



Universitatea Babeș-Bolyai
Cluj-Napoca
Școala Doctorală
de Fizică



Universitatea de Științe
Agricole și Medicină
Veterinară Cluj-Napoca
Școala Doctorală de
Medicină Veterinară



RADU ANGELIN MARIAN POPESCU

**CERCETĂRI PRIVIND OPTIMIZAREA *IN VITRO* ȘI *IN VIVO* A
UNOR MATERIALE BIOACTIVE SILICATICE ÎN VEDEREA
APLICĂRII ACESTORA ÎN INGINERIA TISULARĂ**

- REZUMAT TEZĂ DE DOCTORAT -

CONDUCĂTORI ȘTIINȚIFICI:
CONF. DR. HABIL. LUCIAN BAIA
PROF. DR. IONEL PAPUC

CLUJ-NAPOCA

-2017-

Cuprins

INTRODUCERE	5
1. ELEMENTE FUNDAMENTALE DE OSTELOGIE	6
2. BIOMATERIALE ÎN INGINERIA ȚESUTULUI OSOS	7
Selecția materialelor	8
Scopul tezei	10
3. METODE DE SINTEZĂ	11
3.1 Sinteza sticlelor prin metoda sol-gel.....	11
3.2 Sinteza nanoparticulelor de aur și stabilizarea lor cu Pluronic F-127	11
3.3 Sinteza de scaffold-uri din sticle bioactive.....	11
3.4 Sinteza materialului compozit (polimer-sticlă bioactivă)	11
4. METODE DE INVESTIGARE	12
4.1 Metode de investigare structurală și morfologică.....	12
4.1.1 <i>Difracția de raze X (XRD)</i>	12
4.1.2 <i>Spectroscopia de absorbție în infraroșu (FT-IR)</i>	12
4.1.3 <i>Spectrometria în ultraviolet și vizibil (UV-Vis)</i>	12
4.1.4 <i>Microscopia electronică de baleiaj (SEM)</i>	12
4.1.5 <i>Spectrometria cu energie dispersivă de raze X (EDX)</i>	12
4.1.6 <i>Microscopia electronică de transmisie (TEM)</i>	12
4.1.7 <i>Rezonanța electronică paramagnetică/de spin (EPR)</i>	12
4.1.8 <i>Spectroscopia fotoelectronică prin raze X (XPS)</i>	12
4.1.9 <i>Suprafață specifică și volum de pori</i>	12
4.1.10 <i>Spectrometria de masă-cu plasmă cuplată inductiv (ICP-Q-MS)</i>	12
4.1.11 <i>Spectroscopia de fluorescență</i>	12
4.2 <i>Teste in vitro</i>	12
4.2.1 <i>Bioactivitatea</i>	12
4.2.2 <i>Biocompatibilitatea</i>	12
4.2.3 <i>Eliberarea ionică</i>	12
4.2.4 <i>Activitatea antibacteriană</i>	12
4.2.5 <i>Viabilitatea și proliferarea celulară</i>	12
4.2.6 <i>Sterilizarea probelor</i>	12
4.3 <i>Teste in vivo</i>	12

4.3.1	<i>Selecția materialului biologic</i>	12
4.3.2	<i>Proceduri chirurgicale</i>	12
4.3.3	<i>Dozarea osteocalcinului seric</i>	12
4.3.4	<i>Managementul durerii</i>	12
4.3.5	<i>Imagistică medicală</i>	12
4.3.6	<i>Fotografie digitală</i>	12
4.3.7	<i>Metoda Necropsică</i>	12
4.3.8	<i>Metoda Histologică</i>	12
5.	SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA UNOR STICLE SILICATICE DOPATE CU DIFERITE CONCENTRAȚII DE OXID DE ARGINT (Ag₂O) ÎN VEDEREA UTILIZĂRII ACESTORA ÎN INGINERIA ȚESUTULUI OSOS	13
5.1	Rezultate și discuții	13
5.1.1	Caracterizarea structurală	13
5.1.2	Testarea bioactivității	14
5.1.3	Testarea viabilității celulare	15
5.1.4	Testarea proliferării celulare după includerea materialului bioactiv într-o structură polimerică (Alg-PII)	15
5.2	Concluzii	16
6.	SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA UNOR STICLE SILICATICE DOPATE CU DIFERITE CONCENTRAȚII DE NANOPARTICULE DE AUR (Au NP) ÎN VEDEREA APLICĂRII ACESTORA ÎN INGINERIA TISULARĂ	17
6.1	Rezultate și discuții	17
6.1.1	Caracterizarea structurală	17
6.1.2	Testarea bioactivității	18
6.1.3	Testarea biocompatibilității	19
6.1.4	Viabilitatea celulară	20
6.2	Concluzii	21
7.	SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA UNOR STICLE SILICATICE CU ADAOS DE OXID DE CUPRU (CuO) ÎN VEDEREA APLICĂRII LOR ÎN INGINERIA ȚESUTULUI OSOS	22
7.1	Rezultate și discuții	22
7.1.1	Caracterizarea structurală	22
7.1.2	Testarea bioactivității	24
7.1.3	Eliberarea ionică	25
7.1.4	Activitatea antibacteriană	26
7.1.5	Testarea biocompatibilității	27
7.1.6	Viabilitatea celulară	27

7.2 Concluzii	28
8. SINTEZA, CARACTERIZAREA, TESTAREA <i>IN VITRO</i> ȘI IMPLANTAREA <i>IN VIVO</i> A UNUI COMPOZIT PE BAZĂ DE POLIMER-STICLĂ BIOACTIVĂ (Alg-Pil-CuOBG) ÎN SCOP EXPERIMENTAL ȘI COMPARATIV.....	29
8.1 Rezultate și discuții	29
8.1.1 Caracterizarea structurală.....	29
8.1.2 Viabilitatea celulară	30
8.1.3 Biocompatibilitate <i>in vitro</i> - <i>in vivo</i>	30
8.1.4 Evaluare imagistică <i>in vivo</i>	32
8.1.5 Evaluare histopatologică.....	32
8.3 Concluzii	33
9. CONCLUZII FINALE ȘI PERSPECTIVE.....	34
9.1 Concluzii finale	34
9.2 Perspective.....	34
BIBLIOGRAFIE.....	35

INTRODUCERE

Milioane de pacienți din întreaga lume suferă în fiecare an pierderi importante de țesut osos datorate diverselor boli, traumatisme sau afecțiuni congenitale, de cele mai multe ori acestea conducând la dizabilități premature și la reducerea calității vieții bolnavilor [1–3]. Aproximativ 500.000 de intervenții chirurgicale de grefare de țesut osos sunt realizate anual în Statele Unite ale Americii și peste 2,3 milioane la nivelul întregii lumi, acestea fiind destinate în principal reparării defectelor în ortopedie, chirurgie cranio-maxilo-facială și neurochirurgie [3,4]. Aceste cifre vor crește exponențial în următorii 10 - 15 ani, datorită dublării populației americane cu vârsta de peste 65 de ani [5] și creșterii speranței de viață a populației întregii lumi.

Ingineria țesutului osos se concentrează pe procesele de regenerare ale țesutului natural. Osul, complex bine vascularizat, indică faptul că ingineria acestui țesut este un domeniu interdisciplinar bazat pe combinarea a trei componente principale: celulele, moleculele semnalizatoare și o structură artificială macroporoasă (suport microscopic sau scaffold) ce acționează ca o construcție temporară de suport, creștere și proliferare celulară. Scaffold-urile mimează matricea extracelulară și trebuie să ofere proprietăți mecanice potrivite și o porozitate adecvată pentru a da posibilitatea de creștere și vascularizare a țesutului [6]. În mod ideal, materialul creat nu trebuie să posede doar osteoconductivitate, ci și osteoinductivitate și trebuie să fie biodegradabil.

Prezenta teză este structurată în 9 capitole, alături de subcapitolele aferente. Primele două capitole reprezintă stadiul actual al cunoașterii în domeniul temei abordate, fragmente ce încearcă să pună în valoare importanța deosebită a creării și aplicării unor structuri bioactive viabile, cu scopul final de a vindeca mai rapid și mai eficient un țesut lezionat. Obiectivele proiectului pun în lumină abordarea pe care autorul și colaboratorii au avut-o asupra întregii lucrări, secțiunea de metode de sinteză și metode de investigare descriind în detaliu complexitatea și diversitatea planului de lucru atât prin prisma unor tehnici de caracterizare structurală, cât și prin unele tehnici experimentale *in vitro* și *in vivo*. Secțiunea de rezultate, cuprinde 4 studii distincte, care accentuează definitiv scopul acestei lucrări, în timp ce în capitolul de concluzii și perspective sunt detaliate neajunsurile întâmpinate și nevoia unei evoluții în proiectele ce vor urma.

1. ELEMENTE FUNDAMENTALE DE OSTEOLOGIE

Structural, osul compact este un material dens și complex ce se delimitează prin unități de bază numite osteoni. Fiecare osteon cuprinde lamele concentrice osoase ce înconjoară un canal central numit canal Haversian [7,8]. Lamelele de os sunt alcătuite dintr-o matrice (organică și minerală) și celule specializate numite osteocite. Această matrice este formată din fibre de colagen, cristale de fosfat de calciu și o substanță fundamentală ce conține în principal mucopolizaharide [9,10]. Osul din diferite părți ale scheletului diferă în ceea ce privește proporția și dispunerea colagenului, fosfatului de calciu și cementului fundamental, astfel se disting două tipuri osoase cum sunt osul spongios (trabecular) și osul compact [11]. Osul este considerat un țesut conjunctiv foarte specializat, format pe baza unor țesuturi mai puțin specializate printr-un proces numit osificare, osteogeneză sau mai simplificat formare osoasă [10]. În timpul formării osoase anumite celule modificate ale țesutului conjunctiv numite osteoblaste, produc un material la început amorf, mai târziu acesta devenind dens-fibros fiind numit osteoid. Cristalele de fosfat de calciu sunt apoi depuse în osteoid, transformându-l într-o matrice [9,11]. Osteoblastele tind să fie capturate în propria secreție și pe măsură ce matricea se întărește în jurul lor, acestea devin osteocite.

2. BIOMATERIALE ÎN INGINERIA ȚESUTULUI OSOS

Milioane de proteze ortopedice fabricate din materiale bioinerte, au fost implantate primind o garanție de funcționare de aproximativ 15 ani, în 75 până la 85% din cazuri. Aliajele metalice îmbunătățite (titan, oțel inoxidabil 316L, 420, 440), polimerii și ceramicile de nivel înalt (ZrO_2 , Al_2O_3) sunt motivul pentru care aceste instrumente medicale de succes au ameliorat calitatea vieții a milioane de pacienți din întreaga lume [12–17]. Totuși, o creștere accelerată a speranței de viață în rândul populației globale, necesită o perioadă de funcționare a unor astfel de dispozitive medicale, mai mare de 30 de ani [14,18]. Astfel, pentru a satisface această nevoie, a fost propusă o schimbare de direcție care presupune susținerea regenerării țesuturilor lezionate în schimbul înlocuirii acestora cu materiale substituente inerte. O asemenea schimbare, de la o abordare de tip material-biomecanism, la o regenerare tisulară biologică, necesită o înțelegere mult mai profundă a biologiei moleculare [19]. În utilizarea clinică curentă pot fi descrise trei categorii de materiale după cum urmează: resorbabile, bioactive și inerte.

Răspunsul biologic exercitat asupra unei sticle bioactive sintetizate prin sol-gel după formula $CaO-P_2O_5-SiO_2$ furnizează dovezi că regenerarea osoasă este posibilă. Moleculele biologice pot realiza schimburi cu straturile hidratate ale materialului poros, menținându-și conformația și activitatea biologică [17,20–22].

Abordarea nanotehnologiei în ingineria medicală, a fost propusă pentru o gamă largă de aplicații biomedicale, utilizând termenul de nanomedicină. Nanoștiința și nanotehnologia reprezintă două noțiuni atractive în raport cu medicina regenerativă și ingineria tisulară deoarece, în primă fază, interacțiunea dintre celulă și biomaterial se realizează la nivel nano (ex. $< 100nm$) [23]. La scală nanometrică, proprietățile care determină interacțiunile de tip celulă-biomaterial, cum sunt, suprafața specifică, porozitatea, hidrofilicitatea și umectabilitatea, proprietăți ce influențează adeziunea celulară și oferă fuziunea cu țesutul gazdă, sunt fundamental diferite față de cele la scală micrometrică [24,25].

Pentru țesutul osos, fuziunea cu sticla bioactivă are loc datorită echivalenței biologice dintre componenta anorganică osoasă și stratul de HAC format pe suprafața materialului [26]. În ceea ce privește țesutul moale, fibrele de colagen sunt chemoresorbite de stratul poros bogat în SiO_2 , prin forțe electrostatice, interacțiuni ionice sau legături de hidrogen. În acest caz HA este precipitată și cristalizată pe fibrele de colagen și pe suprafața sticlei [27].

Termenul de scaffold, definește o structură (suport macroscopic) sintetizată artificial cu scopul de a susține și promova regenerarea tisulară fiziologică. În general, scaffold-urile au fost gândite și concepute pentru utilizarea în ingineria țesutului osos. Astfel de structuri sunt fabricate de regulă din materiale degradabile, poroase, care pot asigura suportul mecanic necesar pe parcursul reparării și regenerării osului afectat [28,29].

În cazul scaffold-urilor bioactive, este necesar a se putea controla solubilitatea materialului. Un material cu o solubilitate redusă este necesar, dacă scaffold-ul este conceput să reziste un timp îndelungat. O rată de disoluție controlată este indispensabilă în cazul sintetizării unui scaffold destinat augmentării osoase, cu un material precum 45S5 Bioglass® [18,30]. Prin urmare, o înțelegere fundamentală a factorilor care influențează solubilitatea și

bioreactivitatea reprezintă un element cheie pentru dezvoltarea de noi materiale ce pot îmbunătăți regenerarea tisulară *in situ* [31–33].

Limitările metodelor convenționale au dus la utilizarea tehnologiilor de prototipare rapidă (rapid prototyping technology) (RP), pentru perfecționarea modelului inițial și fabricarea unor scaffold-uri 3D cu rețele poroase interconectate. În ultimii ani, tehnicile computerizate de ierarhizare (CTD și SFF) au permis proiectarea unor structuri anatomice, cu o arhitectură poroasă, care pot menține echilibrul între funcții și rezistența mecanică. Astfel de metode au facilitat fabricarea unor schele controlate, din polimeri, hidrogeluri, ceramici și chiar din metale biocompatibile [34].

Prin urmare, provocarea majoră în dezvoltarea unui scaffold, stă în primul rând în alegerea unei combinații potrivite de biomateriale, cu un bagaj necesar de proprietăți. Acest domeniu este încă deschis unor idei și încercări noi prin care să poată fi creată cea mai potrivită structură, care să conțină întreaga paletă de caracteristici indispensabile unei substituții eficiente de țesut, *in vivo*.

Selecția materialelor

- **Argint**

Acest element, în concentrații moderate, este binecunoscut pentru calitățile sale antimicrobiene, împotriva unui spectru larg de bacterii Gram pozitive și Gram negative, fungi, protozoare și anumite tipuri de virusuri [35,36]. Argintul este de asemenea eficient împotriva tulpinilor rezistente și a bacteriilor implicate în infecțiile intraspitalicești, postoperatorii [37,38]. Acest metal, cu binecunoscutele lui proprietăți antiseptice, a fost utilizat de-a lungul timpului în fabricarea unor largi varietăți de materiale cum sunt sticlele bioactive, aliajele de titan și polimerii [36,39,40].

- **Aur**

Aurul, metalul considerat cel mai prețios de multe civilizații antice, și-a făcut loc și în procedurile medicale, din vechime și până în prezent, cucerind numeroase domenii, de la industria farmaceutică la cea oncologică [41,42].

Cu toate că aurul este un metal nobil și un material des utilizat datorită rezistenței lui la oxidare, proprietăților fizice, optice, magnetice și electrice, el poate forma o multitudine de alți compuși. Stările de oxidare ale aurului, în diverșii lui compuși, variază de la -1 la +5, dominante fiind totuși Au(I) și Au(III).

Nanoparticulele de aur s-au dovedit a fi materiale atractive pentru aplicații în biologie și medicină, în principal datorită proprietăților lor fizice și chimice. Ca și adjuvant în ingineria tisulară, aurul și AuNP, joacă un rol important, având capacitatea de a potența sau chiar de a adăuga noi caracteristici, materialelor destinate regenerării tisulare [43]. Astfel, aceste nanostructuri sunt considerate în momentul de față cele mai stabile NP metalice [44,45].

- **Cupru**

Similar argintului, cuprul, este de asemenea folosit de mii de ani în domenii precum cel alimentar și medical. Numeroase studii sugerează că prin introducerea ionilor de Cu^{2+} într-o matrice bioactivă, este posibilă îmbunătățirea angiogenezei prin stabilizarea expresiei factorului de inducție al hipoxiei (HIF-1 α) [46]. Acest factor, joacă un rol extrem de important atât în recrutarea și diferențierea celulară, cât și în formarea vaselor sangvine [47,48]. Cuprul reprezintă un co-factor esențial, activator al unui număr însemnat de proteine, însă homeostazia acestuia trebuie îndeaproape controlată [49]. Excesul sau administrarea defectuoasă a acestui element, poate duce la o toxicitate celulară deosebită datorită reacțiilor redox accidentale, catalizate de cuprul liber [50].

Ionii de cupru au fost raportați ca fiind cea mai activă specie în ceea ce privește acțiunea antibacteriană [51,52]. Reactivitatea crescută la contactul cu bacteriile sau celulele, se datorează migrării Cu^{2+} în mediul înconjurător [53].

- **Alginatul de sodiu**

Alginatul este un biopolimer întâlnit în algele marine, cu precădere în algele brune (*Phaeophyceae*) [54]. Acesta este extras din peretele celular al ierburilor de mare, prin tratarea cu soluții apoase alcaline, în mod frecvent cu NaOH. Extractul este filtrat și apoi, în prezența anumitor cationi divalenți (Ca^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+}) alginatul precipită. În urma purificării este obținut alginatul de sodiu solubil în apă [55–57].

Alginatul este activ utilizat de zeci de ani în industria alimentară și în ultimii ani, ca și material de bază în ingineria tisulară [54]. În ultimul timp, acest polimer natural este considerat de cercetători unul dintre cele mai indicate materiale pentru formarea de scaffold-uri compozite, datorită îndeplinirii tuturor caracteristicilor amintite anterior, în plus el este și non-imunogenic, o proprietate deosebit de importantă când este luată în calcul activitatea acestuia *in vivo* [54,55]. Cu toate acestea, alginatul prezintă și câteva dezavantaje cum ar fi degradarea enzimatică deficitară în organismul mamiferelor și neaderența celulară naturală [58,59]. În ultimul deceniu, aceste neajunsuri au fost studiate pentru a putea fi depășite, ajutând la valorificarea mult mai intensă a hidrogelurilor pe bază de alginat [60].

- **Pullulan**

Pullulanul este un polimer (exopolizaharid) natural, liniar și neramificat, produs în principal de fungul *Aureobasidium Pullulans* [61]. Structura acestui compus constă în principal din unități legate α -1,6 maltotriose (G3) (Fig. 2.4.4.1). Aceste unități repetitive G3 conțin două legături glicosidice α -1,4 [62]. Pullulanul conține nouă grupări hidroxil pe fiecare unitate repetitivă din structura sa, oricare dintre acestea putând fi înlocuite fără efort de altă grupare chimică, pentru a-i potența proprietățile de suprafață [63,64]. Proprietățile mecanice excelente ale acestui exopolizaharid alături de biocompatibilitate, hemocompatibilitate, hidrofilicitate, non-mutagenicitate și non-toxicitate, îl fac un material promițător în ingineria tisulară [65–68]. Singura limitare a acestui polimer este incapacitatea acestuia de a furniza o suprafață pe care celulele să adere și să prolifereze în mod natural și eficient [69]. Totuși, acest neajuns a fost depășit prin diverse tehnici de depunere a HA pe suprafață, încorporarea în structură a unor mici grupuri funcționale (arginină-glicină-aspartat) sau combinarea cu polimeri recunoscuți de celule (gelatină, colagen) [70–73].

Scopul tezei

Scopul principal al acestei teze de doctorat a fost conceperea unui material care pe de o parte să îndeplinească criteriile de bază apărute în literatura de specialitate referitoare la structură, bioactivitate și biocompatibilitate, iar pe de altă parte să reușească să completeze câteva din neajunsurile prezente în momentul de față în ingineria țesutului osos.

3. METODE DE SINTEZĂ

3.1 Sinteza sticlelor prin metoda sol-gel

Precursorii utilizați în sinteza primelor două compoziții au fost tetraetilortosilicatul (TEOS), trietilfosfatul (TEP), nitratul de calciu tetrahidrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), nitratul de cupru trihidrat ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) și nitratul de argint (AgNO_3). Hidroliza a fost efectuată în prezența acidului azotic (HNO_3), iar raportul molar între $(\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O})/(\text{TEOS} + \text{TEP})$ a fost egal cu 8. Stabilizarea probelor s-a efectuat prin tratament termic, la o temperatură de 600°C .

3.2 Sinteza nanoparticulelor de aur și stabilizarea lor cu Pluronic F-127

AuNP au fost sintetizate prin metoda Turkevich-Frens [74]. Pe scurt, acidul cloroauric a fost dizolvat în apă ultrapură până la o concentrație a soluției de 10^{-3}M , iar apoi soluția a fost adusă la punctul de fierbere sub agitare continuă. Apoi, $38,8 \times 10^{-3}$ citrat trisodic a fost adăugat rapid în soluție, într-un raport volumic de 10:1. Procesele de fierbere și agitare au continuat apoi pentru încă 30 de minute, iar apoi, coloidul a fost răcit la temperatura camerei. AuNP obținute au fost stabilizate cu Pluronic F127 prin simpla amestecare a soluției coloidale cu soluția polimerică, până la o concentrație finală de $0,5 \times 10^{-3}\text{M}$.

3.3 Sinteza de scaffold-uri din sticle bioactive

Polimerul PVA a fost dizolvat în apă ultrapură. Ulterior, în soluția obținută, a fost adăugată matricea silicatică ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$). În amestecul obținut au fost imersate pentru câteva minute bucăți cubice de burete polimeric, cu diametrul de 1 cm. Aceste matrițe au fost apoi uscate la 60°C pentru 4 h iar apoi a fost repetat procedeul de imersare, pentru a produce o dublă acoperire. În final, probele obținute au fost uscate la 60°C pentru 24 h. Schema de tratament termic a presupus o perioadă totală de 16 h.

3.4 Sinteza materialului compozit (polimer-sticlă bioactivă)

Pentru a obține soluția polimerică cu o concentrație finală de 4% (w/v), cei doi polimeri au fost dizolvați în apă ultrapură, la o temperatură de 80°C , sub agitare continuă. Materialul bioactiv a fost adăugat în amestecul obținut, până s-a obținut o concentrație de 0,5% sticlă [75,76]. Soluția compozit a fost picurată într-o soluție de 4% clorură de calciu, fiind obținute capsule cu diametrul de ~2-3 mm.

4. METODE DE INVESTIGARE

4.1 Metode de investigare structurală și morfologică

4.1.1 *Difracția de raze X (XRD)*

4.1.2 *Spectroscopia de absorbție în infraroșu (FT-IR)*

4.1.3 *Spectrometria în ultraviolet și vizibil (UV-Vis)*

4.1.4 *Microscopia electronică de baleiaj (SEM)*

4.1.5 *Spectrometria cu energie dispersivă de raze X (EDX)*

4.1.6 *Microscopia electronică de transmisie (TEM)*

4.1.7 *Rezonanța electronică paramagnetică/de spin (EPR)*

4.1.8 *Spectroscopia fotoelectronică prin raze X (XPS)*

4.1.9 *Suprafață specifică și volum de pori*

4.1.10 *Spectrometria de masă-cu plasmă cuplată inductiv (ICP-Q-MS)*

4.1.11 *Spectroscopia de fluorescență*

4.2 Teste *in vitro*

4.2.1 *Bioactivitatea*

4.2.2 *Biocompatibilitatea*

4.2.3 *Eliberarea ionică*

4.2.4 *Activitatea antibacteriană*

4.2.5 *Viabilitatea și proliferarea celulară*

4.2.6 *Sterilizarea probelor*

4.3 Teste *in vivo*

4.3.1 *Selecția materialului biologic*

4.3.2 *Proceduri chirurgicale*

4.3.3 *Dozarea osteocalcinului seric*

4.3.4 *Managementul durerii*

4.3.5 *Imagistică medicală*

4.3.6 *Fotografie digitală*

4.3.7 *Metoda Necropsică.*

4.3.8 *Metoda Histologică*

5. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA UNOR STICLE SILICATICE DOPATE CU DIFERITE CONCENTRAȚII DE OXID DE ARGINT (Ag_2O) ÎN VEDEREA UTILIZĂRII ACESTORA ÎN INGINERIA ȚESUTULUI OSOS

5.1 Rezultate și discuții

5.1.1 Caracterizarea structurală

Reflexiile obținute prin măsurători de XRD pe probele supuse tratamentului termic de stabilizare dezvăluie o structură preponderent amorfă (Fig. 5.1.1.1 a). Cu toate acestea, în jurul valorii de $2\theta \sim 32^\circ$ se pot observa câteva semnale asociate cu focare de cristalizare, valori specifice, care sugerează formarea fazei fosfatului tricalcic, întâlnit ca $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ [77]. În spectrele FT-IR suprapuse, ale celor 5 compoziții, se pot observa benzi de absorbție caracteristice vibrațiilor de întindere și de îndoire a grupărilor Si-O-Si (1040 și 860 cm^{-1}), (510 cm^{-1}) (Fig. 5.1.1.1 b). Apa este prezentă prin semnalul larg din jurul valorii de 1640 cm^{-1} . Banda de la valoarea de 1440 cm^{-1} indică existența grupării carbonat, iar semnalele de la valorile de 560 și 580 cm^{-1} dovedesc prezența grupărilor fosfat [77].

Spectrele UV-Vis suprapuse, exprimă între valorile 300 și 330 nm un semnal apărut datorită tranziției electronice în specii de Ag metalic (Fig. 5.1.1.1 c) [78]. Acest semnal crește în intensitate, odată cu creșterea concentrației de oxid de argint adăugate [79]. Conform literaturii de specialitate, probele dopate cu Ag, pot dezvălui benzi de rezonanță ale plasmonilor de suprafață, în intervalul $400 - 500 \text{ nm}$, ca o consecință a prezenței AgNP [78,79]. Prin analiza amănunțită a spectrelor noastre, poate fi observată apariția unui semnal de absorbție, cu un maxim în jurul valorii de 420 nm (Fig. 5.1.1.1 c). Acest semnal este cel mai intens la proba cu $x=0.5 \text{ mol\% Ag}_2\text{O}$ și este asociat cu existența AgNP, în matricea silicatică [79]. Forma benzii este asimetrică datorită unui alt semnal al rezonanțelor plasmonice de suprafață al aglomerărilor AgNP, care se suprapune peste semnalul dat de rezonanțele plasmonilor de suprafață ale AgNP izolate. Odată cu creșterea concentrației de argint, se poate observa o ușoară deplasare a benzii de la valoarea de 420 nm la 450 nm , ca o consecință fie a înmulțirii aglomerărilor de AgNP (cluster), fie a creșterii în dimensiune a acestora [78,79].

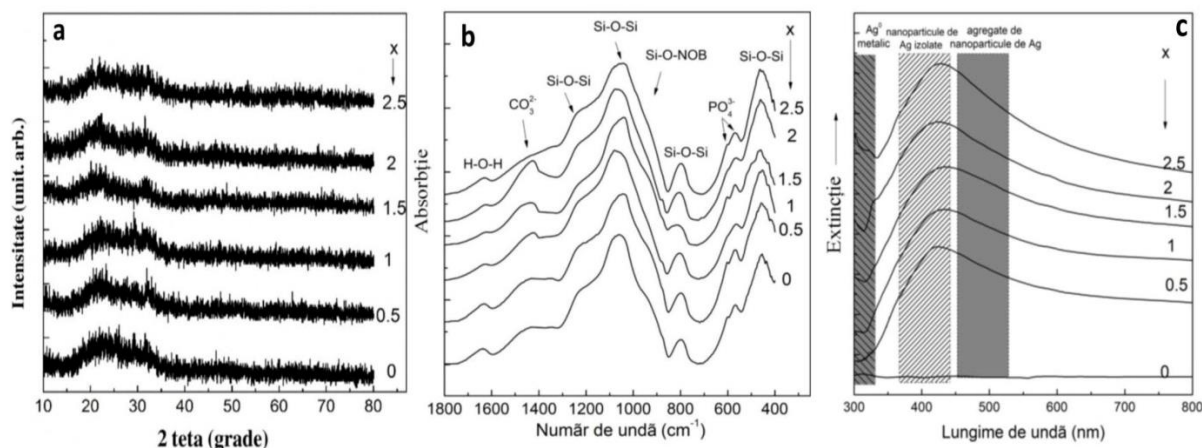


Fig. 5.1.1.1 Măsurătorile XRD (a), spectrele FT-IR (b) și spectrele UV-vis (c) obținute pe probele din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Ag}_2\text{O}$ (mol%).

5.1.2 Testarea bioactivității

După imersarea timp de 7 zile în SBF, difractogramele probelor indică apariția fazei de HA așa cum o dovedesc semnalele înregistrate la $2\theta \sim 26^\circ$ și 32° (Fig. 5.1.2.1 a). De asemenea, se pot observa semnale specifice pentru clorura de argint (AgCl) la $2\theta \sim 46^\circ$. Pentru a se putea face cu ușurință asocierea fazei apatitice și a clorurii de argint, au fost adăugate și difractogramele celor două structuri ca și referințe [80]. Conform literaturii, clorura de argint, în cantități mici, nu are efecte negative asupra mediului biologic, mai mult decât atât, este preferată în detrimentul unei concentrații mari de nanoparticule de argint [81].

În spectrele FT-IR ale probelor imersate în SBF timp de 7 zile, benzile de la valorile de 604 și 564 cm^{-1} arată o intensitate asemănătoare la toate concentrațiile (Fig. 5.1.2.1 b). Acest lucru indică o bună bioactivitate în cazul tuturor probelor [77]. Cu toate acestea, proba cu un conținut de 0.5% mol Ag_2O arată cel mai mare potențial de bioactivitate, luând în considerare și faptul că aceasta prezintă un semnal slab al clorurii de argint.

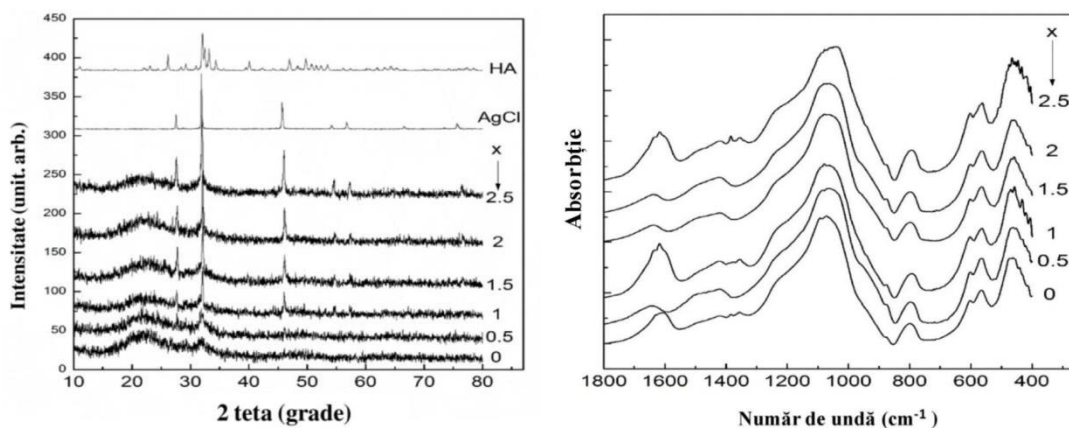


Fig. 5.1.2.1 Difractogramele (a) și spectrele FT-IR (b) ale probelor din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Ag}_2\text{O}$ (mol%), după imersarea în SBF timp de 7 zile.

5.1.3 Testarea viabilității celulare

Viabilitatea în cazul tuturor probelor se situează în jurul valorii de 100%, astfel sugerând o bună compatibilitate cu țesuturile vii. Cea mai bună evoluție o are proba cu un conținut de 0,5 mol% Ag_2O , aceasta prezentând o creștere a proliferației celulare de-a lungul celor 3 concentrații utilizate (75, 150 și 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Fig. 5.1.3.1).

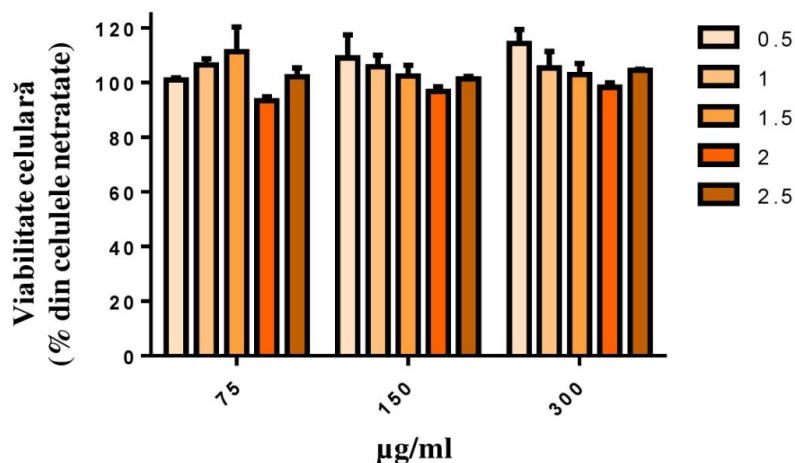


Fig. 5.1.3.1 Diagrama viabilității celulare a probelor din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Ag}_2\text{O}$ (mol%)

5.1.4 Testarea proliferației celulare după includerea materialului bioactiv într-o structură polimerică (Alg-Pll)

Sticlele obținute în urma optimizării structurale, au fost incluse într-un amestec polimeric de alginat și pullulan (Alg-Pll), în vederea obținerii unor materiale care se pretează implantării ulterioare *in vivo*. Prin urmare, scaffold-ul astfel obținut a fost supus unor analize de viabilitate și proliferație celulară, pe două culturi specifice obiectivelor propuse.

Viabilitatea în cazul testării pe cultura de fibroblaste (Fig. 5.1.4.1 a) s-a dovedit a fi diminuată, cu o continuă tendință de scădere de la 24 la 48 de h. Aceste rezultate au pus în dificultate perspectiva utilizării lor în viitoare teste *in vivo*, o astfel de proliferație celulară nefiind compatibilă cu obiectivele propuse.

De asemenea în cazul culturii osteoblastice (Fig. 5.1.4.1 b) rezultatele au fost comparabile cu cele prezentate anterior, probele compozit având o toxicitate ridicată.

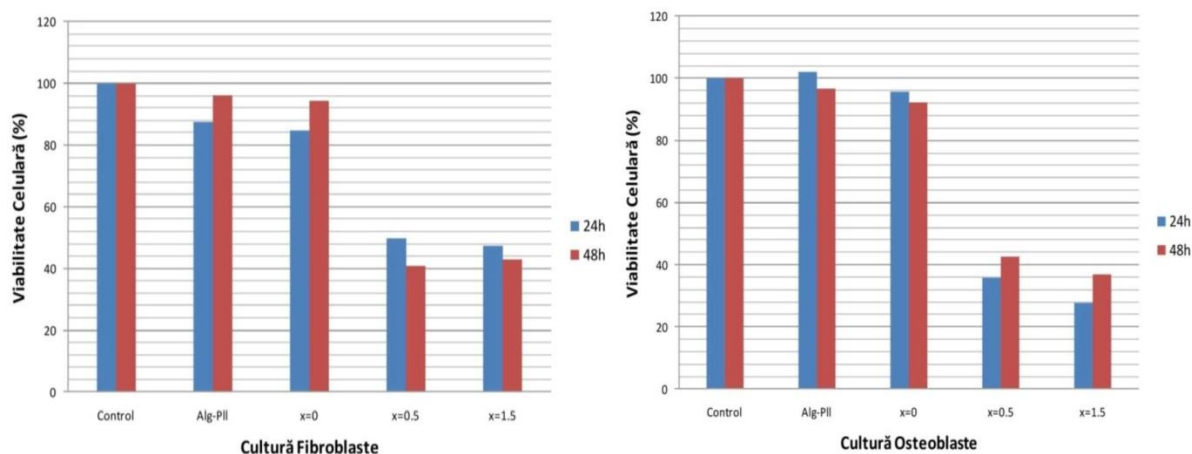


Fig. 5.1.4.1 Diagrama proliferării celulare a probelor Alg-Pil-AgBG pe o cultură de fibroblaste (a) și osteoblaste (b).

5.2 Concluzii

În acest studiu, pe baza formulei primare $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$, a fost sintetizată o paletă largă de compoziții cu conținut variabil de oxid de argint. Difractogramele și spectrele FT-IR și UV-Vis au arătat caracteristici structurale care indică caracterul bioactiv al tuturor probelor investigate. Totuși, concentrațiile de 0,5 și 1,5 mol% Ag_2O s-au remarcat ca fiind cele mai potrivite datorită lipsei formării de AgCl și a caracterului intens bioactiv.

6. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA UNOR STICLE SILICATICE DOPATE CU DIFERITE CONCENTRAȚII DE NANOPARTICULE DE AUR (Au NP) ÎN VEDEREA APLICĂRII ACESTORA ÎN INGINERIA TISULARĂ

6.1 Rezultate și discuții

6.1.1 Caracterizarea structurală

AuNP libere dezvăluie o bandă plasmonică îngustă, în spectrul vizibil, în jurul valorii de 518 nm, caracteristică AuNP individuale, sferice (Fig. 6.1.1.1 a). După stabilizarea cu pluronic, se poate observa o deplasare cu 2 nm a maximului de absorbție (Fig. 6.1.1.1 a – **banda roșie**), care poate fi atribuită modificării indicelui de refracție din imediata apropiere a AuNP, ca o consecință a adsorbției polimerice.

Aceste AuNP au fost introduse într-o matrice de sticlă silicatică. În vederea obținerii unor informații mai amănunțite în ceea ce privește alternarea mărimii și morfologiei nanoparticulelor, în timpul preparării și stabilizării termice, au fost înregistrate și spectre de absorbție UV-vis (Fig 6.1.1.1 b). Deplasarea considerabilă a benzii roșii (de la valoarea de 520 la 536 nm) (Fig. 6.1.1.1 a) indică prezența unor nanoparticule de dimensiuni mai mari. Acest comportament poate fi atribuit agregării/aglomerării NP, după includerea lor în matricea de sticlă.

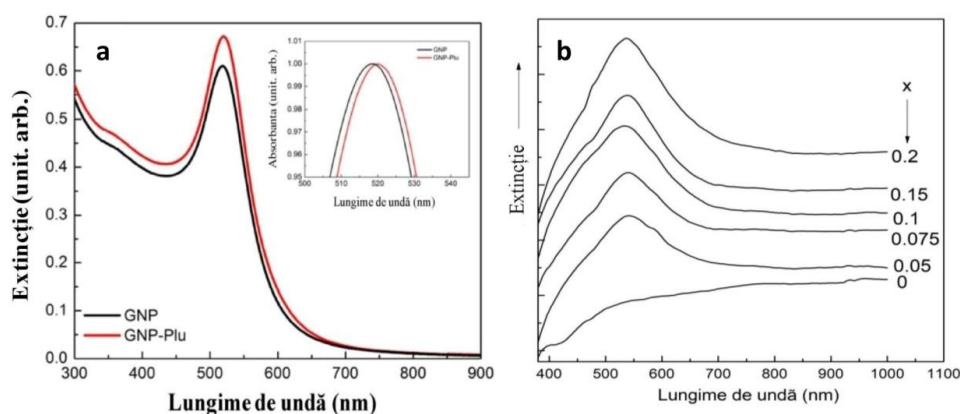


Fig. 6.1.1.1 Spectrele de absorbție ale AuNP sintetizate (linia neagră), AuNP stabilizate cu pluronic F127 (linia roșie) în soluție apoasă (a) și spectrele UV-vis ale probelor de sticlă din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Au}_2\text{O}_3$ (mol%) (b).

Difractograma probei fără conținut de AuNP, prezintă îndeosebi caracteristici amorfe, cu câteva focare de cristalinitate la $2\theta \sim 32^\circ$, acestea putând fi asociate cu formarea fazei apatitice [82]. Prezența AuNP în matricea de sticlă, a fost confirmată prin tiparele XRD, unde liniile de difracție pot fi asociate cu planele (111), (200), (220) și (311) unei fațete de pe structura cubică de Au (Fig. 6.1.1.2 a) [83].

Spectrele FT-IR ale probelor de sticlă manifestă benzi de absorbție caracteristice, specifice unei matrice silicatică și așa cum a fost de așteptat, caracteristicile spectrale nu sunt influențate de AuNP, datorită conținutului scăzut al acestora (Fig. 6.1.1.2 **b**). Au putut fi identificate moduri vibraționale specifice grupărilor Si-O-Si, după cum urmează: moduri de întindere ale Si-O-Si la 1080 și 1200 cm^{-1} [84,85], punți de întindere nelegate de siliciu-oxigen Si-O-NOB în jurul valorilor 890-975 cm^{-1} [86], vibrații de îndoire Si-O-Si la 800 cm^{-1} [84] și Si-O-Si la ~ 460 cm^{-1} [86]. Vibrațiile de întindere ale grupărilor fosfatice apar sub formă de dublet, la valorile de 565 și 604 cm^{-1} [84,87].

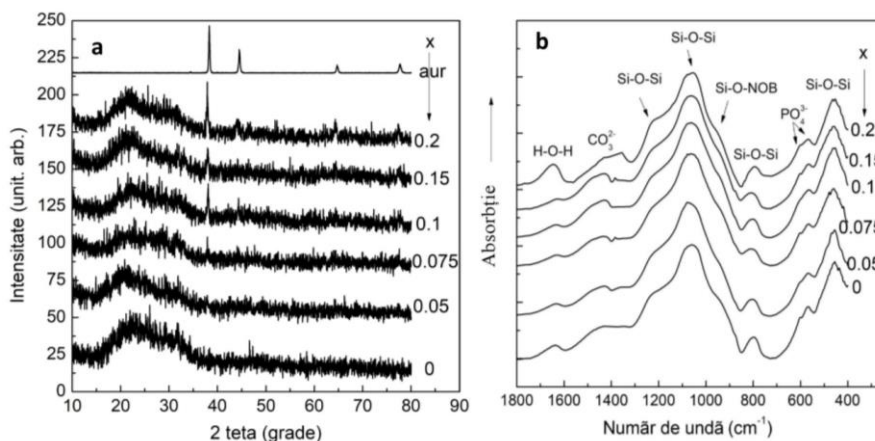


Fig. 6.1.1.2 Difractogramele (**a**) și spectrele FT-IR (**b**) ale probelor din sistemul $60\text{SiO}_2\cdot(32-x)\text{CaO}\cdot 8\text{P}_2\text{O}_5\cdot x\text{Au}_2\text{O}$ (mol%). Difractograma aurului a fost inclusă în scop comparativ.

6.1.2 Testarea bioactivității

După 7 zile de contact cu SBF, poate fi observată prezența HA auto-asamblate. Astfel, prezența fazei HA cristaline este clar vizibilă în difractograme, așa cum a fost evidențiat pe toate probele, prin reflexiile înregistrate la $2\theta=25,4^\circ$ (002) și $2\theta=31,5^\circ$ (211) (Fig. 6.1.2.1 **a**). Semnalele largi de difracție dintre unghiurile $2\theta=30^\circ$ și $2\theta=34^\circ$ corespund suprapunerii planurilor de reflexie (112), (300) și (202) ale HA cristaline [88]. Componentele suprapuse încep să se diferențieze la proba cu $x=0,2$. În cazul spectrelor FT-IR înregistrate după introducerea probelor în SBF, prezența dubletului localizat în jurul valorilor de 604 și 564 cm^{-1} devine mult mai accentuată (Fig 6.1.2.1 **b**). Aceste două benzi sunt atribuite vibrațiilor de îndoire ale P-O și sunt semnale caracteristice fazei HA cristaline [80,84].

HA proaspăt formată este vizibilă pe suprafața tuturor probelor (Fig. 6.1.2.2). Cu toate că un strat apatitic acoperă toate probele, imaginile SEM arată diferențe în ceea ce privește morfologia stratului format, în funcție de conținutul de Au, indicând influența AuNP în bioactivitatea materialelor. Așa cum poate fi observat din Fig. 6.1.2.2, prezența AuNP este benefică în ceea ce privește bioactivitatea probelor. În cazul sticlei cu $x=0,2$ mol% Au_2O , pe lângă forma sferică, pot fi observate și nanostructuri tri-dimensionale cu aspect de floare (Fig. 6.1.2.2).

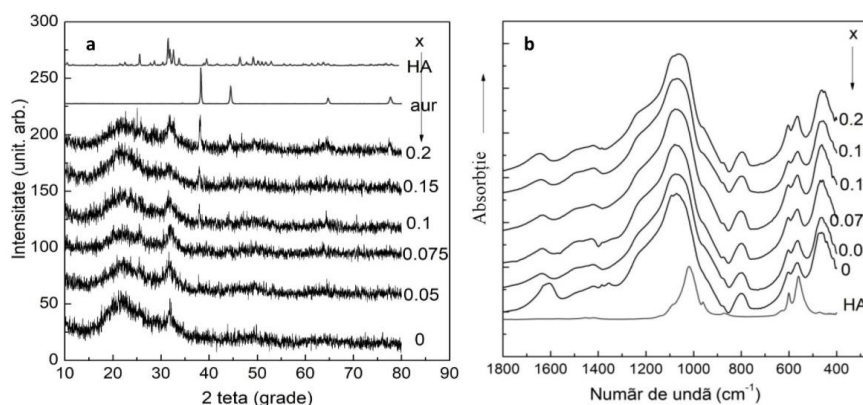


Fig. 6.1.2.1 Difractogramele (a) și spectrele FT-IR (b) ale probelor din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Au}_2\text{O}$ (mol%) după imersiunea în SBF timp de 7 zile. Difractogramele XRD ale aurului și HA au fost incluse în scop comparativ.

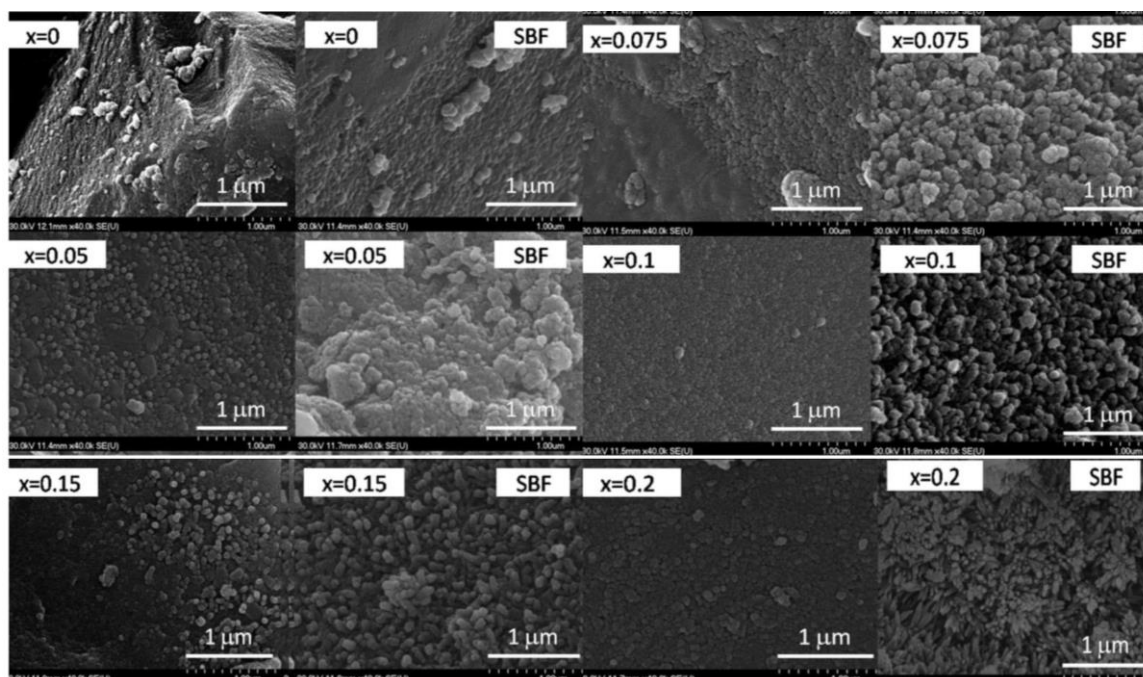


Fig. 6.1.2.2 Imaginile SEM ale probelor din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Au}_2\text{O}$ (mol%), înainte și după imersiunea în SBF timp de 7 zile.

6.1.3 Testarea biocompatibilității

Spectroscopia FT-IR, confirmă adsorbția BSA pe suprafața materialelor, prin apariția benzilor de absorbție caracteristice proteinelor: amidă I (C-O modul de întindere) la 1650 cm^{-1} , amidă II (N-H în modul de îndoire) la 1550 cm^{-1} și amidă III (C-N întindere și N-H îndoire) în jurul valorii de 1400 cm^{-1} (Fig. 6.1.3.1) [89].

Prin urmare, când proteina este atașată de suprafață, apar modificări de conformație, iar în mod uzual, β -sheet-urile își eliberează structura, devenind mai flexibile [90]. Exact această situație apare după adsorbția de BSA, structura sa secundară se modifică ușor prin scăderea valorii β -sheet-ului. În același timp, structura α -helix rămâne neschimbată, datorită faptului că structura tri-dimensională a proteinei este influențată și stabilizată într-o mare

măsură de punțile disulfidice ale cisteinei [91], care se leagă de AuNP. Aceste rezultate sugerează că probele cu AuNP, își păstrează biocompatibilitatea.

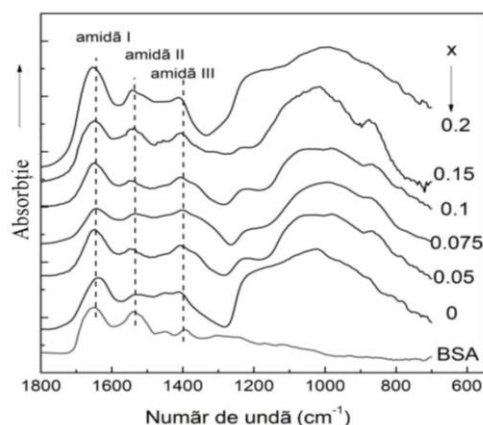


Fig. 6.1.3.1 Spectrele FT-IR ale probelor din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Au}_2\text{O}$ (mol%) după adsorbția de BSA.

6.1.4 Viabilitatea celulară

Nu în ultimul rând, a fost luată în considerare și efectuarea testului de viabilitate celulară *in vitro*. Proliferarea celulelor cheratinocite umane, în prezența probelor de sticlă, a fost aproape sau chiar mai mare de 100%, indicând o bună toleranță *in vitro* (Fig. 6.1.4.1). Prin urmare, efectul citotoxic este minim sau chiar absent, după o perioadă de expunere de 24 h la 37 °C. Începând cu concentrația de sticlă de 150 $\mu\text{g/ml}$, proliferarea celulelor HaCaT a fost promovată în special de probele cu $x = 0,15$ și $0,2$ Au_2O . Aceste valori au fost comparabile cu cele măsurate pe soluție coloidală de AuNP. Rezultatele obținute de noi pe soluția coloidală de AuNP, este în concordanță cu raportările anterioare ale lui Lu et al. [92], unde a fost demonstrat că o concentrație scăzută de AuNP (16 – 51 nm), poate stimula proliferarea celulelor cheratinocite. Prin urmare, aceste proprietăți sunt menținute atunci când matricea de sticlă conține cel puțin 0,15 mol% Au_2O .

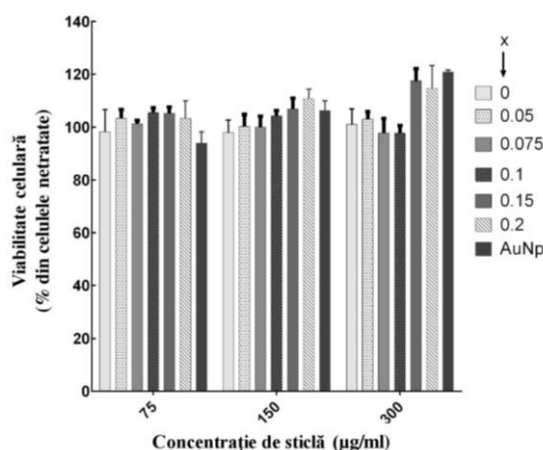


Fig. 6.1.4.1 Viabilitatea celulelor cheratinocite după 24 h de interacțiune cu diferite concentrații de sticlă din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{Au}_2\text{O}$ (mol%). Martorul folosit a fost soluția coloidală de AuNP.

6.2 Concluzii

Metoda sol-gel a fost utilizată cu succes pentru obținerea sticlelor bioactive dopate cu AuNP. Stabilizarea materialului a fost realizată la o temperatură de 600°C. Difractogramele indică atât prezența structurii amorfe a matricei de sticlă, cât și prezența AuNP. După introducerea probelor în SBF, la suprafața acestora, a fost identificată prezența unui strat de HA auto-asamblată.

Cantitatea de BSA adsorbită, a crescut odată cu creșterea concentrației de AuNP din matricea de sticlă. Acest proces poate fi explicat datorită legării cisteinei de AuNP, prin interacțiunile puternice Au-S. Mulțumită acestor legături, structura secundară a BSA, după adsorbție, s-a modificat ușor prin scăderea valorii β -sheet-ului, confirmând buna biocompatibilitate a probelor.

Viabilitatea celulară, după 24 h de interacțiune cu materialele studiate, a indicat valori foarte apropiate sau chiar mai mari de 100%, evidențind o bună toleranță *in vitro*. În orice caz, indicii de proliferare ai cheratinocitelor umane, obținuți pe probele cu 0,15 și 0,20 mol% Au₂O, sunt foarte apropiați de valorile obținute pe AuNP libere, astfel fiind demonstrată conservarea proprietăților acestor nanostructuri.

7. SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA UNOR STICLE SILICATICE CU ADAOS DE OXID DE CUPRU (CuO) ÎN VEDEREA APLICĂRII LOR ÎN INGINERIA ȚESUTULUI OSOS

7.1 Rezultate și discuții

7.1.1 Caracterizarea structurală

Difractogramele de raze X obținute pe probele din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{CuO}$ (mol%) prezintă un caracter preponderent amorf (Fig. 7.1.1.1-a). Forma neregulată a semnalelor poate fi cauzată de prezența celui de al doilea semnal care apare în jurul valorii de $2\theta \sim 32^\circ$, acesta indicând existența câtorva focare de cristalizare asociate cu formarea fazei apatitice [77,93–96]. Acest semnal are cea mai mare intensitate la probele cu un conținut de oxid de cupru ≤ 1.5 mol%. În cazul probei cu 4 mol% CuO, acest semnal nu se mai poate distinge clar, dar în schimb, la aceasta concentrație, se poate observa semnătura clară a fazei cristaline a carbonatului de calciu (valoarea cea mai înaltă $2\theta = 29.8^\circ$). Această modificare poate părea nedorită, dar a mai fost raportată anterior [97], neavând efecte negative asupra bioactivității probelor, datorită faptului ca este un precursor al stratului de apatită carbonată care se formează în SBF [77,97].

Spectrele FT-IR prezintă benzi de absorbție caracteristice sticlelor bioactive silicatiche și sticlelor-ceramice (Fig. 7.1.1.1-b). Astfel, se pot identifica caracteristici atribuite vibrațiilor de întindere Si-O-Si (1040 și 860 cm^{-1}) și vibrațiilor de îndoire Si-O-Si (465 cm^{-1}) [77]. Intensitatea maximă a semnalului vibrațional de întindere al grupării Si-O-Si, a arătat o ușoară creștere, cu adaosul de oxid de cupru. Banda care apare la 1440 cm^{-1} se poate asocia cu existența grupărilor carbonat [77], în timp ce semnalele gemene de la 560 și 580 cm^{-1} sunt atribuite grupărilor fosfatice [77]. În probele cu 2.5 și 4 % mol CuO se pot distinge modificări în forma dubletului din jurul valorii de 600 cm^{-1} , acesta devenind mai larg, cu evidențierea unui alt semnal de absorbție. O posibilă explicație poate fi suprapunerea grupărilor fosfatice cu semnalul vibrațional al CuO. Sunt cunoscute semnalele IR ale oxidului de cupru de la 603 și 497 cm^{-1} datorate modurilor de întindere ale Cu-O de-a lungul direcției [101] [98]. Mai mult decât atât, alte moduri IR active pentru Cu-O au fost raportate, într-un interval spectral situat între 605 și 660 cm^{-1} , acestea putând fi asociate cu existența unei alte faze Cu_2O [98]. De asemenea, merită menționate benzile de absorbție dintre 1400 și 1500 cm^{-1} , date de vibrațiile grupărilor carbonat.

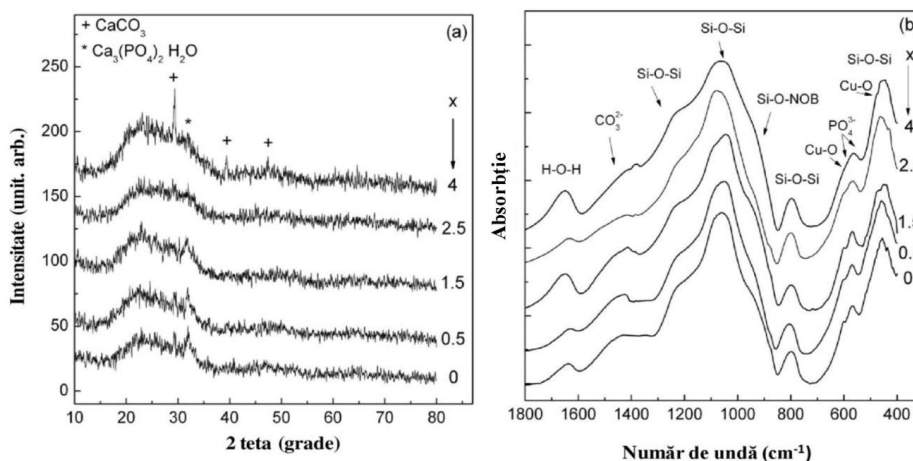


Fig. 7.1.1.1 Difractogramele XRD (a) și spectrele FT-IR ale probelor din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{CuO}$ (mol%) (b).

În figura 7.1.1.2 a se pot vedea imaginile TEM achiziționate de la probele cu 0,5 mol% CuO. Punctele negre reprezintă structuri cristaline, iar pentru determinarea naturii acestora, s-au înregistrat și imagini HRTEM (Fig. 7.1.1.2 b). Imaginea transformatei Fourier (Fig. 7.1.1.2 c), realizată pe baza Fig. 7.2.1.2 b, expune măsurătorile distanțelor interplanare de 0,311 și 0,202 nm, valori care sunt în concordanță cu cele obținute în cazul planelor (104) și (018) ale carbonatului de calciu [99].

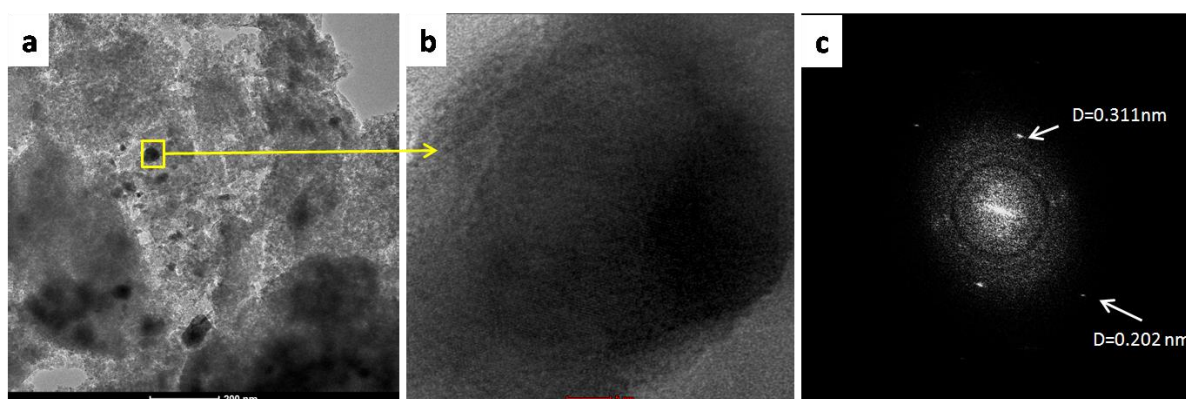


Fig. 7.1.1.2 TEM (a - scală 200 nm), HRTEM (b - scală 5 nm) și DFE pe imaginile HRTEM (c) ale probelor din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{CuO}$ (mol%), $x=0,5$.

În continuare, pentru a realiza o caracterizare mai aprofundată, au fost utilizate măsurători de absorbție Uv-vis. Privind spectrele din Fig. 7.1.1.3, se poate distinge că probele cu conținut de oxid de cupru prezintă o bandă largă dominantă, centrată în jurul valorii de 800 nm, caracteristică tranziției d-d a Cu^{2+} în coordinație octaedrală [100]. Așa cum a fost de așteptat, acest semnal, crește în intensitate odată cu creșterea cantității de CuO adăugate. Lărgimea benzii de absorbție poate fi atribuită suprapunerii semnalelor cuprului metalic cu cel al ionilor de Cu, cel din urmă dând naștere unor semnale largi de absorbție electronică, la o valoare mai mare de 700 nm [101,102].

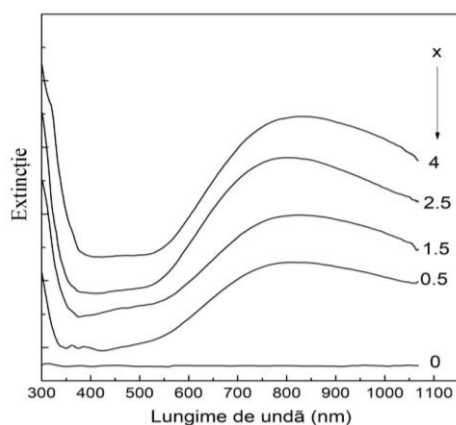


Fig. 7.1.1.3 Spectrele UV-vis ale probelor din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{CuO}(\text{mol}\%)$.

Datele obținute din analizele BET au arătat o creștere progresivă a ariei și a distribuției medii volumice a porilor, începând cu matricea nedopată și până la probele cu 1,5 și 2,5 mol% CuO. Figura 7.1.1.4 (a), dezvăluie cea mai mare suprafață specifică, la proba cu 1,5 mol% CuO, iar Figura 7.1.1.4 (b) indică cea mai mare valoare medie a volumului porilor, în materialul cu 2,5 mol% CuO.

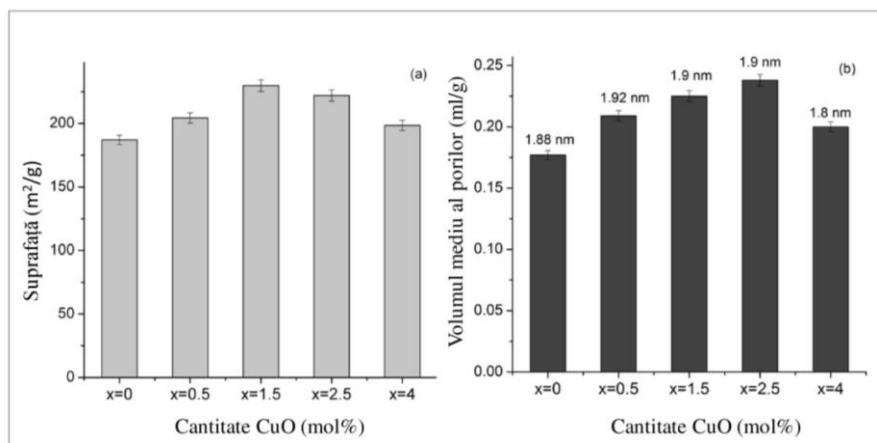


Fig. 7.1.1.4 Suprafața BET (a) și distribuția volumică a porilor (b) ale probelor din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{CuO}(\text{mol}\%)$.

7.1.2 Testarea bioactivității

După o perioadă de 7 zile în SBF, faza apatitică este înregistrată în difractograme, prin semnalele de la $2\theta \sim 26^\circ$ și 32° , acestea fiind suprapuse cu faza apatitică deja existentă în probe (Fig. 7.1.2.1 a). Pentru a facilita comparația, în Fig. 7.1.2.1 a fost introdusă difractograma HA [80].

În spectrele FT-IR ale probelor introduse în SBF (Fig. 7.1.2.1 b), benzile specifice HA cristaline, de la valorile de 604 și 564 cm^{-1} , cresc în intensitate față de cele măsurate pe probele netratate. Mai mult decât atât, sticla cu 4 mol% CuO (Fig. 7.1.2.1 b) exprimă un

dublet bine definit (604 și 564 cm^{-1}) caracteristic HA cristaline. Aceste benzi nu apar ca două semnale de absorbție distincte, în spectrele probelor înainte de imersiunea în SBF.

Figura 7.1.2.2 a-e prezintă imaginile SEM ale unor structuri din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{CuO}$ (mol%), înainte de introducerea în SBF și confirmă existența morfologiei cristaline de suprafață, ceea ce întărește descoperirile derivate din analizele XRD și FT-IR.

Formarea stratului apatitic pe suprafața sticlelor-ceramice după imersiunea lor în SBF a fost de asemenea observată prin microscopia electronică de baleiaj. Imaginea 7.1.2.2 f-j arată morfologia de suprafață a specimenelor de sticlă, incubate timp de 7 zile în SBF. Aproape fiecare suprafață a probelor (Fig. 7.1.2.2 f-h, j) indică mănunchiuri cu o morfologie conopidiformă, acoperind întreaga arie, excepție făcând materialul cu 2,5 mol% CuO, care dezvăluie formarea unor grăunți de apatită submicrometrici.

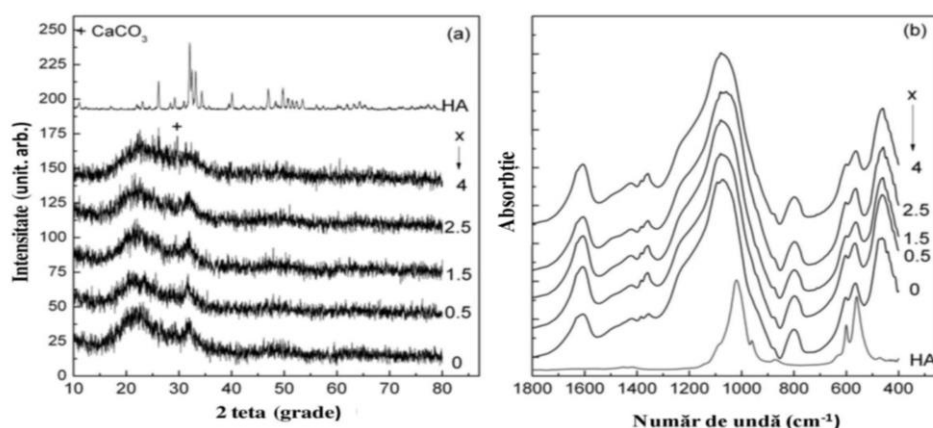


Fig. 7.1.2.1 Difractogramele (a) și spectrele FT-IR (b) ale probelor din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{CuO}$ (mol%) după introducerea în SBF timp de 7 zile. Difractograma și spectrul FT-IR al HA au fost introduse doar cu scop comparativ.

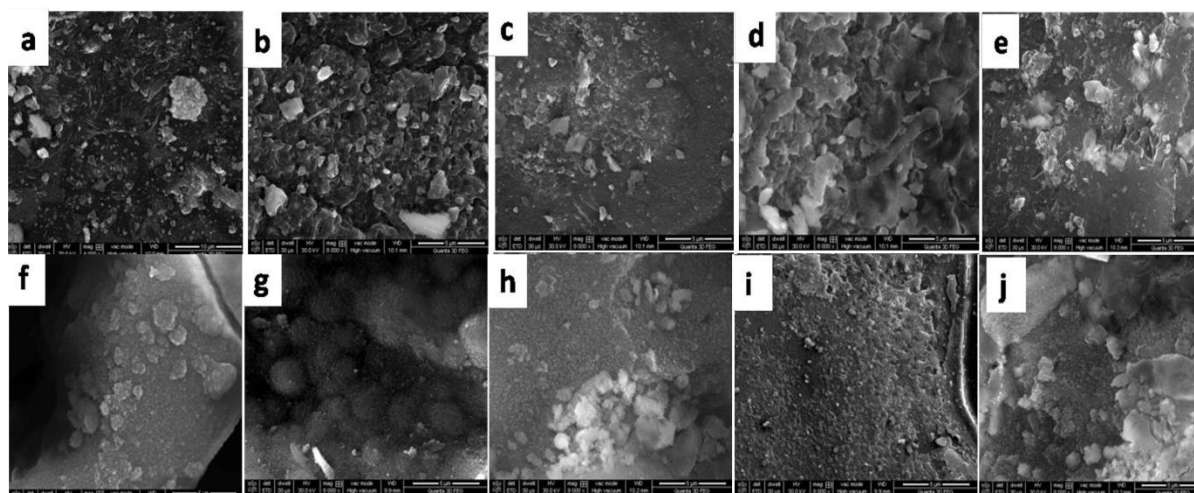


Fig. 7.1.2.2 Imaginile SEM ale probelor din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{CuO}$ (mol%) înainte (a) $x=0$; (b) $x=0,5$; (c) $x=1,5$; (d) $x=2,5$; (e) $x=4$ (a-e) și după imersiunea în SBF timp de 7 zile (f) $x=0$; (g) $x=0,5$; (h) $x=1,5$; (i) $x=2,5$; (j) $x=4$, la o scală de $5\text{ }\mu\text{m}$.

7.1.3 Eliberarea ionică

Ionii de cupru s-au dovedit a fi componente importante atât în procesele angiogenetice [103] cât și în mecanismele de combatere a microorganismelor [103]. Pentru a analiza cantitatea de Cu eliberată din probele noastre în 24 h, au fost efectuate măsurători prin spectrometrie de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-Q-MS) (Fig. 7.1.3.1 a). Cuantificarea cantității totale de cupru a fost realizată prin dizolvarea probelor într-un amestec de acizi (Fig. 7.1.3.1 b). Rezultatele obținute arată că eliberarea ionică este dependentă de concentrația de Cu a probelor, cu cât aceasta este mai mare, cu atât și cantitatea eliberată este mai ridicată. Astfel, se poate observa că la o concentrație a probei de 0,5 mol% CuO, eliberarea este de 0,135 mg/L iar la o concentrație a materialului de 4 mol% CuO, eliberarea ajunge la o valoare de 8,429 mg/L (Fig. 7.1.3.1 a).

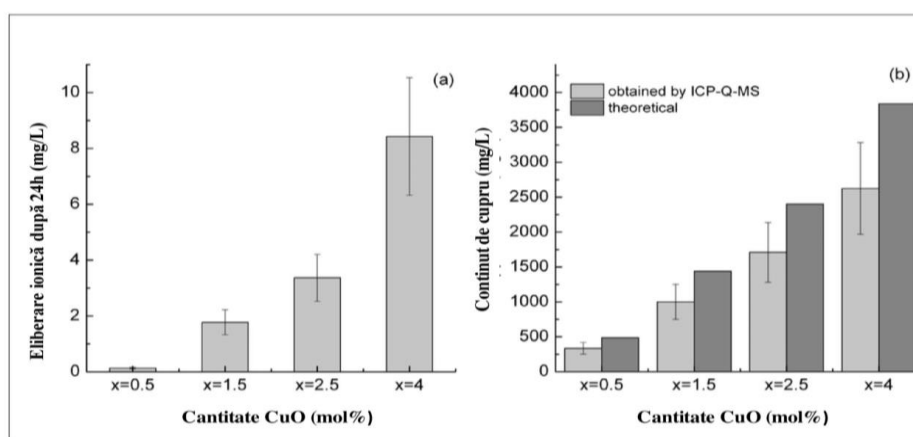


Fig. 7.1.3.1 Eliberarea ionilor de cupru din probele aparținând sistemului $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{CuO}$ (mol%) imersate pentru 24h în apă deionizată (a) și conținutul total de cupru al probelor dizolvate într-un amestec de acizi (b).

7.1.4 Activitatea antibacteriană

Activitatea antibacteriană a probelor ceramice studiate a fost testată pe două culturi bacteriene de referință pentru infecțiile intraspitalicești. CMI și CMB au fost folosite ca și metode calitative standard de determinare a reactivității antimicrobiene a materialelor testate. CMI reprezintă cea mai mică concentrație de substanță ce poate stopa creșterea bacteriană, după o perioadă de incubație de 24 h [104], în timp ce CMB reprezintă cea mai mică concentrație de substanță utilizată pentru a omorî o populație bacteriană [104]. Efectul inhibitor al materialelor studiate a fost mai semnificativ pe tulpina de *Pseudomonas aeruginosa* decât pe cea de *Staphylococcus aureus*. Cantitatea cea mai mică de oxid de cupru a fost și cea mai eficientă în ambele culturi bacteriene (Fig. 7.1.4.1 a). Proba cu 0,5 mol% CuO a dovedit de asemenea și o foarte bună activitate bactericidă, pentru celelalte concentrații fiind necesară o cantitate mai mare de probă pentru a combate bacteriile (Fig. 7.1.4.1 b).

Prezența speciilor izolate de cupru, în proba cu 0,5 mol% CuO, poate duce la o creștere a eficienței antimicrobiene. De fapt, probele cu concentrație mai mare de oxid de cupru, eliberează mai ușor speciile de Cu dar eficiența lor din punct de vedere antibacterian

este mai scăzută comparativ cu proba cu 0,5 mol% CuO, cel mai probabil datorită dimensiunilor mai mari.

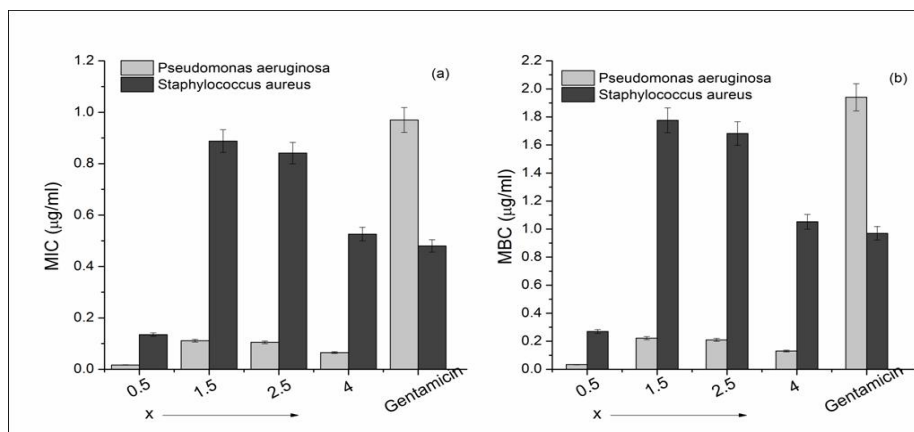


Fig. 7.1.4.1 Concentrația minimă inhibitorie (CMI) (a) și concentrația minimă bactericidă (CMB) (b).

7.1.5 Testarea biocompatibilității

Mai departe, probele au fost supuse unor teste de adsorbție de proteină în vederea testării biocompatibilității. Rezultatele obținute după adsorbția BSA pe suprafața sticlelor, au relevat benzi caracteristice proteice: amide I (C-O întindere) la 1650 cm^{-1} și amide II (N-H îndoire) la 1550 cm^{-1} (Fig. 7.1.5.1), indicând prezența proteinelor pe suprafața materialelor [89]. Este binecunoscut faptul că, configurația proteinelor se modifică odată cu adsorbția lor pe suprafața probelor din cauza legăturilor electrostatice și de hidrogen create [105,106].

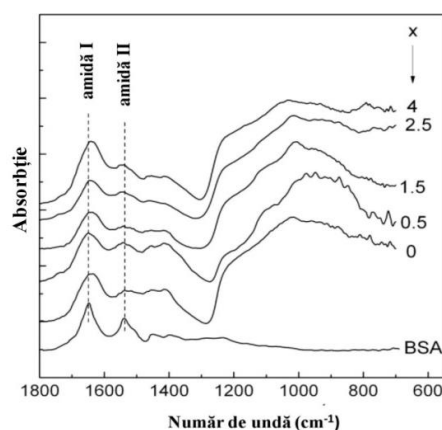


Fig. 7.1.5.1 Spectrele FT-IR ale probelor din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{CuO}$ (mol%) după adsorbția de proteină.

7.1.6 Viabilitatea celulară

Rezultatele obținute arată că efectul citotoxic este aproape absent după o expunere de 24h, în cazul ambelor diluții (Fig. 7.1.6.1).

În acest studiu, proliferarea celulelor HaCaT a fost promovată semnificativ de probele cu un conținut de 0,5 și 1,5 mol% CuO, în comparație cu sticlele fără cupru. Viabilitatea în

cazul celorlalte două probe ($x = 2,5$ și 4), se apropie de 100%, sugerând o bună toleranță *in vivo*.

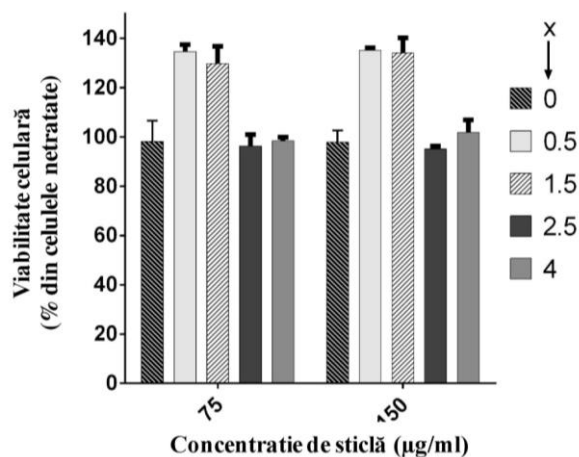


Fig. 7.1.6.1 Testarea viabilității celulare ale probele din sistemul $60\text{SiO}_2 \cdot (32-x)\text{CaO} \cdot 8\text{P}_2\text{O}_5 \cdot x\text{CuO}$ (mol%).

7.2 Concluzii

Metoda de sinteză sol-gel a fost utilizată cu succes pentru a obține sticle-ceramice ($\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5$) cu diferite concentrații de oxid de cupru ($x = 0,5; 1,5; 2,5$ și 4 mol% CuO), în vederea determinării proprietăților necesare includerii acestor materiale în aplicații de inginerie tisulară. Spectrele UV-vis și analizele TEM au arătat că toate probele conțin atât specii de cupru ionic cât și metalic. Testele BET au arătat că proba cu 1,5 mol% CuO are cea mai mare suprafață specifică iar matricea silicatică cu adaos de 2,5 mol% CuO are cel mai mare volum de pori.

Informațiile derivate din măsurătorile XRD, FT-IR și SEM, efectuate pe probele imersate în SBF, au dovedit existența cristalelor de HA, rezultat care confirmă bioactivitatea *in vitro* a tuturor materialelor studiate.

S-a constatat că efectul minim inhibitor al probelor studiate a fost mai pregnant pe tulpina de *Pseudomonas aeruginosa* decât pe cea de *Staphylococcus aureus*, deși, proba cu concentrația de 0,5 mol% CuO a fost eficientă în combaterea ambelor culturi bacteriene. De asemenea, proba cu cel mai mic conținut de CuO a manifestat și cea mai bună activitate bactericidă. Adsorbția BSA pe suprafața probelor a arătat faptul că legarea speciilor de Cu a cauzat schimbări minore în conformația proteinelor, concluzia finală fiind că toate probele sunt biocompatibile. În ceea ce privește citotoxicitatea materialelor, aceasta este apropiată de 0%, după o expunere standard de 24 h, în ambele diluții. Probele cu 0,5 și 1,5 mol% CuO au dovedit o rată de proliferare celulară foarte înaltă.

Bazându-ne pe faptul că sticlele ceramice investigate au dovedit o bună bioactivitate și biocompatibilitate, probele cu 0,5 și 1,5 mol% CuO au evidențiat o excelentă viabilitate iar materialul cu 0,5 mol% CuO a avut bune rezultate în combaterea tulpinii de *Staphylococcus aureus*, putem concluda că matricea cu conținut de 0,5 mol% CuO este cea mai potrivită pentru viitoare teste *in vivo*.

8. SINTEZA, CARACTERIZAREA, TESTAREA *IN VITRO* ȘI IMPLANTAREA *IN VIVO* A UNUI COMPOZIT PE BAZĂ DE POLIMER-STICLĂ BIOACTIVĂ (Alg-Pll-CuOBG) ÎN SCOP EXPERIMENTAL ȘI COMPARATIV

8.1 Rezultate și discuții

8.1.1 Caracterizarea structurală

Difractogramele probelor de sticlă din sistemul $x\text{CuBG}$ ($x=0; 0,5$ și $1,5$ mol%) preparate prin metoda sol-gel, prezintă o structură amorfă, cu apariția câtorva centre de cristalizare asociate formării fazei apatitice (Fig. 8.1.1.1 a) [93]. Spectrele FT-IR ale materialelor ceramice bioactive (Fig. 8.1.1.1 b), indică caracteristici tipice pentru rețelele silicatică (vibrații Si-O-Si de întindere la 1040 și 860 cm^{-1} și vibrații Si-O-Si de îndoire la 465 cm^{-1}) [84]. Benzile din jurul valorilor de 604 și 565 cm^{-1} sunt atribuite vibrațiilor grupurilor fosfatice [84]. Semnalele de întindere ale grupării Cu-O apar la 603 și 497 cm^{-1} și se suprapun cu benzi provenite de la grupările fosfatice [98,107].

Structurile compozit Alg-Pll- $x\text{CuBG}$ ($x=0; 0,5$ și $1,5$ mol%) au un caracter amorf, după cum se poate observa din difractogramele XRD (Fig. 8.1.1.1 a), iar spectrele FT-IR arată vibrații preponderente unităților polimerice (Fig. 8.1.1.1 b). Așadar, se pot observa benzi ale pullulanului la 1636 , 1354 și 1080 cm^{-1} atribuite vibrațiilor de întindere și îndoire ale grupărilor O-C-O, C-O-H respectiv C₆-OH [108]. Benzile corespunzătoare alginatului de sodiu de la 1600 și 1400 cm^{-1} , pot fi atribuite vibrațiilor asimetrice de întindere ale grupării COO⁻. Semnalele localizate la 1158 și 1116 cm^{-1} pot fi asociate cu vibrațiile de întindere ale C-O, în timp ce la 1560 cm^{-1} , apare vibrația de întindere a C=C [109]. Astfel, acestea sunt C=C și O-C-O, care aparțin structurii polimerilor și grupărilor Si-O, Si-O-NOB sau Si-O-Si, din unitățile tetraedrale de SiO₄. Prin urmare, interacțiunea dintre amestecul de polimeri (Alg-Pll) și sticla bioactivă, a fost evidențiată prin deplasarea benzii C₆-OH de la 1080 la 1090 cm^{-1} și prin creșterea intensității raportului $1636/1560\text{ cm}^{-1}$ reprezentând vibrațiile de întindere ale grupărilor O-C-O și C=C (Fig. 8.2.1.1 b).

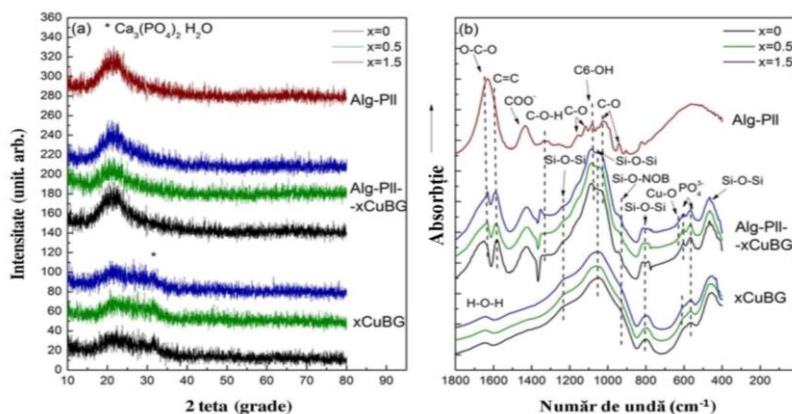


Fig. 8.1.1.1 Difractogramele XRD (a) și spectrele FT-IR (b) ale sticlelor ceramice $x\text{CuBG}$ ($x=0; 0,5$ și $1,5$ mol%) și ale probelor compozit Alg-Pll- $x\text{CuBG}$ ($x=0; 0,5$ și $1,5$ mol% CuO).

8.1.2 Viabilitatea celulară

Având în vedere că destinația finală a acestor materiale presupune implantarea *in vivo*, următorul pas în ceea ce privește acest lucru a fost testarea citotoxicității *in vitro* pentru aceste compozite. Astfel, utilizarea kitului Alamar-Blue, a arătat o mai mare sensibilitate a culturii de osteoblaste în comparație cu cea de fibroblaste. Cu toate acestea, procentele de proliferare s-au situat între 75 și 96%, în cazul fibroblastelor (Fig. 8.1.2.1 a), respectiv între 55 și 101% în cazul osteoblastelor (Fig. 8.1.2.1 b). Se poate observa o creștere a viabilității de la 24 la 48 h, la aproape toate probele investigate. Rezultate indică o bună proliferare celulară pe termen lung și o citotoxicitate minimă, mai departe fiind recomandată testarea acestor materiale compozit în studii experimentale *in vivo*.

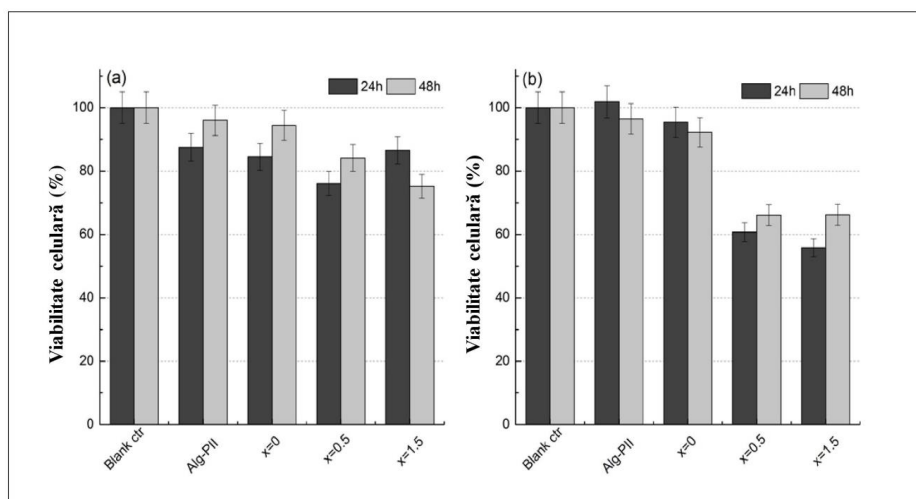


Fig. 8.1.2.1 Viabilitatea celulelor fibroblaste (a) și osteoblaste (b) după 24 și 48 h pe probele compozit Alg-Pll și Alg-Pll-xCu-BG (x=0; 0,5 and 1,5 mol% CuO). Ca și control au fost utilizate culturi celulare netratate.

8.1.3 Biocompatibilitate *in vitro* - *in vivo*

Ca urmare a testării bioactivității *in vitro*, scaffold-urile au fost introduse în SBF. În paralel, acestea au fost implantate subcutanat și intraos la șobolan (Fig. 8.1.3.1).

Materialele au fost acceptate cu succes de către țesuturile țintă, neprezentând semne inflamatorii, de infecție sau respingere, astfel, dovedind o bună biocompatibilitate *in vivo*.



Fig. 8.1.3.1 Fotografii digitale realizate la necropsie (se poate observa atașamentul materialului compozit la țesutul conjunctiv subcutanat).

Din difractograme se evidențiază semnătura fazei apatitice cristaline (Fig. 8.1.3.2 a) prin semnalul localizat la $2\theta=32.28^\circ$, care corespunde planului de reflexie (112) al structurii cristaline hexagonale HA [80]. Difractogramele XRD înregistrate pe probele postimplant (Fig. 8.1.3.2 b) indică prezența unui semnal adițional la $2\theta=25.9^\circ$ corespunzător planului de reflexie (002) al structurii HA [80].

Spectrele FT-IR (Fig. 8.1.3.2 a1) confirmă rezultatele de mai sus. Probele scoase din SBF marchează benzi caracteristice grupărilor P-O la 602 și 560 cm^{-1} și PO_4^{3-} la 1040 cm^{-1} , acestea fiind asociate cu formarea stratului de fosfat de calciu [86]. Post *in vivo*, semnalele de vibrație ale grupării P-O de la 602 și 560 cm^{-1} devin mai proeminente în comparație cu benzile corespunzătoare înregistrate după testele *in vitro*. Semnalul dat de gruparea PO_4^{3-} (1040 cm^{-1}) devine mai ascuțit, sugerând de asemenea formarea stratului de fosfat calcic (Fig 8.1.3.2 b1).

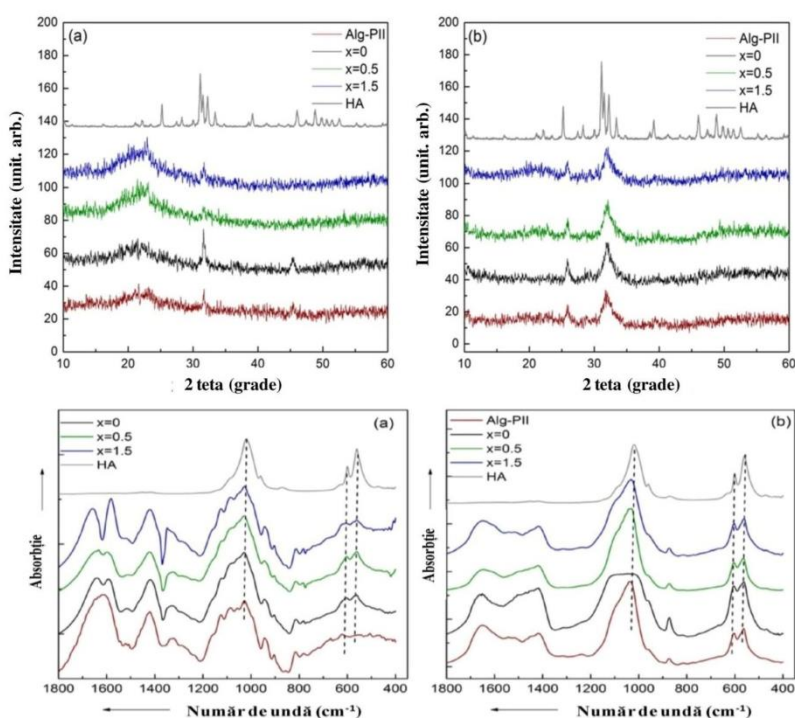


Fig. 8.1.3.2 Difractogramele probelor de compozit Alg-Pil-xCu-BG și spectrele FT-IR după imersarea în SBF (a și a1) și post *in vivo* (b și b1).

În Fig. 8.1.3.3 col. 2, se poate observa formarea stratului de HA pe suprafața materialului. Acesta, prezintă aspectul unei microstructuri compuse din mărgel. Imaginile *in vivo* (Fig. 8.1.3.3 col. 3) dezvăluie mărgelile aglomerate cu o dimensiune de aproximativ 75-100 nm.

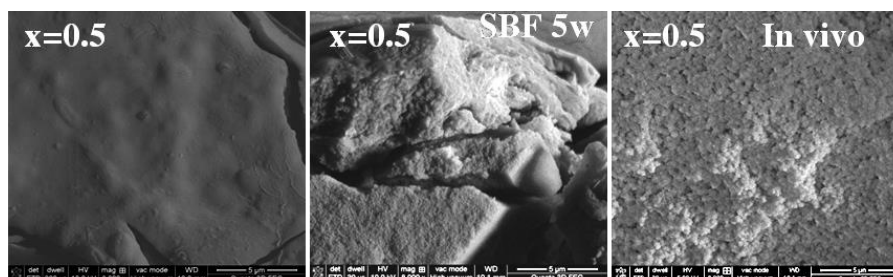


Fig. 8.1.3.3 Imagini SEM ale compozitelor Alg-Pil-xCu-BG nemodificate (col. 1) după imersarea în SBF (col. 2) și post *in vivo* (col.3). Scală de măsură: 5 μm .

8.1.4 Evaluare imagistică *in vivo*

Am optat pentru utilizarea examenului RMN ca tehnică imagistică de evaluare osoasă, pentru a putea urmări nu doar modificările induse de implant asupra țesutului osos, dar și modificările care pot apărea la țesutul moale adiacent leziunii primare și modificările ce pot surveni la nivelul măduvei osoase.

Pentru fiecare animal, a fost efectuată o scanare sagitală, folosindu-se protocolul FLASH (gradient echo), secvența ponderată **T1**.

După 28 de zile postoperator, la grupul unu (**A**, **E**), discontinuitatea de la nivelul compactei osoase nu mai este prezentă, fiind evidentă o zonă continuă, circulară hiperdensă, hipointensă de demarcare a leziunii, ce cuprinde atât compacta osoasă cât și regiunea medulară dată de refacerea țesutului osos și regenerarea vasculară, suprafața osului este neregulată cu prezența unei periostite. La grupul doi (**B**, **F**) suprafața osoasă este netedă cu periostită discretă, zona de demarcație este mult mai redusă comparativ cu grupul unu (Fig. 8.1.4.1).

Apariția hiposemnalului în secvența ponderată **T1** este caracteristică în cazul hemoragiei acute sau cronice, edemului sau calcificării. Aspectul hiperdens, cu hipersemnal al reacției intramedulare, corelat cu examenul histopatologic corespunde cu apariția unei hipervascularizații la nivelul zonei de implant și cu formarea de țesut osos.

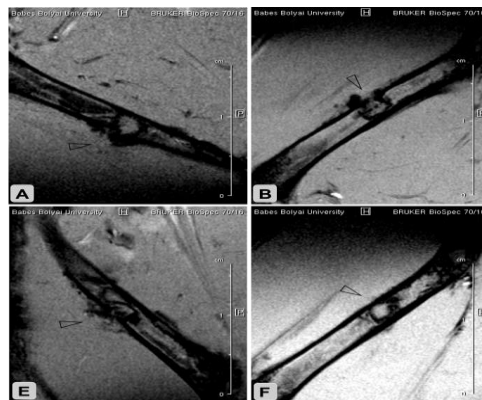


Fig. 8.1.4.1 Imagini RMN achiziționate postoperator (prima linie reprezintă membrul posterior drept al fiecărui grup **A** - Alg-P11-0,5CuBG; **B** - Alg-P11-1,5CuBG, iar linia a doua reprezintă membrul posterior stâng al fiecărui grup **E**, **F** - Alg-P11-βTCP/HA).

8.1.5 Evaluare histopatologică

În imaginile prezentate în Fig. 8.1.5.1 **A-B** sunt prezentate secțiunile longitudinale ale osului femur, cu asterix fiind marcat materialul compozit implantat în fiecare lot, iar săgeata dublă indicând limitele defectului. Se poate observa că scaffold-ul implantat a fost înconjurat parțial sau total de os trabecular (Fig. 8.1.5.1 **A-B** **chenar punctat**).

Coloana A, aparține probelor cu materialul comercial, inserate *in vivo*, în scop comparativ. Imaginea **A1** apropie în detaliu zona marcată punctat în secțiunea **A**, identificând spiculi osoși ce înconjură complet structura implantată.

Coloana B, descrie lotul implantat cu Alg-Pll-0,5CuBG. Imaginea **B1** detaliază zona marcată punctat din imaginea **B**. Astfel, se constată osul spongios ce înconjură partea superficială a scaffold-ului.

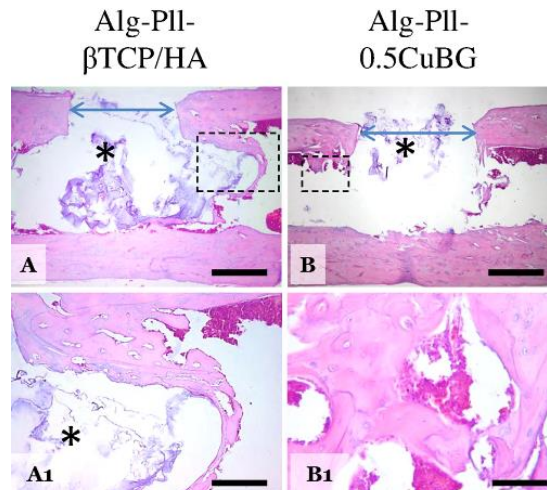


Fig. 8.1.5.1 Secțiunile histologice ale scaffold-urilor compozite implantate în compacta femurală (**A-B**) și interacțiunile țesutului osos cu materialul (**A1 – B1**).

8.3 Concluzii

Materialele compozit Alg-Pll-xCuBG ($x=0, 0,5$ și $1,5$ mol% CuO) au fost sintetizate, caracterizate și investigate cu succes *in vitro* și *in vivo*. Spectrele FT-IR dezvăluie legăturile dintre cei doi polimeri și sticla bioactivă. Benzile caracteristice polimerilor și sticlei prezintă deplasări în spectrele structurilor compozit. Testele de viabilitate indică rezultate mai bune pe termen lung, pentru ambele culturi celulare.

Analizele XRD și FT-IR au arătat diferențe semnificative de intensitate între rezultatele *in vitro* și cele *in vivo*, pe de-o parte fiind confirmate proprietățile bioactive și biocompatibile ale probelor studiate iar pe de altă parte, formarea eficientă a HA și fuziunea solidă cu țesutul viu. Imaginile SEM au confirmat rezultatele analizelor XRD și FT-IR. Pe probele extrase din *in vivo*, măregele nanoagregate și nanoporii au devenit mai evidenți.

Operația de implantare osoasă a decurs conform protocolului stabilit inițial, materialele implantate fiind foarte bine tolerate de os și de țesuturile învecinate. Scanările RMN, au permis analizarea non-invazivă și non-distructivă a materialelor, *in vivo*, fără a afecta rezultatele finale. Examenul histopatologic a confirmat faptul că loturile implantate cu materialele studiate au fost cele mai eficiente în ceea ce privește capacitatea de vindecare și regenerare, mai active chiar și decât lotul martor.

9. CONCLUZII FINALE ȘI PERSPECTIVE

9.1 Concluzii finale

În primul studiu al acestei lucrări a fost efectuată cu succes sinteza și caracterizarea unor materiale silicaticice cu adaos de Ag_2O . Metodele de caracterizare utilizate au dovedit bioactivitatea sticlelor studiate, iar viabilitatea obținută a fost una bună. Cu toate acestea, înglobarea lor într-un amestec polimeric a condus la obținerea unor compozite cu toxicitate relativ ridicată, care nu erau compatibile cu obiectivele propuse inițial.

Cel de al doilea studiu al tezei a constat în sinteza și caracterizarea unor sticle silicaticice dopate cu AuNP și a condus la obținerea unor rezultate pozitive. Bioactivitatea *in vitro* a fost demonstrată prin introducerea probelor în SBF. De asemenea biocompatibilitatea materialelor a fost evidențiată prin cantitatea de BSA adsorbită. Viabilitatea celulară a indicat valori apropiate de 100%, sugerând o bună toleranță *in vitro*. S-au obținut materiale bioactive care au înglobat eficient AuNP, fără prezența altor specii de Au, dar cu diferite dimensiuni ale NP.

În studiul numărul trei al acestei lucrări s-a reușit optimizarea unor sticle silicaticice cu adaos de CuO. Astfel din paleta inițială de 4 concentrații, prin metode de caracterizare structurală și teste *in vitro*, au fost selectate cele mai potrivite două concentrații pentru viitoarele studii experimentale *in vivo*. Cantitățile de 0,5 și 1,5 mol% CuO adăugate s-au dovedit a fi cele mai potrivite în ceea ce privește activitatea antibacteriană și proliferarea celulară. Având în vedere faptul că toate cele 4 sticle ceramice investigate au demonstrat o bună bioactivitate și biocompatibilitate, selecția finală a fost elaborată luând în considerare rezultatele testelor *in vitro*.

Ultimul studiu a presupus înglobarea materialelor cu adaos de CuO dezvoltate anterior într-un amestec polimeric și dezvoltarea unui experiment *in vivo* de regenerare osoasă. În acest mod cele două concentrații optimizate în studiul precedent au fost implantate cu succes prin crearea unor materiale compozite. Rezultatele obținute comparativ între materialele studiate și produsul comercial au evidențiat calitățile deosebite ale probelor studiate, acestea demonstrând un randament reparativ al țesutului osos cel puțin la fel de bun cu cel al materialului standardizat.

9.2 Perspective

Ramura biomaterialelor, un domeniu de larg interes printre cercetătorii din întreaga lume, tinde să devină o opțiune din ce în ce mai apreciată și utilizată în medicina modernă. Astfel, subiectele abordate în lucrarea de față, pot fi dezvoltate eficient în anii care vor urma, prin studii experimentale pe diverse specii de animale, în vederea acumulării unei experiențe suficiente progresului către studiile clinice, pe pacienți umani.

BIBLIOGRAFIE

- [1] J.F.A. Valente, T.A.M. Valente, P. Alves, P. Ferreira, A. Silva, I.J. Correia, Alginate based scaffolds for bone tissue engineering, *Mater. Sci. Eng. C*. 32 (2012) 2596–2603. doi:10.1016/j.msec.2012.08.001.
- [2] M.J. Lysaght, A. Jaklenec, E. Deweerd, Great expectations: private sector activity in tissue engineering, regenerative medicine, and stem cell therapeutics, *Tissue Eng. Part A*. 14 (2008) 305–315.
- [3] M.N. Rahaman, Bioactive ceramics and glasses for tissue engineering, in: *Tissue Eng. Using Ceram. Polym.*, Elsevier, 2014: pp. 67–114. doi:10.1533/9780857097163.1.67.
- [4] P. V Giannoudis, H. Dinopoulos, E. Tsiridis, Bone substitutes: an update, *Injury*. 36 (2005) S20–S27.
- [5] J.R. Pleis, M. Lethbridge-Çejku, Summary health statistics for US adults: National Health Interview Survey, 2005., *Vital Health Stat*. 10. (2006) 1–153.
- [6] D.W. Hutmacher, Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage., *Biomaterials*. 21 (2000) 2529–2543. doi:10.1016/S0142-9612(00)00121-6.
- [7] J.S. Walsh, Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation, *Surg*. 33 (2015) 1–6. doi:10.1016/j.mpsur.2014.10.010.
- [8] N. Little, B. Rogers, M. Flannery, Bone formation, remodelling and healing, *Surg*. 29 (2011) 141–145. doi:10.1016/j.mpsur.2011.01.002.
- [9] T.J. Martin, K.W. Ng, G.C. Nicholson, Cell biology of bone, *Baillieres. Clin. Endocrinol. Metab*. 2 (1988) 1–29.
- [10] J.J. PRITCHARD, General Histology of Bone, in: *Biol. Physiol. Bone*, Elsevier, 1972: pp. 1–20. doi:10.1016/B978-0-12-119201-3.50008-1.
- [11] S. Weiner, H.D. Wagner, The material bone: structure-mechanical function relations, *Annu. Rev. Mater. Sci*. 28 (1998) 271–298.
- [12] L.L. Hench, J. Wilson, An introduction to bioceramics, *World scientific*, 1993.
- [13] L.L. Hench, Biomaterials: a forecast for the future, *Biomaterials*. 19 (1998) 1419–1423.
- [14] L.L. Hench, J. Wilson, Clinical performance of skeletal prostheses, *Springer*, 1996.
- [15] J. LeFanu, The Fall and Rise of Modern Medicine, *Little Brown*. (1999) 104–113.
- [16] S. Simon, Orthopaedic basic science American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, IL. (1994).
- [17] L.L. Hench, J.K. West, Biological applications of bioactive glasses, *Harwood Academic Publishers*, 1996.
- [18] L.L. Hench, Bioceramics: From Concept to Clinic, *J. Am. Ceram. Soc*. 74 (1991) 1487–1510. doi:10.1111/j.1151-2916.1991.tb07132.x.
- [19] L.L. Hench, J.R. Jones, P. Sepulveda, Bioactive Materials for Tissue Engineering Scaffolds, in: *Futur. Strateg. Tissue Organ Replace.*, IMPERIAL COLLEGE PRESS, 2002: pp. 3–24. doi:10.1142/9781860949647_0001.
- [20] J. Livage, C. Sanchez, Sol-gel chemistry, *J. Non. Cryst. Solids*. 145 (1992) 11–19.
- [21] T. Coradin, M. Boissière, J. Livage, Sol-gel chemistry in medicinal science, *Curr. Med. Chem*. 13 (2006) 99–108.
- [22] I.A. Aksay, S. Weiner, Biomaterials is this really a field of research?, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci*. 3 (1998) 219–220.
- [23] H. Hajiali, S. Karbasi, M. Hosseinalipour, H.R. Rezaie, Preparation of a novel biodegradable nanocomposite scaffold based on poly (3-hydroxybutyrate)/bioglass nanoparticles for bone tissue engineering, *J. Mater. Sci. Mater. Med*. 21 (2010) 2125–2132.
- [24] T.J. Webster, C. Ergun, R.H. Doremus, R.W. Siegel, R. Bizios, Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics, *Biomaterials*. 21 (2000) 1803–1810.
- [25] G. Wei, P.X. Ma, Nanostructured biomaterials for regeneration, *Adv. Funct. Mater*. 18 (2008) 3568–3582.
- [26] J.J. Videau, V. Dupuis, Phosphates and biomaterials, *Eur. J. Solid State Inorg. Chem*. 28 (1991) 303–343.
- [27] J.P. Zhong, G.P. LaTorre, L.L. Hench, The kinetics of bioactive ceramics part VII: Binding of collagen to hydroxyapatite and bioactive glass, *Bioceramics*. 7 (1994) 61–66.

- [28] Y. Khan, M.J. Yaszemski, A.G. Mikos, C.T. Laurencin, Tissue engineering of bone: material and matrix considerations, *J. Bone Jt. Surg.* 90 (2008) 36–42.
- [29] S. Bose, M. Roy, A. Bandyopadhyay, Recent advances in bone tissue engineering scaffolds, *Trends Biotechnol.* 30 (2012) 546–554. doi:10.1016/j.tibtech.2012.07.005.
- [30] J.-P. Zhong, D.C. Greenspan, Bioglass [r] Surface Reactivity: From In Vitro to In Vivo, in: *BIOCERAMICS-CONFERENCE-*, 1998: pp. 415–418.
- [31] J.D. Rinehart, T.D. Taylor, Y. Tian, R.A. Latour, Real-time dissolution measurement of sized and unsized calcium phosphate glass fibers, *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 48 (1999) 833–840.
- [32] J.J. Mazer, J. V Walther, Dissolution kinetics of silica glass as a function of pH between 40 and 85 C, *J. Non. Cryst. Solids.* 170 (1994) 32–45.
- [33] R.W. Douglas, T.M.M. EL-SHAMY, Reactions of glasses with aqueous solutions, *J. Am. Ceram. Soc.* 50 (1967) 1–8.
- [34] S.J. Hollister, Porous scaffold design for tissue engineering, *Nat. Mater.* 4 (2005) 518–524.
- [35] D.J. Balazs, K. Triandafillu, P. Wood, Y. Chevolut, C. van Delden, H. Harms, C. Hollenstein, H.J. Mathieu, Inhibition of bacterial adhesion on PVC endotracheal tubes by RF-oxygen glow discharge, sodium hydroxide and silver nitrate treatments, *Biomaterials.* 25 (2004) 2139–2151.
- [36] X. Chatzistavrou, J.C. Fenno, D. Faulk, S. Badylak, T. Kasuga, A.R. Boccaccini, P. Papagerakis, Fabrication and characterization of bioactive and antibacterial composites for dental applications, *Acta Biomater.* 10 (2014) 3723–3732. doi:10.1016/j.actbio.2014.04.030.
- [37] A. Melaiye, W.J. Youngs, Silver and its application as an antimicrobial agent, (2005).
- [38] N. Stobie, B. Duffy, D.E. McCormack, J. Colreavy, M. Hidalgo, P. McHale, S.J. Hinder, Prevention of *Staphylococcus epidermidis* biofilm formation using a low-temperature processed silver-doped phenyltriethoxysilane sol–gel coating, *Biomaterials.* 29 (2008) 963–969.
- [39] K. Glinel, P. Thebault, V. Humblot, C.M. Pradier, T. Jouenne, Antibacterial surfaces developed from bio-inspired approaches, *Acta Biomater.* 8 (2012) 1670–1684. doi:10.1016/j.actbio.2012.01.011.
- [40] J. Hasan, R.J. Crawford, E.P. Ivanova, Antibacterial surfaces: the quest for a new generation of biomaterials, *Trends Biotechnol.* 31 (2013) 295–304.
- [41] N.R. Panyala, E.M. Peña-Méndez, J. Havel, Gold and nano-gold in medicine: overview, toxicology and perspectives., *J. Appl. Biomed. (De Gruyter Open).* 7 (2009).
- [42] G.J. Higby, Gold in medicine, *Gold Bull.* 15 (1982) 130–140.
- [43] P.M. Tiwari, K. Vig, V.A. Dennis, S.R. Singh, Functionalized gold nanoparticles and their biomedical applications, *Nanomaterials.* 1 (2011) 31–63.
- [44] M.-C. Daniel, D. Astruc, Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology, *Chem. Rev.* 104 (2004) 293–346.
- [45] J. Lipka, M. Semmler-Behnke, R.A. Sperling, A. Wenk, S. Takenaka, C. Schleh, T. Kissel, W.J. Parak, W.G. Kreyling, Biodistribution of PEG-modified gold nanoparticles following intratracheal instillation and intravenous injection, *Biomaterials.* 31 (2010) 6574–6581.
- [46] G.L. Semenza, Regulation of Oxygen Homeostasis by Hypoxia-Inducible Factor 1, *Physiology.* 24 (2009) 97–106. doi:10.1152/physiol.00045.2008.
- [47] C. Gérard, L.-J. Bordeleau, J. Barralet, C.J. Doillon, The stimulation of angiogenesis and collagen deposition by copper, *Biomaterials.* 31 (2010) 824–831.
- [48] S. Zhao, L. Li, H. Wang, Y. Zhang, X. Cheng, N. Zhou, M.N. Rahaman, Z. Liu, W. Huang, C. Zhang, Wound dressings composed of copper-doped borate bioactive glass microfibers stimulate angiogenesis and heal full-thickness skin defects in a rodent model, *Biomaterials.* 53 (2015) 379–391. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.02.112.
- [49] K. Balamurugan, W. Schaffner, Copper homeostasis in eukaryotes: teetering on a tightrope, *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* 1763 (2006) 737–746.
- [50] L. Finney, S. Vogt, T. Fukai, D. Glesne, COPPER AND ANGIOGENESIS: UNRAVELLING A RELATIONSHIP KEY TO CANCER PROGRESSION, *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 36 (2009) 88–94. doi:10.1111/j.1440-1681.2008.04969.x.
- [51] Y.-J. Park, Y.-H. Song, J.-H. An, H.-J. Song, K.J. Anusavice, Cytocompatibility of pure metals and

- experimental binary titanium alloys for implant materials, *J. Dent.* 41 (2013) 1251–1258. doi:10.1016/j.jdent.2013.09.003.
- [52] A. Yamamoto, R. Honma, M. Sumita, Cytotoxicity evaluation of 43 metal salts using murine fibroblasts and osteoblastic cells, *J. Biomed. Mater. Res.* 39 (1998) 331–340. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199802)39:2<331::AID-JBM22>3.0.CO;2-E.
- [53] D. Wojcieszak, D. Kaczmarek, A. Antosiak, M. Mazur, Z. Rybak, A. Rusak, M. Osekowska, A. Poniedzialek, A. Gamian, B. Szponar, Influence of Cu–Ti thin film surface properties on antimicrobial activity and viability of living cells, *Mater. Sci. Eng. C.* 56 (2015) 48–56. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.06.013.
- [54] K.Y. Lee, D.J. Mooney, Alginate: Properties and biomedical applications, *Prog. Polym. Sci.* 37 (2012) 106–126. doi:10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003.
- [55] J. Venkatesan, I. Bhatnagar, P. Manivasagan, K.-H. Kang, S.-K. Kim, Alginate composites for bone tissue engineering - A review, *Int. J. Biol. Macromol.* 72 (2015) 269–281. doi:10.1016/j.ijbiomac.2014.07.008.
- [56] Y. Qin, Alginate fibers: an overview of the production processes and applications in wound management, *Polym. Int.* 57 (2008) 171–180. doi:10.1002/pi.
- [57] M. Rinaudo, Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials, *Polym. Int.* 57 (2008) 397–430.
- [58] A.B. Lansdown, M.J. Payne, An evaluation of the local reaction and biodegradation of calcium sodium alginate (Kaltostat) following subcutaneous implantation in the rat., *J. R. Coll. Surg. Edinb.* 39 (1994) 284–288.
- [59] K. Smetana, Cell biology of hydrogels, *Biomaterials.* 14 (1993) 1046–1050.
- [60] A.D. Augst, H.J. Kong, D.J. Mooney, Alginate hydrogels as biomaterials, *Macromol. Biosci.* 6 (2006) 623–633. doi:10.1002/mabi.200600069.
- [61] R.S. Singh, G.K. Saini, J.F. Kennedy, Pullulan: microbial sources, production and applications, *Carbohydr. Polym.* 73 (2008) 515–531.
- [62] R.S. Singh, G.K. Saini, Biosynthesis of pullulan and its applications in food and pharmaceutical industry, in: *Microorg. Sustain. Agric. Biotechnol.*, Springer, 2012: pp. 509–553.
- [63] R.S. Singh, N. Kaur, V. Rana, J.F. Kennedy, Recent insights on applications of pullulan in tissue engineering, *Carbohydr. Polym.* 153 (2016) 455–462. doi:10.1016/j.carbpol.2016.07.118.
- [64] D. Kumar, N. Saini, V. Pandit, S. Ali, An insight to pullulan: a biopolymer in pharmaceutical approaches, *Int. J. Basic Appl. Sci.* 1 (2012) 202–219.
- [65] M.R. Rekha, C.P. Sharma, Pullulan as a promising biomaterial for biomedical applications: A perspective, *Trends Biomater. Artif. Organs.* 20 (2007) 111–116.
- [66] M. Chaouat, C. Le Visage, A. Autissier, F. Chaubet, D. Letourneur, The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats, *Biomaterials.* 27 (2006) 5546–5553.
- [67] S. Lack, V. Dulong, D. Le Cerf, L. Picton, J.F. Argillier, G. Muller, Hydrogels based on pullulan crosslinked with sodium trimetaphosphate (STMP): rheological study, *Polym. Bull.* 52 (2004) 429–436.
- [68] K.I. Shingel, Current knowledge on biosynthesis, biological activity, and chemical modification of the exopolysaccharide, pullulan, *Carbohydr. Res.* 339 (2004) 447–460.
- [69] H. Bae, A.F. Ahari, H. Shin, J.W. Nichol, C.B. Hutson, M. Masaeli, S.-H. Kim, H. Aubin, S. Yamanlar, A. Khademhosseini, Cell-laden microengineered pullulan methacrylate hydrogels promote cell proliferation and 3D cluster formation, *Soft Matter.* 7 (2011) 1903–1911. doi:10.1039/C0SM00697A.
- [70] J.A. Burdick, K.S. Anseth, Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering, *Biomaterials.* 23 (2002) 4315–4323.
- [71] M. Dadsetan, M. Giuliani, F. Wanivenhaus, M.B. Runge, J.E. Charlesworth, M.J. Yaszemski, Incorporation of phosphate group modulates bone cell attachment and differentiation on oligo (polyethylene glycol) fumarate hydrogel, *Acta Biomater.* 8 (2012) 1430–1439.
- [72] C.B. Hutson, J.W. Nichol, H. Aubin, H. Bae, S. Yamanlar, S. Al-Haque, S.T. Koshy, A. Khademhosseini, Synthesis and characterization of tunable poly (ethylene glycol): gelatin methacrylate composite hydrogels, *Tissue Eng. Part A.* 17 (2011) 1713–1723.
- [73] A. Phadke, Y.R. V Shih, S. Varghese, Mineralized Synthetic Matrices as an Instructive

- Microenvironment for Osteogenic Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells, *Macromol. Biosci.* 12 (2012) 1022–1032. doi:10.1002/mabi.201100289.
- [74] G. Frens, Controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions, *Nature.* 241 (1973) 20–22.
- [75] R.M. Day, A.R. Boccaccini, S. Shurey, J.A. Roether, A. Forbes, L.L. Hench, S.M. Gabe, Assessment of polyglycolic acid mesh and bioactive glass for soft-tissue engineering scaffolds, *Biomaterials.* 25 (2004) 5857–5866. doi:10.1016/j.biomaterials.2004.01.043.
- [76] J.J. Blaker, R.M. Day, V. Maquet, A.R. Boccaccini, Novel bioresorbable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) and PLGA/Bioglass(R) composite tubular foam scaffolds for tissue engineering applications, *Adv. Mater. Forum* li. 455–456 (2004) 415–419. doi:10.4028/www.scientific.net/MSF.455-456.415.
- [77] K. Magyari, L. Baia, A. Vulpoi, S. Simon, O. Popescu, V. Simon, Bioactivity evolution of the surface functionalized bioactive glasses, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 103 (2015) 261–272. doi:10.1002/jbm.b.33203.
- [78] L. Baia, D. Muresan, M. Baia, J. Popp, S. Simon, Structural properties of silver nanoclusters-phosphate glass composites, *Vib. Spectrosc.* 43 (2007) 313–318. doi:10.1016/j.vibspec.2006.03.006.
- [79] K. Magyari, R. Stefan, D.C. Vodnar, A. Vulpoi, L. Baia, The silver influence on the structure and antibacterial properties of the bioactive 10B2O3–30Na2O–60P2O2 glass, *J. Non. Cryst. Solids.* 402 (2014) 182–186. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2014.05.033.
- [80] Downs RT., The RUFF project: An integrated study of the chemistry c, Raman and infrared spectroscopy of minerals., in: RUFF Proj. An Integr. Study Chem. C, Raman Infrared Spectrosc. Miner. Progr. Abstr. 19th Gen. Meet. Int. Mineral. Assoc. Kobe, Japan, RRUFF ID: R060180. <http://rruff.info/general5HA/display5default/R060180.>, 2006: pp. 3–13. <http://rruff.info/general5HA/display5default/R060180>.
- [81] S. Zhang, C. Du, Z. Wang, X. Han, K. Zhang, L. Liu, Reduced cytotoxicity of silver ions to mammalian cells at high concentration due to the formation of silver chloride, *Toxicol. Vitro.* 27 (2013) 739–744. doi:10.1016/j.tiv.2012.12.003.
- [82] S. Padilla, J. Roman, S. Sánchez-Salcedo, M. Vallet-Regi, Hydroxyapatite/SiO₂–CaO–P₂O₅ glass materials: In vitro bioactivity and biocompatibility, *Acta Biomater.* 2 (2006) 331–342.
- [83] A. Mechler, A.A.J. Torriero, A. Nafady, C.-Y. Lee, A.M. Bond, A.P. O’Mullane, S.K. Bhargava, The formation of gold nanoparticles using hydroquinone as a reducing agent through a localized pH change upon addition of NaOH to a solution of HAuCl₄, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 370 (2010) 35–41.
- [84] J. Serra, P. Gonz, FTIR and XPS studies of bioactive silica based glasses, *J. Non. Cryst. Solids.* 332 (2003) 20–27. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2003.09.013.
- [85] R. Veres, D.L. Trandafir, K. Magyari, S. Simon, D. Barbos, V. Simon, Gamma irradiation effect on bioactive glasses synthesized with polyethylene-glycol template, *Ceram. Int.* 42 (2016) 1990–1997.
- [86] H. Aguiar, J. Serra, P. González, B. León, Structural study of sol – gel silicate glasses by IR and Raman spectroscopies, *J. Non. Cryst. Solids.* 355 (2009) 475–480. doi:10.1016/j.jnoncrysol.2009.01.010.
- [87] S. Padilla, J. Roman, A. Carenas, M. Vallet-Regi, The influence of the phosphorus content on the bioactivity of sol–gel glass ceramics, *Biomaterials.* 26 (2005) 475–483.
- [88] R.K. Singh, A. Srinivasan, Bioactivity of SiO₂–CaO–P₂O₅–Na₂O glasses containing zinc–iron oxide, *Appl. Surf. Sci.* 256 (2010) 1725–1730.
- [89] A. Barth, Infrared spectroscopy of proteins, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 1767 (2007) 1073–1101. doi:10.1016/j.bbabi.2007.06.004.
- [90] S. Tunc, M.F. Maitz, G. Steiner, L. Vázquez, M.T. Pham, R. Salzer, In situ conformational analysis of fibrinogen adsorbed on Si surfaces, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 42 (2005) 219–225.
- [91] K. Nakamura, S. Era, Y. Ozaki, M. Sogami, T. Hayashi, M. Murakami, Conformational changes in seventeen cystine disulfide bridges of bovine serum albumin proved by Raman spectroscopy, *Febs Lett.* 417 (1997) 375–378.
- [92] S. Lu, D. Xia, G. Huang, H. Jing, Y. Wang, H. Gu, Concentration effect of gold nanoparticles on proliferation of keratinocytes, *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 81 (2010) 406–411.
- [93] M. Vallet-Regi, C. Victoria Ragel, A.J. Salinas, M. Vallet-Regí, C.V. Ragel, Glasses with Medical

- Applications, *Eur. J. Inorg. Chem.* (2003) 1029–1042. doi:10.1002/ejic.200390134.
- [94] A. Vulpoi, L. Baia, S. Simon, V. Simon, Silver effect on the structure of SiO₂-CaO-P₂O₅ ternary system, *Mater. Sci. Eng. C* 32 (2012) 178–183. doi:10.1016/j.msec.2011.10.015.
- [95] I.-H. Lee, H. Yu, N.J. Lakhkar, H.-W. Kim, M.-S. Gong, J.C. Knowles, I.B. Wall, Development, characterisation and biocompatibility testing of a cobalt-containing titanium phosphate-based glass for engineering of vascularized hard tissues, *Mater. Sci. Eng. C* 33 (2013) 2104–2112. doi:10.1016/j.msec.2013.01.024.
- [96] R.A. Popescu, K. Magyari, R. Stefan, I. Papuc, L. Baia, Structural Particularities of the silver and copper doped SiO₂-CaO-P₂O₅ Based bioactive glasses, *Stud. Ubb Phys.* 60 (2015) 103–108.
- [97] W. Höland, Glass-Ceramics, in: J.R. Jones, A.G. Clare (Eds.), *Bio-Glasses*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 2012: pp. 97–105. doi:10.1002/9781118346457.ch7.
- [98] A.S. Ethiraj, D.J. Kang, Synthesis and characterization of CuO nanowires by a simple wet chemical method, *Nanoscale Res. Lett.* 7 (2012) 70. doi:10.1186/1556-276X-7-70.
- [99] L. Bao, S. Yang, X. Luo, J. Lei, Q. Cao, J. Wang, Fabrication and characterization of a novel hydrophobic CaCO₃ grafted by hydroxylated poly(vinyl chloride) chains, *Appl. Surf. Sci.* 357 (2015) 564–572. doi:10.1016/j.apsusc.2015.08.249.
- [100] A. Bonici, G. Lusvardi, G. Malavasi, L. Menabue, A. Piva, Synthesis and characterization of bioactive glasses functionalized with Cu nanoparticles and organic molecules, *J. Eur. Ceram. Soc.* 32 (2012) 2777–2783. doi:10.1016/j.jeurceramsoc.2012.02.058.
- [101] A. Thulasiramudu, S. Buddhudu, Optical characterization of Cu²⁺ ion-doped zinc lead borate glasses, *J. Quant. Spectrosc. Radiat. Transf.* 97 (2006) 181–194. doi:10.1016/j.jqsrt.2005.04.006.
- [102] M.S. Selim, E. Metwalli, Optical and transport properties of thin sheets of CuO-PbO-B₂O₃ glasses, *Mater. Chem. Phys.* 78 (2003) 94–98. doi:10.1016/S0254-0584(02)00186-4.
- [103] C. Wu, Y. Zhou, M. Xu, P. Han, L. Chen, J. Chang, Y. Xiao, Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity, *Biomaterials* 34 (2013) 422–433. doi:10.1016/j.biomaterials.2012.09.066.
- [104] J.M. Andrews, Determination of minimum inhibitory concentrations, *J. Antimicrob. Chemother.* 48 (2001) 5–16. doi:10.1093/jac/48.suppl_1.5.
- [105] Q. Yang, Y. Zhang, M. Liu, M. Ye, Y. Zhang, S. Yao, Study of fibrinogen adsorption on hydroxyapatite and TiO₂ surfaces by electrochemical piezoelectric quartz crystal impedance and FTIR-ATR spectroscopy, *Anal. Chim. Acta.* 597 (2007) 58–66. doi:10.1016/j.aca.2007.06.025.
- [106] K. Magyari, L. Baia, O. Popescu, S. Simon, V. Simon, The anchoring of fibrinogen to a bioactive glass investigated by FT-IR spectroscopy, *Vib. Spectrosc.* 62 (2012) 172–179. doi:10.1016/j.vibspec.2012.04.006.
- [107] R.A. Popescu, K. Magyari, A. Vulpoi, D.L. Trandafir, E. Licarete, M. Todea, R. Stefan, C. Voica, D.C. Vodnar, S. Simon, I. Papuc, L. Baia, Bioactive and biocompatible copper containing glass-ceramics with remarkable antibacterial properties and high cell viability designed for future in vivo trials, *Biomater. Sci.* (2016) 1252–1265. doi:10.1039/c6bm00270f.
- [108] S. Saber-Samandari, M. Gazi, Pullulan based porous semi-IPN hydrogel: Synthesis, characterization and its application in the removal of mercury from aqueous solution, *J. Taiwan Inst. Chem. Eng.* 0 (2015) 1–9. doi:10.1016/j.jtice.2015.01.013.
- [109] C. Sartori, D.S. Finch, B. Ralph, Determination of the cation content of alginate thin films by FT-IR spectroscopy, *Polymer (Guildf)* 38 (1997) 43–51. doi:10.1016/S0032-3861(96)00458-2.