


Fig. 18: Morfologia celulelor osteoblast-like la 5 zile de la insamantarea pe probele de Ti cu acoperiri depuse la 5V

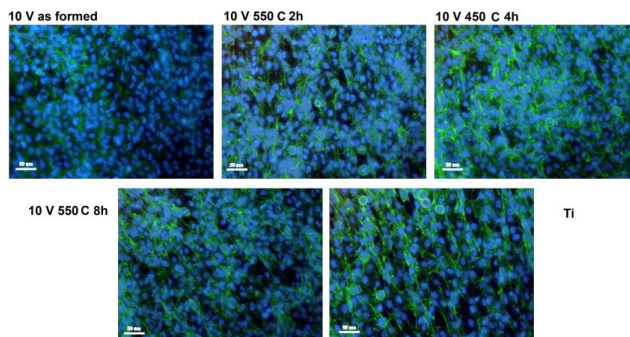


Fig. 19: Morfologia celulelor osteoblast-like la 5 zile de la insamantarea pe probele de Ti cu acoperiri depuse la 10V

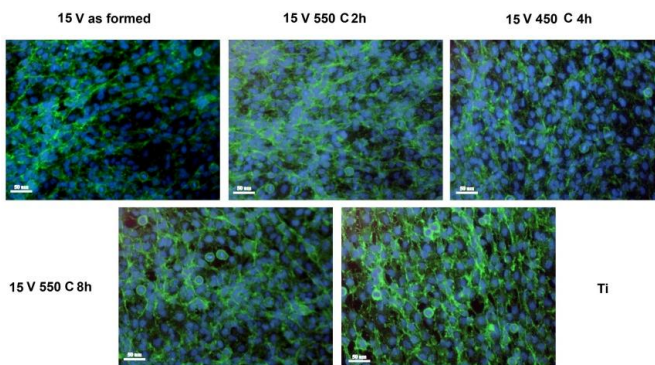


Fig. 20: Morfologia celulelor osteoblast-like la 5 zile de la insamantarea pe probele de Ti cu acoperiri depuse la 15 V

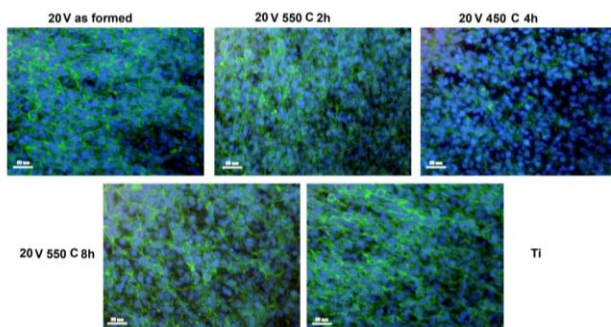


Fig. 21: Morfologia celulelor osteoblast-like la 5 zile de la insamantarea pe probele de Ti cu acoperiri depuse la 20 V

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

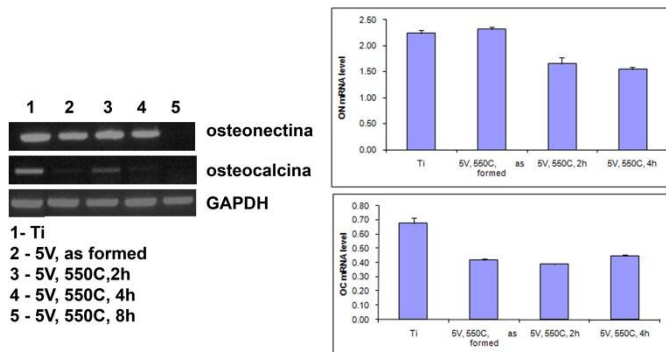


Fig. 22: Expresia genica pentru osteocalcina si osteonectina in celulele liniei MG63 la 7 zile de la insamantarea pe probele de Ti cu depuneri de Glicerol:H₂O(60:40 vol. %) + 0.5 wt.% NH₄F depuse la 5V

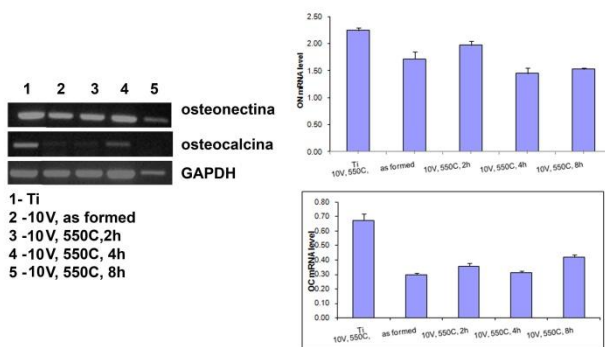


Fig. 23: Expresia genica pentru osteocalcina si osteonectina in celulele liniei MG63 la 7 zile de la insamantarea pe probele de Ti cu depuneri de Glicerol:H₂O(60:40 vol. %) + 0.5 wt.% NH₄F depuse la 10V

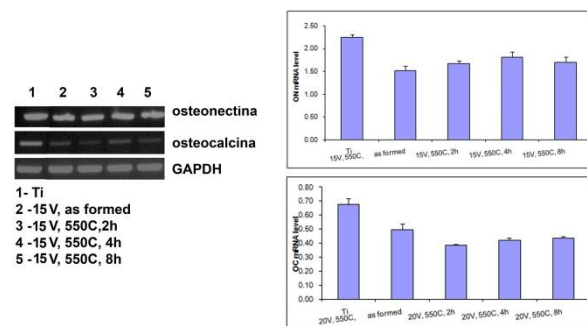


Fig. 24: Expresia genica pentru osteocalcina si osteonectina in celulele liniei MG63 la 7 zile de la insamantarea pe probele de Ti cu depuneri de Glicerol:H₂O(60:40 vol. %) + 0.5 wt.% NH₄F depuse la 15V

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

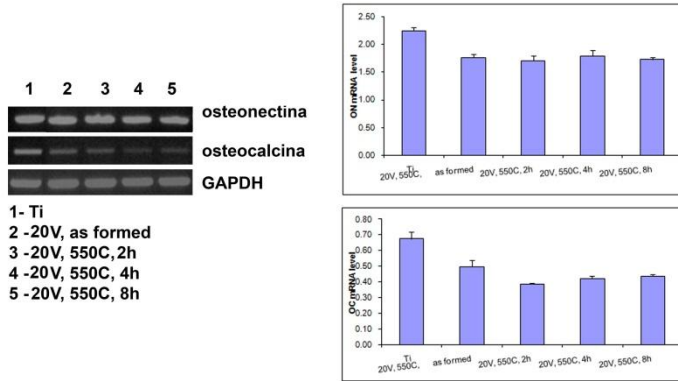


Fig. 25: Expresia genica pentru osteocalcina si osteonectina in celulele liniei MG63 la 7 zile de la insamantarea pe probele de Ti cu depuneri de Glicerol:H₂O(60:40 vol. %) + 0.5 wt. % NH₄F depuse la 20 V

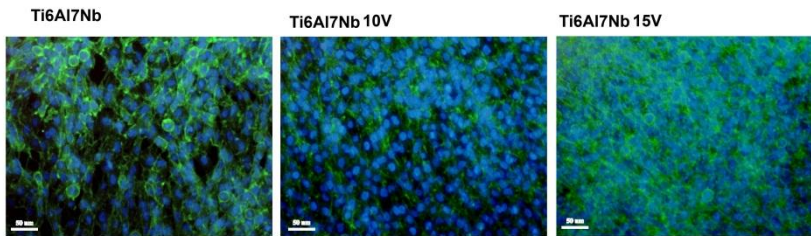


Fig. 26: Morfologia celulelor osteoblast-like la 5 zile de la insamantarea pe probele de TiAlNb cu acoperiri depuse la 10 V si 15V

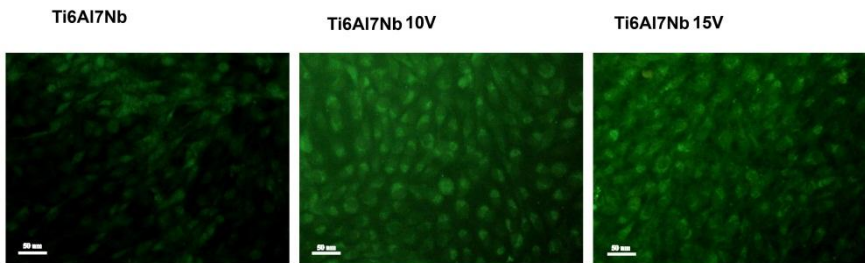


Fig. 27: Viabilitatea celulelor osteoblast-like la 5 zile de la insamantarea pe probele de TiAlNb cu acoperiri depuse la 10 V si 15V

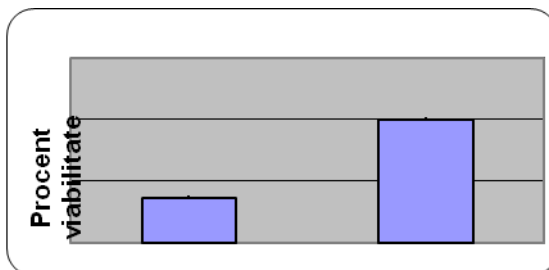
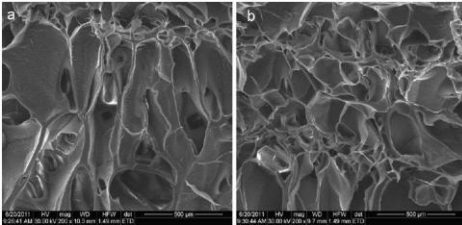


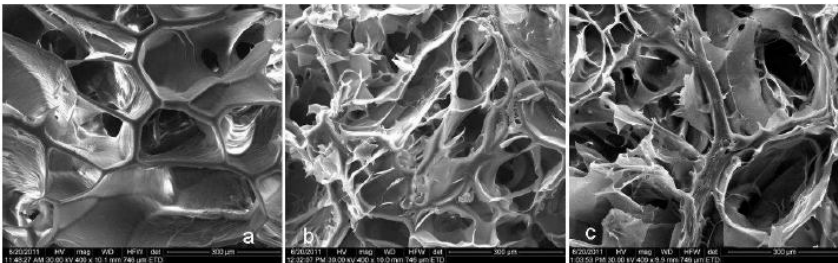
Fig. 28: Viabilitatea celulelor hFOB1.19 la cinci zile de la insamantarea pe probele de Ti cu acoperire de hidroxiapatita

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

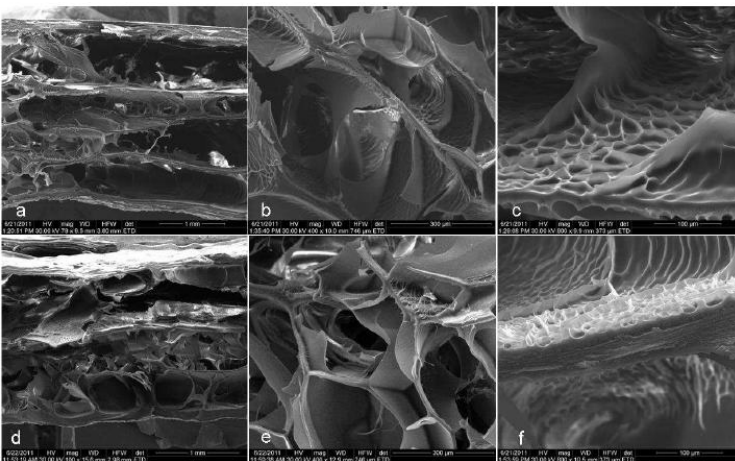
ANEXA III: Rezultate P3



*Fig. 1: Imagini SEM (sect. longit.) pentru materialul A
a – pori longitudinali; b – pori centrali ovoidali*



*Fig. 2: Imagini SEM pentru
arhitectura porilor:
a – B, b – B1, c – B2.*



*Fig. 3: Imagini SEM images pentru
hidrogelurile poroase C (a; b; c) și C1 (d;
e; f)*

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

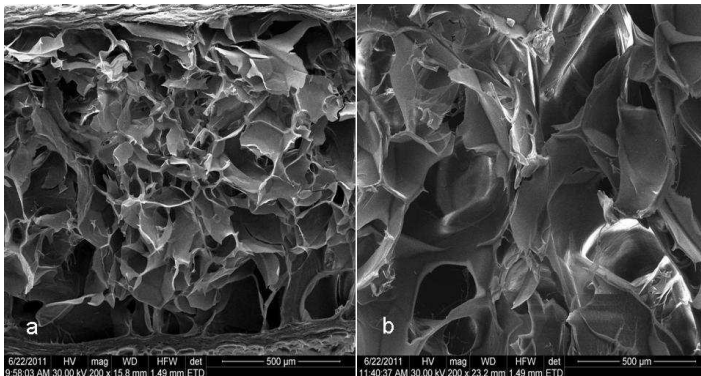


Fig. 4: Imagini SEM reprezentand morfologia suporturilor C2 (a) si C3 (b)

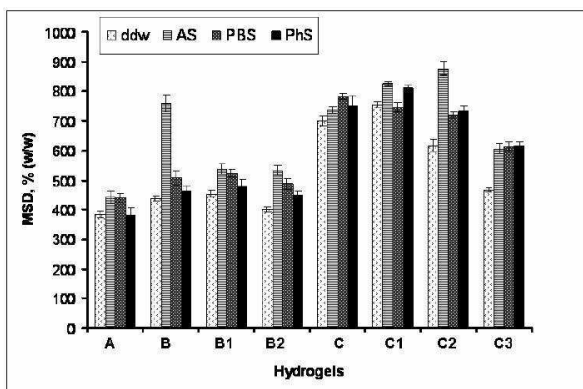


Fig. 5: Gradul de gonflare maxim pentru suporturile poroase investigate

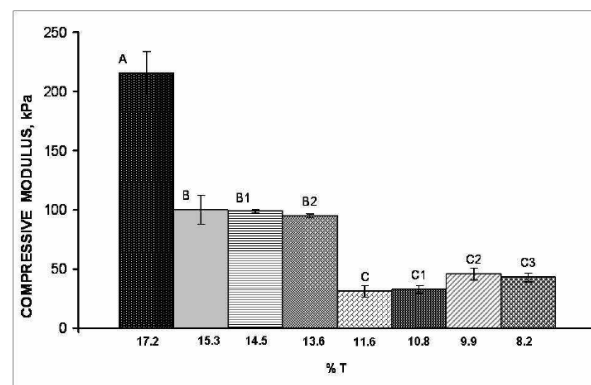


Fig. 6: Efectul %T asupra modulului de compresiune (RT, deformare 10%)

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

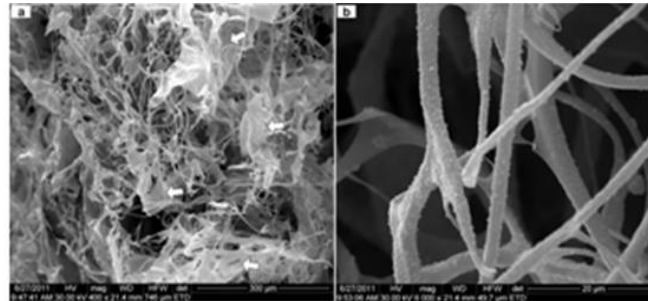


Figura 7: imagine SEM pentru suport poros Coll

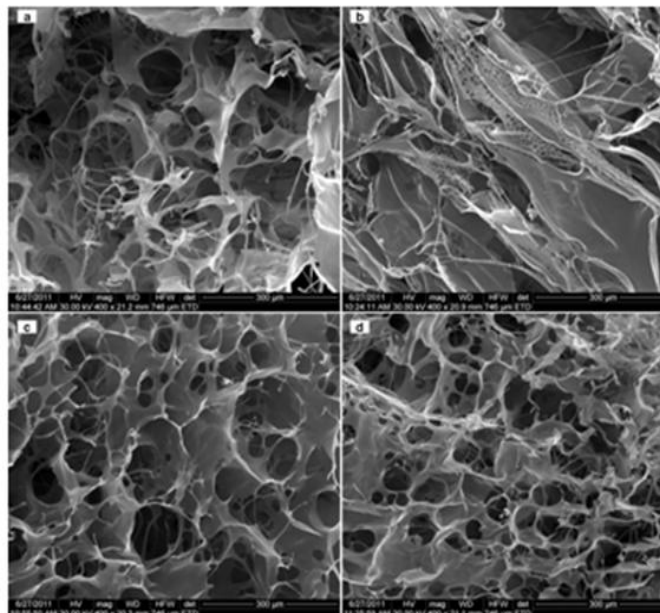


Figura 8. Imagini SEM pentru a) si b) Coll-SS1, c) Coll-SS2, (d) Coll-SS3

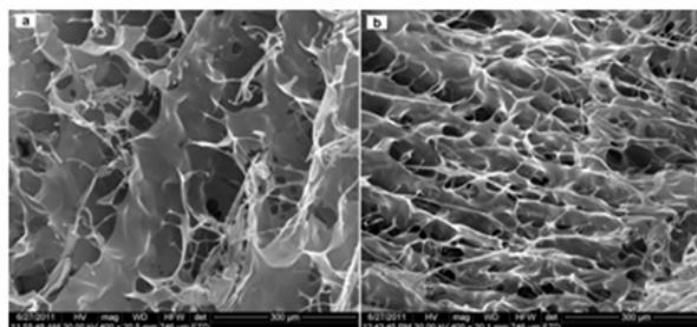


Figura 9. Morfologie SEM pentru materialul Col-SS4 (a) si Coll-SS5 (b)

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

ANEXA IV:
Rezultate P4

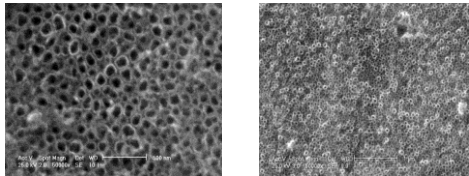


Fig. 1: Imaginile micrografice SEM pentru: A) nanotuburi de TiO₂ obținute în (NH₄)₂SO₄ 1 M + NH₄F 0.5 wt% (electrolit 1) și B) în glicerină + 4 % H₂O + NH₄F 0.36 wt %, (electrolit2)

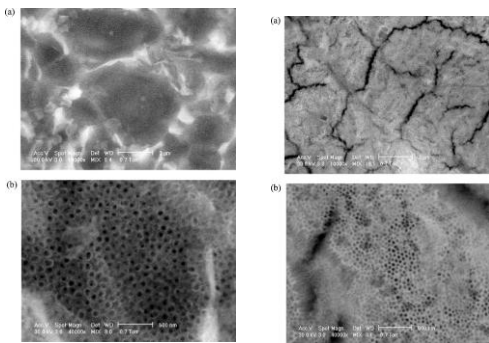


Fig. 2: Structuri poroase formate atat in faza α cat si in faza β: a) la scala 2μm si b) la scala 500nm (faza α este intunecata si faza β este stralucitoare)

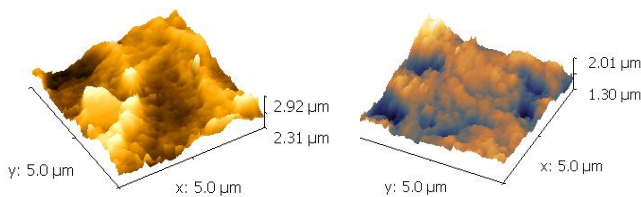


Fig.3: Imaginile tri-dimensionale: a) filmul de oxid obținut din (NH₄)₂SO₄ 1 M + NH₄F 0.5 wt % și b) obținut din glicerină 4 % H₂O + NH₄F 0.36 wt %

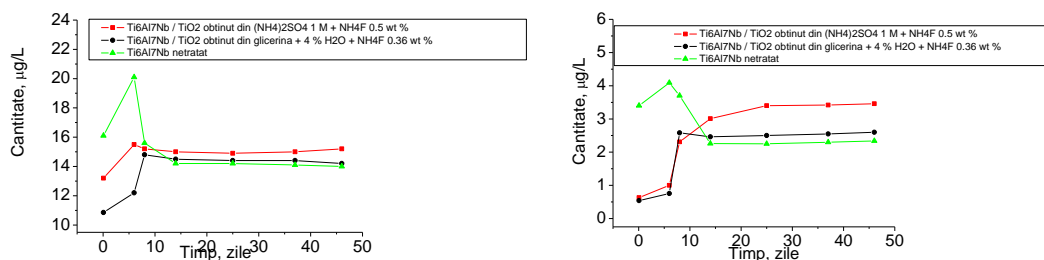


Fig. 4: Cantitatea ioni Ti si Al eliberată în soluție Hank din electrodul Ti6Al7Nb tratat și netratat

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

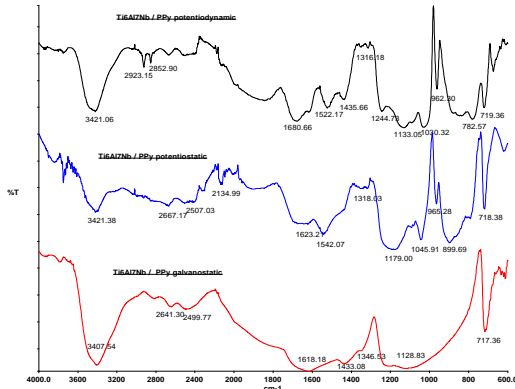


Fig.5: Spectrul FT-IR pentru filmele de PPy electrodepusse din electrolit apos de acid oxalic 0.2 M prin trei metode electrochimice

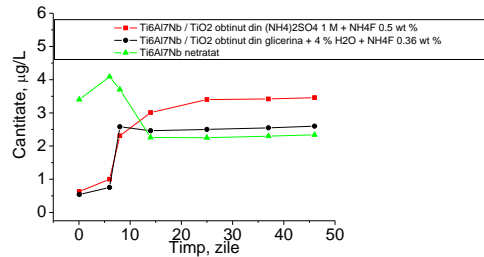
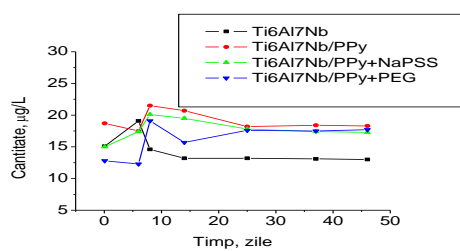


Fig. 6: Cantitatea ionilor metalici de Ti si de Al din electrodul Ti6Al7Nb netratat și acoperit cu filme polimerice în soluție fiziologică Hank la 37°C

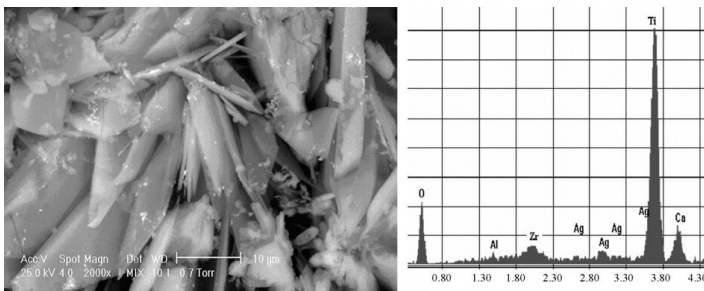


Fig. 7: Imagine SEM insotita de spectrul EDS a suprafetei n-AgTiAlZr

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

ANEXA V: Rezultate P5

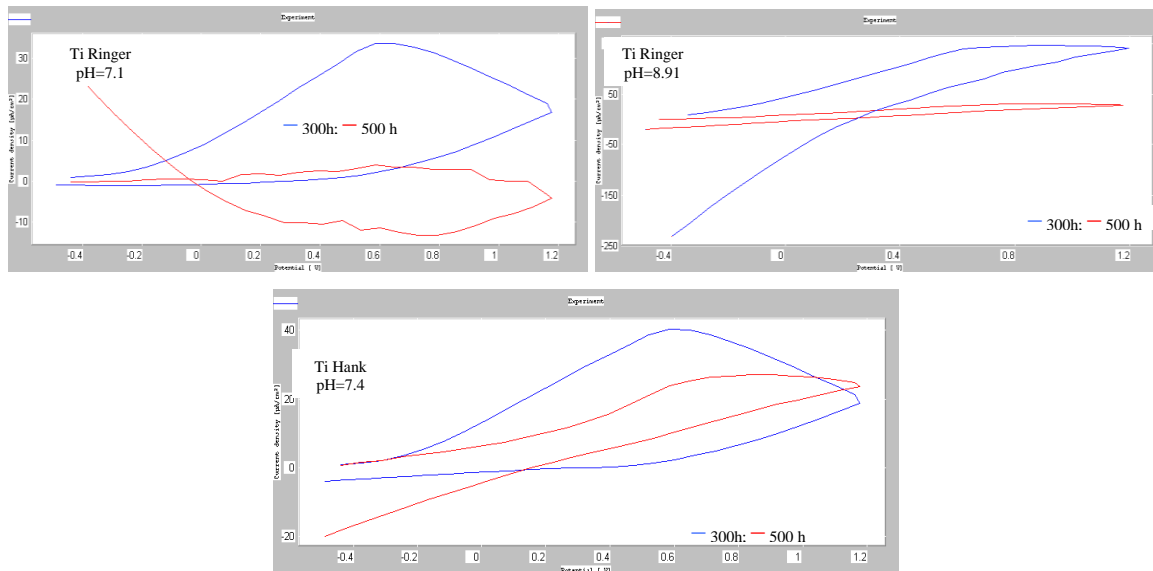


Fig. 1: Curbele de voltametrie ciclică pentru filmele obținute pe suport de Ti, în soluții fiziologice

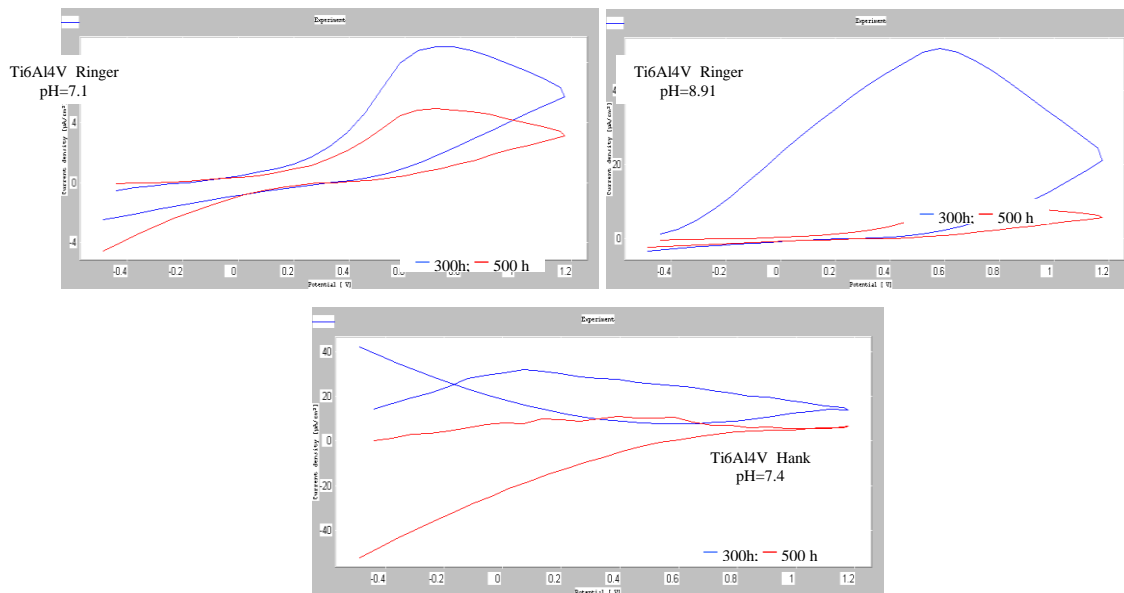


Fig. 2: Curbele de voltametrie ciclică pentru filmele obținute pe suport de aliaj Ti6Al4V ELI, în soluții fiziologice

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

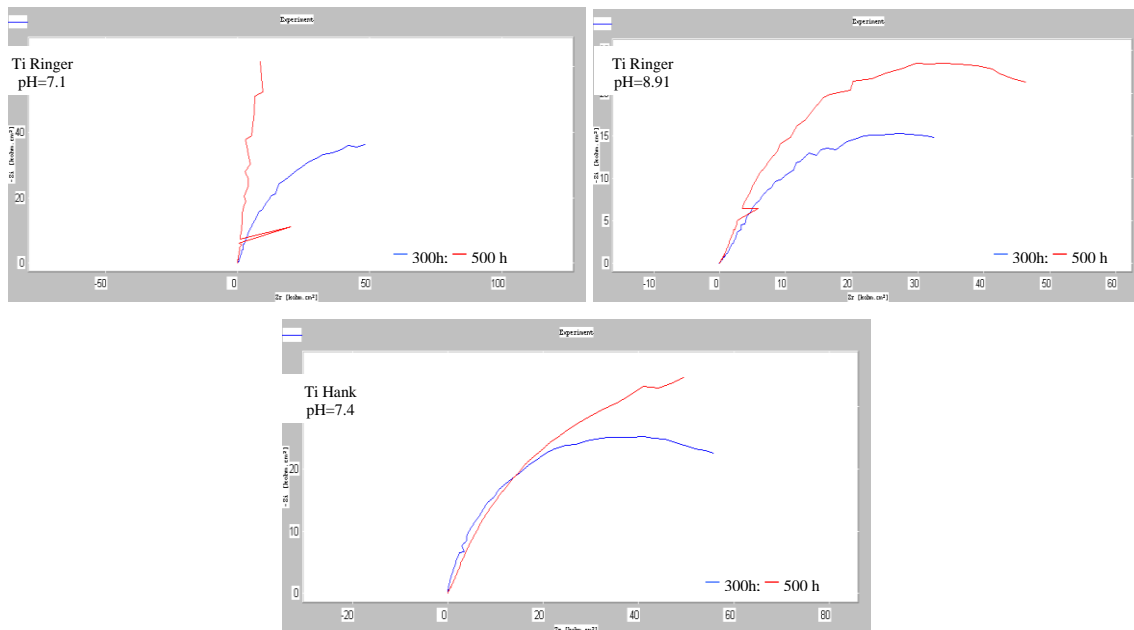


Fig. 3: Spectre Nyquist pentru filmele obținute pe suport de Ti, în soluții fiziologice

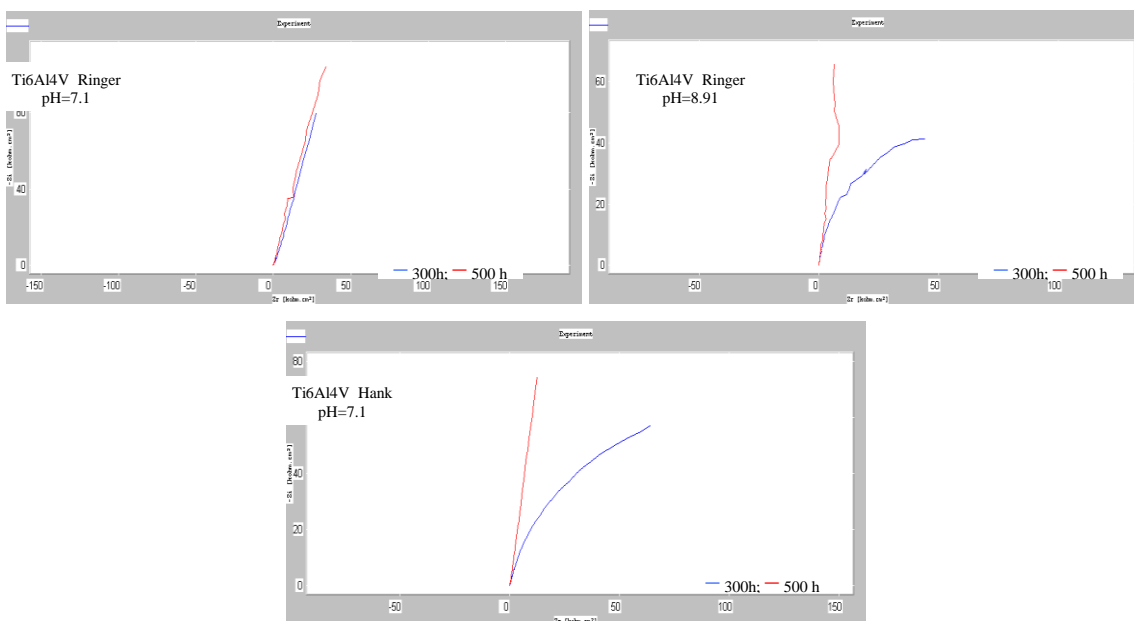


Fig. 4: Spectre Nyquist pentru filmele obținute pe suport de aliaj Ti6Al4V ELI, în soluții fiziologice

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

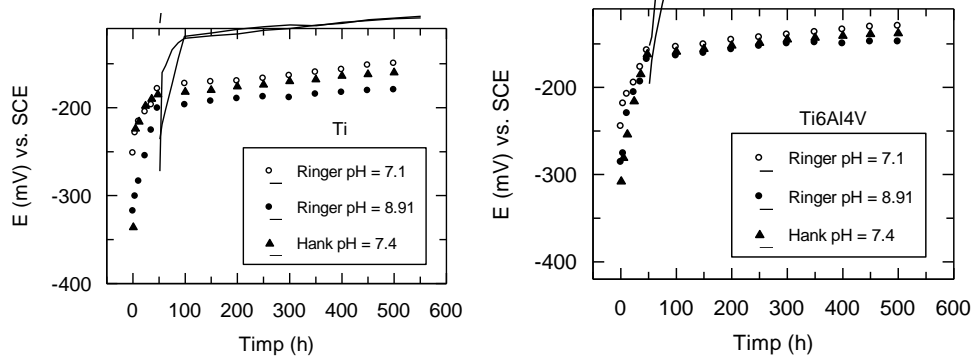


Fig. 5: Variația în timp a potențialelor în circuit deschis pentru filmele obținute pe suport de Ti și Ti6Al4V, în soluții fiziologice

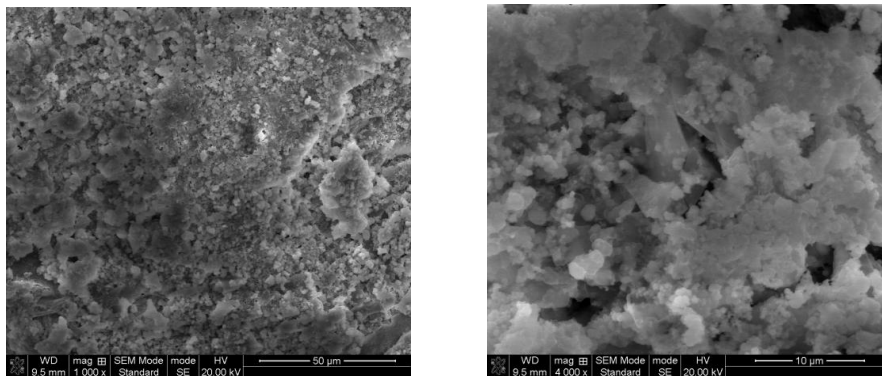


Fig. 6: Micrografii SEM pentru suprafața activată a suportului de Ti, imersat în soluție Ringer de pH = 7,1 timp de 500 h

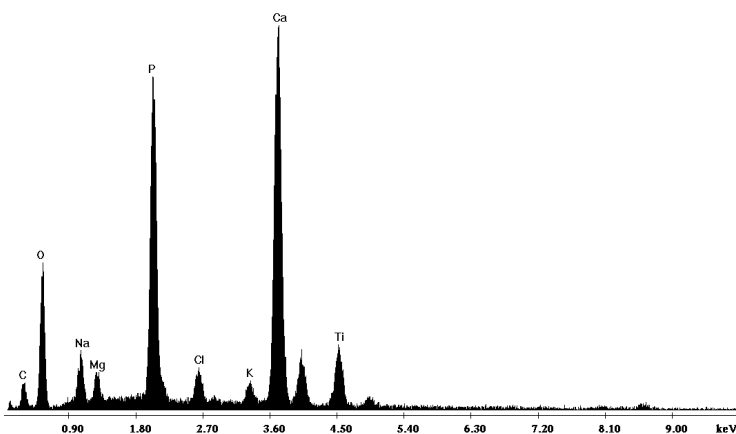


Fig. 7: Analiza elementală EDX pentru suprafața activată a suportului de Ti, imersat în soluție Ringer de pH = 7,1 timp de 500 h

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

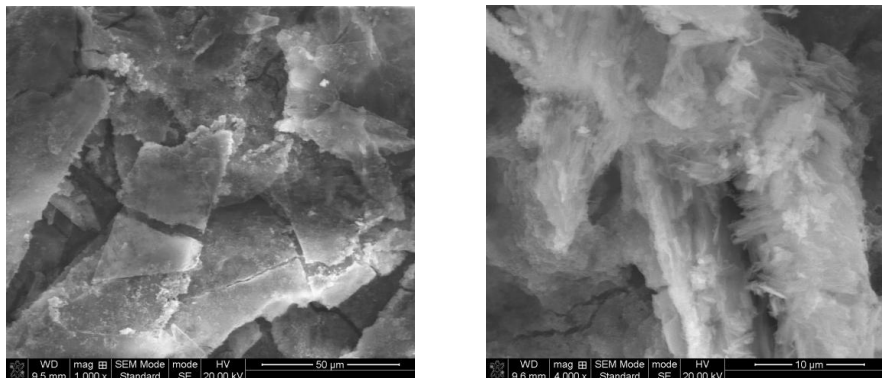


Fig. 8. Micrografii SEM pentru suprafața activată a suportului de aliaj Ti6Al4V, imersat în soluție Ringer de pH = 7,1 timp de 500 h

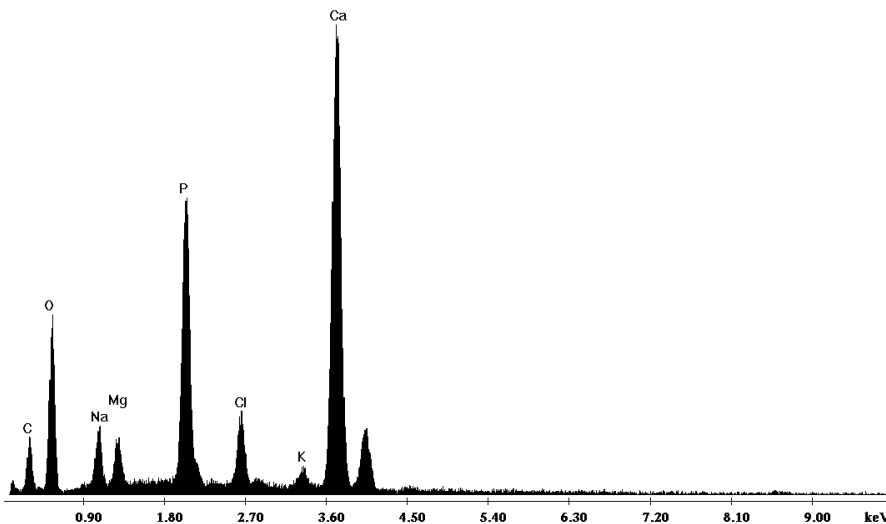


Fig. 9: Analiza elementală EDX pentru suprafața activată a suportului de aliaj Ti6Al4V, imersat în soluție Ringer de pH = 7,1 timp de 500 h

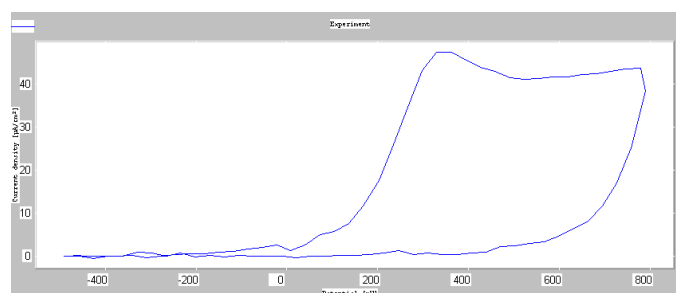


Fig. 11. Curbe de voltametrie ciclică pentru filmele pasive activate de pe suprafața aliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta în soluție Ringer pH = 7,1, la 37°C

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

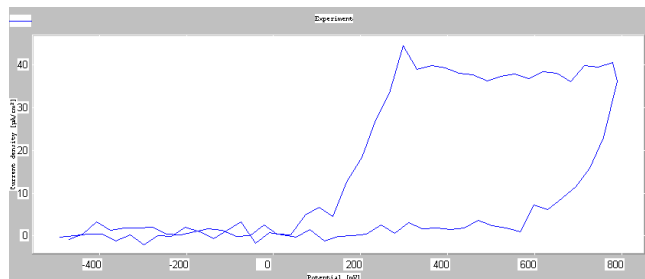


Fig. 12. Curbe de voltametrie ciclică pentru filmele pasive activate de pe suprafața aliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta în soluție Ringer pH = 8,91, la 37°C

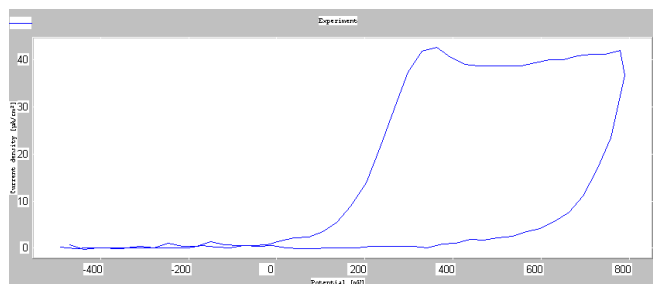


Fig. 13. Curbe de voltametrie ciclică pentru filmele pasive activate de pe suprafața

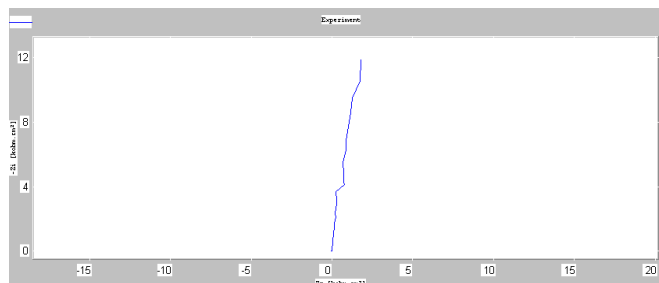


Fig. 14. Curbă Nyquist pentru filmele pasive activate de pe suprafața aliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta în soluție Ringer pH = 7,1, la 37°C

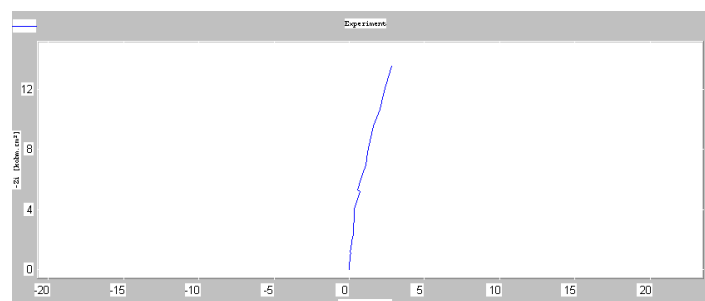


Fig. 15. Curbă Nyquist pentru filmele pasive activate de pe suprafața aliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta în soluție Ringer pH = 8,91, la 37°C

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

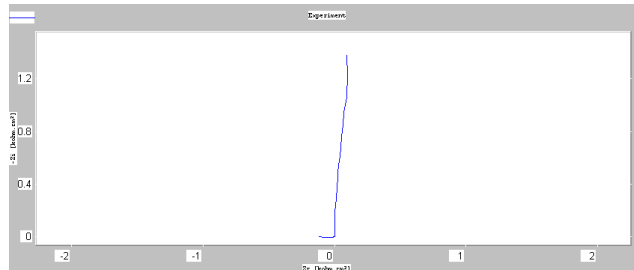


Fig. 16. Curbă Nyquist pentru filmele pasive activate de pe suprafața aliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta în soluție Ringer-Brown pH = 7,2, la 37°C

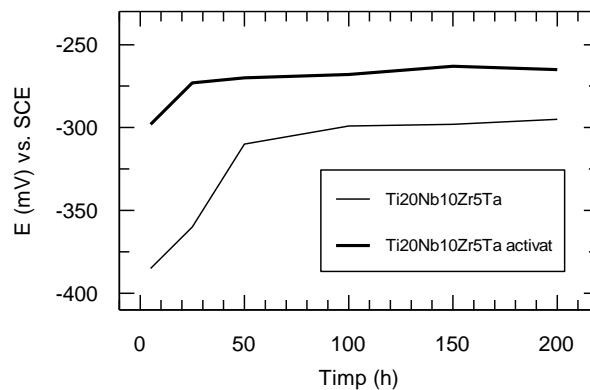


Fig. 17. Monitorizarea potențialelor în circuit deschis pentru filmele pasive activate de pe suprafața aliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta în soluție Ringer pH = 7,1, la 37°C

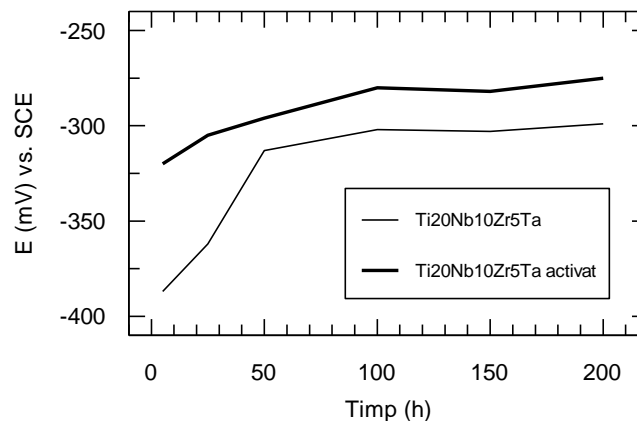


Fig. 18. Monitorizarea potențialelor în circuit deschis pentru filmele pasive activate de pe suprafața aliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta în soluție Ringer pH = 8,91, la 37°C

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

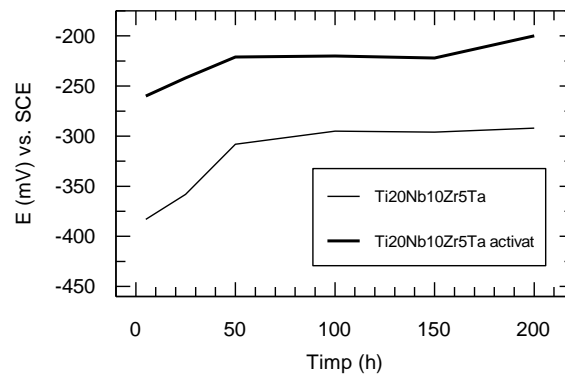


Fig. 19. Monitorizarea potențialelor în circuit deschis pentru filmele pasive activate de pe suprafața aliajului Ti-20Nb-10Zr-5Ta în soluție Ringer-Brown pH = 7,2, la 37°C

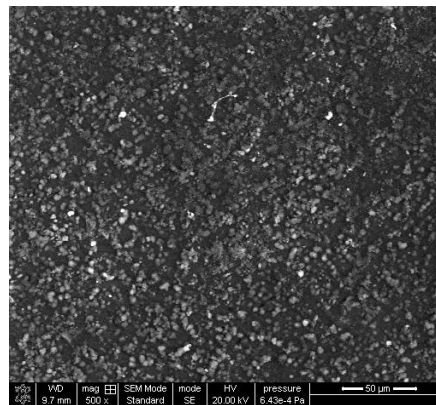


Fig. 20. Micrografie SEM a suprafeței activate a suportului de aliaj Ti-20Nb-10Zr-5Ta

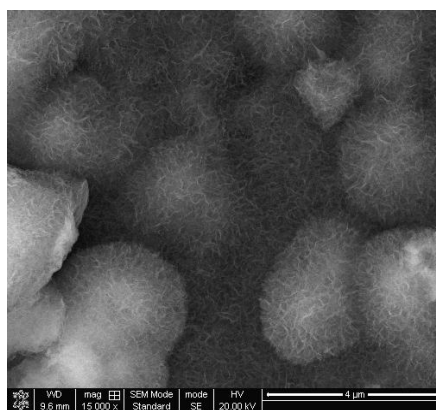


Fig. 21. Micrografie SEM a suprafeței activate a suportului de aliaj Ti-20Nb-10Zr-5Ta

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

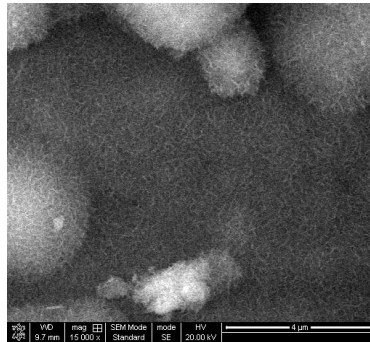


Fig. 22. Micrografie SEM a suprafeței suprafeței activate a suportului de aliaj Ti-20Nb-10Zr-5Ta

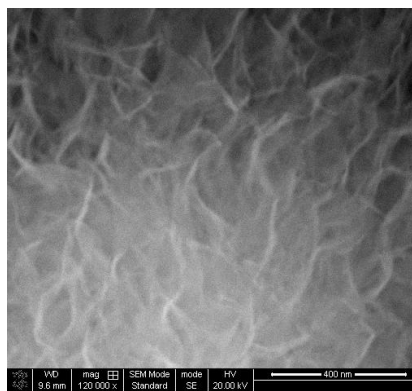


Fig. 23. Micrografie SEM a suprafeței suprafeței activate a suportului de aliaj Ti-20Nb-10Zr-5Ta

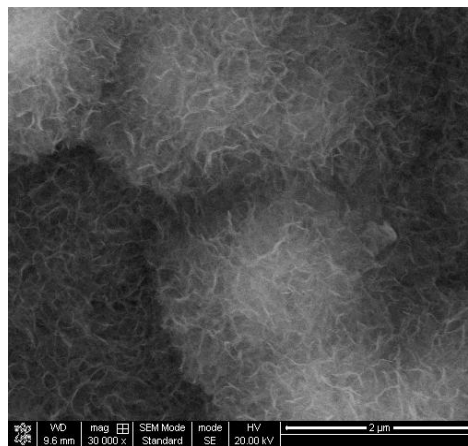


Fig. 24. Micrografie SEM a suprafeței suprafeței activate a suportului de aliaj Ti-20Nb-10Zr-5Ta procesată chimic după 48 ore de imersie în soluție Ringer de pH = 7,1

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

ANEXA VII: Rezultate P7

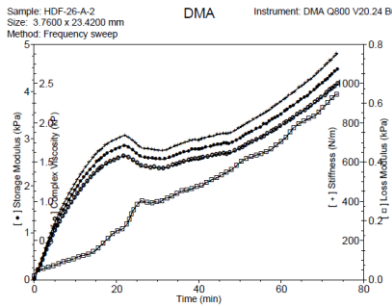


Fig.1: Hidrogel realizat prin introducerea într-o soluție 1,5 % de alginat de Na a unei suspensii de CaCO₃ în acid gluconic (format DGL și apă)

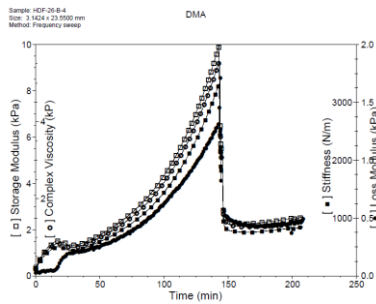


Fig.2: Hidrogel format prin introducerea CaCO₃ și GDL într-o soluție 1.5 % alginat de sodiu

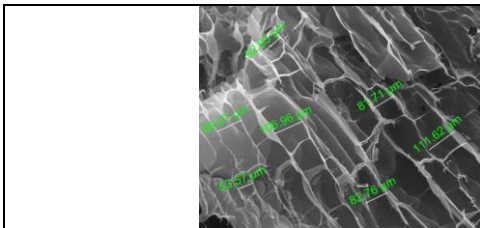


Fig. 3: Hidrogel format prin amestecarea soluției de alginat de Na cu DGL și CaCO₃

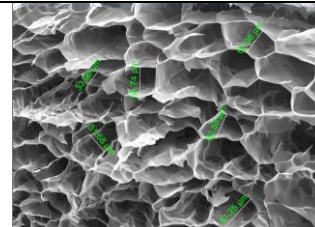


Fig. 4: Hidrogel format prin suspendarea CaCO₃ în acid gluconic (amestecare DGL cu apă)

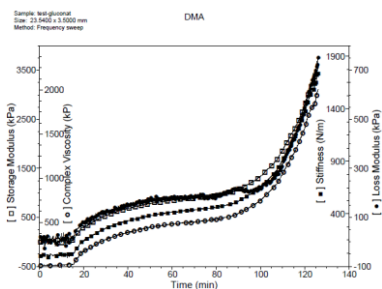


Fig. 5: Hidrogel realizat prin controlul fizic al migrării ionilor de calciu (difuzie gluconat de calciu prin hartie de filtru cod albastru)

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

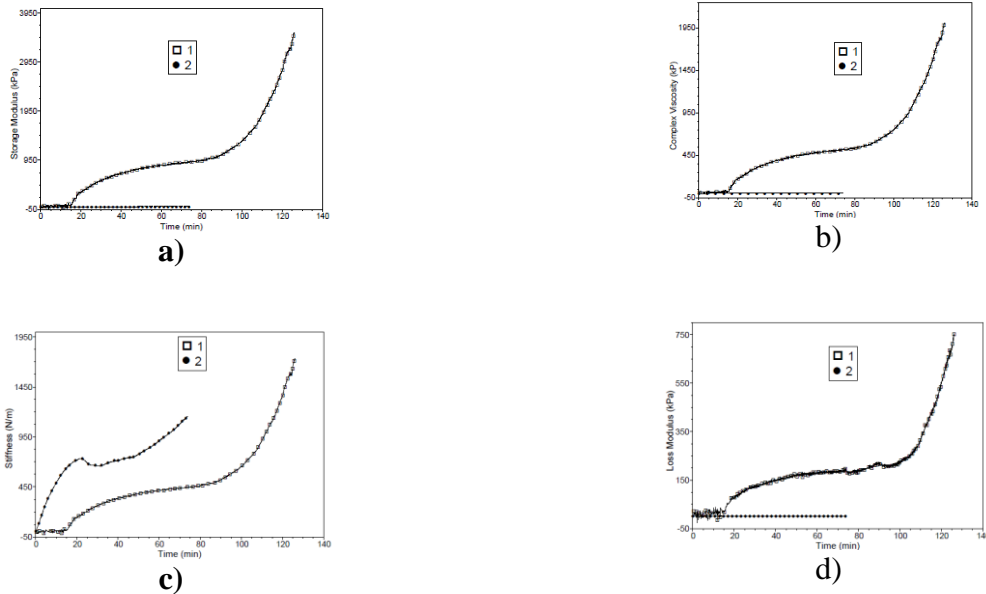


Fig. 6: Compararea proprietatilor DMA a hidrogelurilor pe baza de alginat realizate prin controlul chimic (cod 1) si fizic (cod 2) al migrarii ionilor de calciu in masa solutiei de alginat (a- modul de stocare; b) vascozitate complexa; c) rigiditate; d) modul de pierdere)

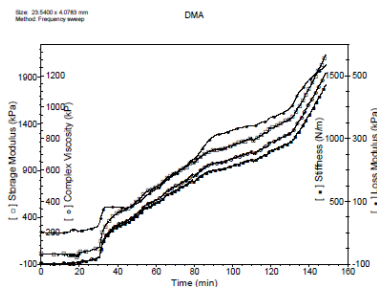
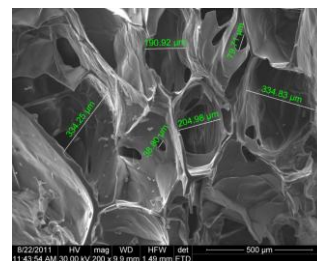
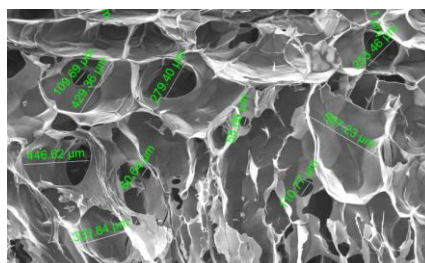


Fig. 7: Hidrogel realizat prin control fizic al migrarii ionilor de calciu (furnizor CaCl₂)



a) solutie de alginat in apa b) solutie de alginat in ser
Fig.nr.8 Morfologia "egg – box" a hidrogelurilor de alginat

“DEPARTAMENTUL DE BIOCHIMIE SI BIOLOGIE MOLECULARĂ”, Facultatea de Biologie, Universitatea din București, Splaiul Independenței 91-95, sector V, Cod 050095; ☎, 📠+021 31815 75; <http://dbbm.bio.unibuc.ro>

✉ marietacostache@yahoo.com; marietacostache@gmail.com;
costache@bio.unibuc.ro

UNIVERSITATEA DIN BUCURESTI
FACULTATEA DE BIOLOGIE

*formate prin controlul fizic al migrării ionilor de calciu
proveniti de la glucionatul de calciu*

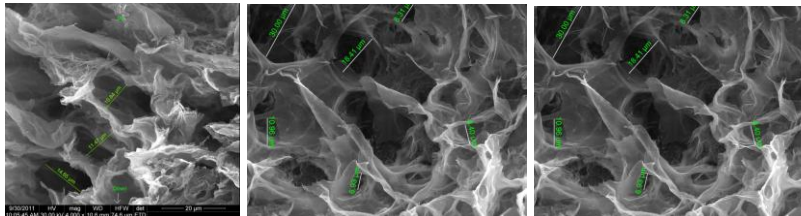


Fig.9: Morfologia “egg – box” a hidrogelurilor formate prin controlul fizic al migrării ionilor de calciu (furnizor CaCl2)

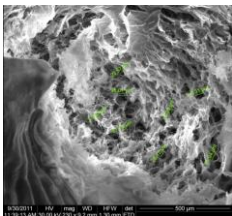


Fig. 10: Dimensiunea medie a celulele elementare a morfologiilor “egg – box” ale hidrogelurilor de alginate tip “picatura” (beads)

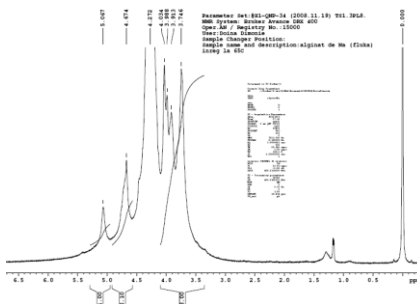


Fig. 11: Spectrul RMN al alginatului de sodiu folosit in lucrarile efectuate