

## Thèse

**MATÉRIAUX POLYMÈRES AVEC HYDROPHILIE  
CONTRÔLÉE. APPLICATIONS EN INGÉNIERIE  
TISSULAIRE DU CARTILAGE ARTICULAIRE**

présentée devant  
Université Technique Universitee Technique 'Gh.Asachi' Iasi  
et  
INSA Lyon

pour obtenir  
le grade de docteur

Ecole doctorale : MEGA  
Spécialité : Biomécanique

par

**Luciana Elena BOSTAN**

Bio-Ingénieur de l'Université de Iasi, Roumanie  
Soutenance prévu le 11 février 2011 devant la Commission d'examen

BERTHIER Yves	DR	INSA Lyon	Directeur de
Thèse			
CASCAVAL Dan	Professeur	UTI, Iasi	Président
DESBRIERES Jacques	Professeur	IPREM, Pau	Rapporteur
MELNIG Viorel	Professeur	UAIC, Iasi	Rapporteur
POPA Marcel Ionel	Professeur	UTI, Iasi	Directeur de
Thèse			
TRUNFIO-SFARGHIU Ana-Maria	CR2	INSA Lyon	Examineur

**Cette thèse a été préparée en cotutelle entre:**

**Universitee Technique 'Gh.Asachi' Iasi  
et INSA de Lyon**

**Laboratoire de Mécanique des Contacts et des Solides (LAMCOS)**

**UMR CNRS 5514 - INSA de Lyon**

# INSA Direction de la Recherche - Ecoles Doctorales – Quadriennal 2007-2010

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
<b>CHIMIE</b>	<p><b><u>CHIMIE DE LYON</u></b>  <a href="http://sakura.cpe.fr/ED206">http://sakura.cpe.fr/ED206</a></p> <p>M. Jean Marc LANCELIN</p> <p>Insa : R. GOURDON</p>	<p>M. Jean Marc LANCELIN</p> <p>Université Claude Bernard Lyon 1            Bât CPE            43 bd du 11 novembre 1918            69622 VILLEURBANNE Cedex            Tél : 04.72.43 13 95 Fax :            lancelin@hikari.cpe.fr</p>
<b>E.E.A.</b>	<p><b><u>ELECTRONIQUE,</u></b>  <b><u>ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE</u></b>  <a href="http://www.insa-lyon.fr/eea">http://www.insa-lyon.fr/eea</a></p> <p>M. Alain NICOLAS</p> <p>Insa : C. PLOSSU            ede2a@insa-lyon.fr            Secrétariat : M. LABOUNE            AM. 64.43 – Fax : 64.54</p>	<p>M. Alain NICOLAS</p> <p>Ecole Centrale de Lyon            Bâtiment H9            36 avenue Guy de Collongue            69134 ECULLY            Tél : 04.72.18 60 97 Fax : 04 78 43 37 17            eea@ec-lyon.fr            Secrétariat : M.C. HAVGOUDOUKIAN</p>
<b>E2M2</b>	<p><b><u>EVOLUTION, ECOSYSTEME,</u></b>  <b><u>MICROBIOLOGIE, MODELISATION</u></b>  <a href="http://biomserv.univ-lyon1.fr/E2M2">http://biomserv.univ-lyon1.fr/E2M2</a></p> <p>M. Jean-Pierre FLANDROIS</p> <p>Insa : H. CHARLES</p>	<p>M. Jean-Pierre FLANDROIS</p> <p>CNRS UMR 5558            Université Claude Bernard Lyon 1            Bât G. Mendel            43 bd du 11 novembre 1918            69622 VILLEURBANNE Cédex            Tél : 04.26 23 59 50 Fax 04 26 23 59 49            06 07 53 89 13            e2m2@biomserv.univ-lyon1.fr</p>
<b>EDISS</b>	<p><b><u>INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-</u></b>  <b><u>SANTE</u></b></p> <p>Sec : Safia Boudjema</p> <p>M. Didier REVEL</p> <p>Insa : M. LAGARDE</p>	<p>M. Didier REVEL</p> <p>Hôpital Cardiologique de Lyon            Bâtiment Central            28 Avenue Doyen Lépine            69500 BRON            Tél : 04.72.68 49 09 Fax :04 72 35 49 16            Didier.revel@creatis.uni-lyon1.fr</p>
<b>INFOMATHS</b>	<p><b><u>INFORMATIQUE ET</u></b>  <b><u>MATHEMATIQUES</u></b>  <a href="http://infomaths.univ-lyon1.fr">http://infomaths.univ-lyon1.fr</a></p> <p>M. Alain MILLE</p>	<p>M. Alain MILLE</p> <p>Université Claude Bernard Lyon 1            LIRIS - INFOMATHS            Bâtiment Nautibus            43 bd du 11 novembre 1918            69622 VILLEURBANNE Cedex            Tél : 04.72. 44 82 94 Fax 04 72 43 13 10  <a href="mailto:infomaths@bat710.univ-lyon1.fr">infomaths@bat710.univ-lyon1.fr</a> - alain.mille@liris.cnrs.fr</p>

<p><b>Matériaux</b></p>	<p><b><u>MATERIAUX DE LYON</u></b></p> <p>M. Jean Marc PELLETIER</p> <p>Secrétariat : C. BERNAVON 83.85</p>	<p>M. Jean Marc PELLETIER</p> <p>INSA de Lyon MATEIS Bâtiment Blaise Pascal 7 avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cédex Tél : 04.72.43 83 18 Fax 04 72 43 85 28 Jean-marc.Pelletier@insa-lyon.fr</p>
<p><b>MEGA</b></p>	<p><b><u>MECANIQUE, ENERGETIQUE, GENIE CIVIL, ACOUSTIQUE</u></b></p> <p>M. Jean Louis GUYADER</p> <p>Secrétariat : M. LABOUNE PM : 71.70 –Fax : 87.12</p>	<p>M. Jean Louis GUYADER</p> <p>INSA de Lyon Laboratoire de Vibrations et Acoustique Bâtiment Antoine de Saint Exupéry 25 bis avenue Jean Capelle 69621 VILLEURBANNE Cedex Tél :04.72.18.71.70 Fax : 04 72 43 72 37 mega@lva.insa-lyon.fr</p>
<p><b>ScSo</b></p>	<p><b><u>ScSo*</u></b></p> <p>M. OBADIA Lionel</p> <p>Insa : J.Y. TOUSSAINT</p>	<p>M. OBADIA Lionel</p> <p>Université Lyon 2 86 rue Pasteur 69365 LYON Cedex 07 Tél : 04.78.77.23.88 Fax : 04.37.28.04.48 Lionel.Obadia@univ-lyon2.fr</p>

\*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

## Abstract

The mechanical performances as bearing surface (high resistance to shocks, friction and very low wear) of the articular cartilage are due to both: (1) organization of its structure from the macro to the nano level, (2) chemical species composing the extracellular matrix that imposes its highly hydrophilic character. However, many diseases affect the articular cartilage leading to articular cartilage wear. In these conditions, the articular cartilage shows its greatest shortcoming: its inability to self-repair. Attempts to repair in both natural and surgical ways currently allow the regeneration of fibrous tissue with less resistance to shocks and wear compared to the native articular cartilage. That is why current research is moving to stimulate the repair of articular cartilage by developing tissue engineering techniques. The goal of tissue engineering for articular cartilage is to obtain a material that is equivalent to the healthy articular cartilage, both structurally and functionally, using cells and / or different "biomaterials" *in vitro*. For the work described in this thesis we chose HEMA (hydroxyethyl methacrylate) type polymeric materials because of their structure similarities with articular cartilage. However one of the disadvantages is the low hydrophilic character of HEMA hydrogels (~21%) compared to the articular cartilage (~70%).

In this context, this thesis aims to develop new polymers of p (HEMA) that reproduce the structure, the mechanical properties and the physico-chemical properties of healthy cartilage in order to apply them in tissue engineering of articular cartilage.

To do so, new biomaterials - hydrogels p (HEMA) were obtained by controlling the hydrophilic nature of hydrogels p (HEMA) in their chemical synthesis in the presence of various co-monomers. Then, these new hydrogels were characterized from the point of view of their physico-chemical, mechanical and tribological properties in order to select the hydrogels with properties closest to the articular cartilage. For the hydrogels that were selected the controlled release of medications that minimize inflammatory during their use in tissue engineering to replace articular cartilage was verified.

Thus, this work has been performed in three main stages: (1) Obtaining new types of HEMA hydrogels with controlled hydrophilicity, (2) Selecting the hydrogels that show physico-chemical and mechanical properties similar to articular cartilage, (3) Verification of controlled release properties of anti-inflammatory drugs in order to increase their chances of being used in tissue engineering of articular cartilage.

In the first stage novel p (HEMA) hydrogels were obtained by controlling the hydrophilic character by using different co-monomer hydrophilicity Box (acrylic acid - AA, acrylamide - AAM) or hydrophobic (ethyl acrylate - AE, butyl acrylate - AB) in the presence of a bi-functional monomer with the role of crosslinker: tetraethylenglycol diacrylate (TEGDA). The optimization of the synthesis of these biomaterials was performed using a simple protocol requiring reduced cost and curing time (24 hours). The novel p (HEMA) hydrogels thus obtained were characterized from the point of view of their chemical, thermal stability, structure, surface energy.

In the second stage of this work a selection of new hydrogels obtained in the previous step has been made to get as close as possible to the physicochemical and mechanical properties of articular cartilage. This selection was carried out using physico-chemical, mechanical and tribological properties that helped control the hydrophilicity, compressive strength, tribological properties (friction coefficient).

The third stage of this work was to explore the controlled release properties of anti-inflammatory drugs through the hydrogel selected as having properties similar to articular cartilage, to verify their chance to resist implant procedure. The controlled release of active (anti-inflammatory drugs: ibuprofen and ketoprofen) was tested for hydrogels based on HEMA and AA that were subjected to tests for loading and release of these active ingredients. These active ingredients reduce the risk of inflammation due to the implantation of a biomaterial. In addition they are often used in the treatment of cartilage diseases, but their effectiveness is limited due to systemic administration (oral or blood) which generates an early drug metabolism and a reduction in the time of action (the half life of the drug is approximately 2 hours), yet these drugs can not be administered in patients that suffer from diseases of liver, kidney or gastrointestinal tract. Consequently this study aims to test the inclusion and release of active principles through the implanted hydrogels.

## **Contexte :**

Cette thèse a été effectuée dans le cadre d'une co-tutelle entre le laboratoire de Chimie Macromoléculaires de l'Université Technique de Iasi, Roumanie et le Laboratoire de Mécanique de Contacts et des Structures de l'Institut National des Science Appliquées de Lyon, France. Cette thèse a bénéficié d'un financement d'une année de l'Ambassade de France en Roumanie ce qui a permis le début de la collaboration entre les deux laboratoires.

Conformément à l'accorde de co-tutelle le manuscrit de cette thèse comporte :

- 1) un résumé étendu en français de 48 pages
- 2) le manuscrit complet rédigé en roumain – 175 pages,

# SOMMAIRE

## Resumée etendu en française:

<b><u>INTRODUCTION</u></b>	<b>11</b>
<b><u>RESUME CHAPITRE I:</u></b>	
Materiaux polymeriques pour l'ingenierie tissulaire du cartilage: types et comparaison des proprietées avec le cartilage articulaire	14
<b><u>RESUME CHAPITRE II:</u></b>	
Strategie des recherches	17
<b><u>RESUME CHAPITRE III:</u></b>	
Synthese et caracterisation chimique et physico-chimique des hydrogels	19
<b><u>RESUME CHAPITRE IV:</u></b>	
Analyse biomécanique des hydrogels	36
<b><u>RESUME CHAPITRE V:</u></b>	
Analyse tribologique des hydrogels	48
<b><u>RESUME CHAPITRE VI:</u></b>	
Etude de liberation controlé des médicaments a partir des hydrogels	52
<b><u>CONCLUSIONS</u></b>	<b>56</b>

## Manuscrit de these en roumain :

<b><u>INTRODUCERE (INTRODUCTION)</u></b>	<b>61</b>
<b><u>CAPITOLUL I</u></b>	
<b><u>MATERIALE POLIMERICE CU APLICATII ÎN INGINERIA TISULARĂ A CARTILAJULUI ARTICULAR</u></b> (Materiaux polymeriques pour l'ingenierie tissulaire du cartilage articulaire)	<b>61</b>
<b><u>I.1. STRUCTURA ȘI PROPRIETĂȚILE CARTILAJULUI ARTICULAR</u></b> (Structure et propriétés du cartilage articulaire)	
<b><u>I.1.1. MACRO-STRUCTURA CARTILAJULUI ARTICULAR</u></b> (Macrostructure du cartilage articulaire)	<b>62</b>
<b><u>I.1.2. COMPOZIȚIA CARTILAJULUI ARTICULAR</u></b> (composition du cartilage articulaire)	<b>62</b>
I.1.2.1. Condrocitele	63
I.1.2.2. Matricea extracelulară	64
I.1.2.2.1. Componenta lichidă	64
I.1.2.2.2. Macromoleculele de structură	64
<b><u>I.1.3. MICROSTRUCTURA CARTILAJULUI ARTICULAR</u></b> (Microstructure du cartilage articulaire)	<b>69</b>
<b><u>I.1.4. PROPRIETĂȚILE CARTILAJULUI ARTICULAR</u></b> (propriétés du cartilage articulaire)	<b>70</b>
I.1.4.1. Proprietățile biologice (propriétés biologiques)	71

I.1.4.1.1. Mecanismul de compensare al uzurii (le mecanisme de compensation de l'usure)	71
I.1.4.1.2. Mecanismul remodelării osoase (le mécanisme de remodelation osseuse)	71
I.1.4.2. Proprietățile fizico-chimice (propriétés physico-chimiques)	72
I.1.4.3. Proprietățile biomecanice (propriétés biomécaniques)	73
I.1.4.3.1 Rezistența la compresiune (resistance à la compression)	73
I.1.4.3.2. Rezistența la forfecare (resistance au cisaillement)	76
I.1.4.3.3. Rezistența la tracțiune (resistance à la traction)	77
I.1.4.3.4. Rezistența la fisurare (resistance aux fissurations)	77
I.1.4.4. Lubrifierea cartilajului articular (lubrification du cartilage articulaire)	77
I.1.4.5. Nutriția condrocitelor (nutrition des chondrocytes)	78
<b>I.2. PATOLOGIA CARTILAJULUI ARTICULAR: METODE CURENTE DE TRATAMENT</b>	
(pathologies du cartilage articulaire: methode actuelles du traitement)	<b>80</b>
<b>I.2.1. RĂSPUNSUL CARTILAJULUI ARTICULAR LA AGRESIUNE (reponse du cartilage aux agresions)</b>	<b>80</b>
I.2.1.1. Microleziunea (microlesions)	81
I.2.1.2. Fractura condrală (fracture condrales)	81
I.2.1.3. Fractura osteocondrală (fractures osteo-condrales)	82
<b>I.2.2. TRATAMENTUL LEZIUNILOR CARTILAJULUI ARTICULAR (traitements des lesions du cartilage)</b>	<b>82</b>
I.2.2.1. Tratamentul medicamentos al leziunilor cartilajului articular (traitements a base des médicaments)	82
I.2.2.1.1. Glucozamina și condroitin sulfatul (glucosamine et chondroitinsulfate)	82
I.2.2.1.2. Acidul hialuronic (acide hyaluronique)	82
I.2.2.1.3. Glucocorticoizii (glucocorticoides)	83
I.2.2.1.4. Antiinflamatoare nesteroidiene (antiinflammatoires)	83
I.2.2.2. Tratamentul chirurgical al leziunilor cartilajului articular (le traitement chirurgical)	83
I.2.2.2.1. Transplantul ostocondral autolog (transplant osteocondral)	84
I.2.2.2.2. Implantarea de condrocite autologe (implant des chondrocytes)	85
<b>I.3. BIOMATERIALE UTILIZATE ÎN INGINERIA TISULARĂ A CARTILAJULUI ARTICULAR</b>	
(biomatériaux utilisées dans l'ingenierie tissulaire du cartilage articulaire)	<b>86</b>
<b>I.3.1. MATERIALE POLIMERICE SINTETICE UTILIZATE CA BIOMATERIALE ÎN ORTOPEDIE</b>	
(matériaux polymeriques utilisées dans l'orthopedie)	<b>88</b>
I.3.1.1. Polietilenele (Polyéthylènes)	90
I.3.1.2. Poli(clorura de vinil) (Poly (chlorure de vinyle))	92
I.3.1.3. Politetrafluoretilena (Polytétrafluoroéthylène)	93
I.3.1.4. Poli(alcoolul vinilic) (Poly (alcool vinylique))	95
I.3.1. 5. Polimeri acrilici (Polymères acryliques)	98
I.3.1. 5. 1. Poli(metacrilatul de metil) (Poly (méthacrylate de méthyle))	98
I.3.1.6. Poliamide (Polyamides)	100
I.3.1.7. Poliuretani (Polyuréthanes)	101



<b><u>I.3.2. POLIMERI UTILIZAȚI PENTRU ÎNLOCUIREA CARTILAJULUI ARTICULAR</u></b> (Polymères utilisés pour remplacer le cartilage articulaire)	<b>103</b>
<b><u>I.3.3. HIDROGELURI PE BAZĂ DE P(HEMA)</u></b> (Hydrogels à base de P (HEMA))	<b>110</b>
I.3.3.1 Structura p(HEMA) (La structure de p (HEMA))	111
I.3.3.2. Caracteristici fizico-chimice și mecanice (Propriétés physico-chimiques et mécaniques)	113
<b><u>I.3.4. PROPRIETĂȚILE DE VOLUM ALE HIDROGELURILOR</u></b> (Les propriétés de volume des hydrogels)	<b>114</b>
<b><u>I.3.5. PROPRIETĂȚILE MECANICE ALE HIDROGELURILOR</u></b> (Les propriétés mécaniques des hydrogels)	<b>114</b>
I.3.5.1. Extensiometria (L'extensomètre)	115
I.3.5.2. Rezistența la compresiune (Résistance en compression)	116
I.3.5.3. Testul de indentare (Résistance à l'indentation)	116
<b><u>I.4. CONCLUZII</u></b> (conclusions)	<b>116</b>

## **CAPITOLUL II**

<b><u>STRATEGIA EXPERIMENTALĂ</u></b> (strategie experimentale)	<b>127</b>
<b><u>II.1. CONCEPT EXPERIMENTAL</u></b> (concepts expérimentaux)	<b>120</b>
<b><u>II.1.1. MATERIALE FOLOSITE</u></b> (Matériaux utilisés)	<b>122</b>
<b><u>II.1.2. REACTIVI</u></b> (Réactifs)	<b>122</b>
<b><u>II.2. METODE DE ANALIZĂ</u></b> (Méthodes d'analyse)	<b>126</b>
<b><u>II.2.1. ANALIZA PRIN SPECTROSCOPIE ÎN INFRAROSU (FTIR)</u></b> (L'analyse par spectroscopie infrarouge (FTIR))	<b>126</b>
<b><u>II.2.2 METODE DE ANALIZĂ TERMICĂ</u></b> (L'analyse par dégradation thermique)	<b>130</b>
<b><u>II.2.3. EVALUAREA ENERGIEI DE SUPRAFATĂ</u></b> (Evaluation de l'énergie de surface)	<b>132</b>
II.2.3.1. Teoriile energiei de suprafață (Théories énergie de surface)	133
II.2.3.1.1. Teoria lui Young (La théorie de Young)	133
II.2.3.1.2. Teoria lui Fowkes (La théorie de Fowkes)	134
II.2.3.1.3. Teoria acid-bază (La théorie acide-base)	135
<b><u>II.2.4. STUDII DE INTERACȚIUNE CU FLUIDE (STUDII DE UMFLARE)</u></b> (Les études d'interaction avec des fluides (études de gonflement))	<b>136</b>
II.2.4. 1. Cinetica umflării (Cinétique de gonflement)	137
<b><u>II.2.5. MICROSCOPIE ELECTRONICĂ DE BALEIAJ (SEM, ESEM)</u></b> (Microscopie électronique de balayage (EMEB, MEB))	<b>138</b>
<b><u>II.2.6. TESTE MECANICE ȘI TRIBOLOGICE LA SCARĂ MACRO ȘI NANO (REOMETRIE, MICROSCOPIE DE FORȚĂ ATOMICĂ)</u></b> (Essais mécaniques et tribologique a macro et nano échelle (rhéomètre, microscopie à force atomique))	<b>139</b>
II.2.6.1. Teste de reometrie (Essais rhéologiques)	139
II.2.6.1.1. Teste de compresiune (Essais de compression)	140
II.2.6.1.2. Teste de forfecare (Essais de cisaillement)	141

II.2.6.2. Microscopia de forță atomică (Microscopie à force atomique (AFM))	142
II.2.6.2.1. Tipuri de măsurători AFM (Essais AFM)	145
<b>II.2.7. TESTE <i>IN VITRO</i> DE ÎNCĂRCARE ȘI ELIBERARE DE PRINCIPII ACTIVE ÎN/DIN</b>	
<b>HIDROGELURI</b> (Essais de chargement et libération in vitro de principes actifs dans les hydrogels)	148
II.2.7.1. Modele matematice care descriu eliberarea controlată de principii biologice active (Modèles mathématiques qui décrivent la libération contrôlée de principes actifs)	158

### **CAPITOLUL III**

<b>SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA HIDROGELURILOR</b> (Synthèse et caractérisation des hydrogels)	155
<b>III.1. SINTEZA HIDROGELURILOR PE BAZĂ DE HEMA ȘI COMONOMERI CU CARACTER HIDROFIL SAU HIDROFOB</b> (Synthèse des hydrogels a base de HEMA et co-monomères hydrophiles ou hydrophobes)	157
<b>III.2. CARACTERIZAREA HIDROGELURILOR</b> (Caractérisation des hydrogels)	160
<b>III.2.1. ANALIZA PRIN SPECTROSCOPIE FTIR</b> (Analyse par spectroscopie FTIR)	160
<b>III.2.2. ANALIZE TERMICE</b> (Analyse par dégradation thermiques)	163
III.2.2.1. Analiza termogravimetrică (TG) (Analyse thermogravimétrique (TG))	163
III.2.2.1. Analiza de calorimetrie diferențială (DSC) (Analyse de la calorimétrie différentielle à balayage (DSC))	166
<b>III.3. ANALIZA MORFOLOGICĂ A HIDROGELURILOR: ESEM, SEM</b> (Analyse de la morphologie des hydrogels: ESEM, SEM)	168
<b>III.3.1. ANALIZA HIDROGELURILOR PRIN ESEM</b> (Analyse par EMEB)	168
<b>III.3.2. ANALIZA HIDROGELURILOR PRIN SEM</b> (Analyse par MEB)	169
<b>III.4. UMFLAREA ÎN SOLUȚII CU CARACTERISTICI SIMILARE CU LICHIDELE BIOLOGICE</b> (Etudes du gonflement dans des différents fluide)	170
<b>III.5. DETERMINAREA ENERGIEI DE SUPRAFATĂ</b> (Détermination de l'énergie de surface)	174
<b>III.6. CONCLUZII</b> (Conclusions)	177

### **CAPITOLUL IV**

<b>STUDII PRIVIND EVALUAREA BIOMECHANICĂ A HIDROGELURILOR</b> (Études d'évaluation biomécanique des hydrogels)	179
<b>IV.1. DETERMINAREA CARACTERISTICILOR MECANICE</b>	
<b>LA COMPRESIUNE</b> (Détermination des caractéristiques mécanique en compressions)	179
<b>IV.1.1. STABILIREA PARAMETRILOR EXPERIMENTALI</b> Paramètres expérimentaux	180
<b>IV.1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII</b> (Résultats et discussion)	182
<b>IV.2. DETERMINAREA CARACTERISTICILOR DE VÂSCOELASTICITATE</b> (Détermination des paramètres viscoélastiques)	186
<b>IV.2.1. STABILIREA PARAMETRILOR EXPERIMENTALI</b> (Paramètres expérimentaux)	187
<b>IV.2.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII</b> (Résultats et discussion)	187
<b>IV.3. ANALIZA CRITICĂ A MATERIALELOR</b> (Analyse critique des matériaux)	191

<b><u>IV.4. ANALIZA NANOMECANICĂ A HIDROGELURILOR P(HEMA-CO-AA)</u></b> (Analyse nanomécanique des hydrogels P(HEMA-CO-AA))	192
<b><u>IV.4.1. TESTE DE NANOIDENTARE</u></b> (Essais de nanoindentation)	192
<b><u>IV.4.1.1 STABILIREA PARAMETRIILOR EXPERIMENTALI</u></b> (Paramètres expérimentaux)	193
<b><u>IV.4.1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII</u></b> (Résultats et discussion)	194
<b><u>IV.5. CONCLUZII</u></b> (Conclusions)	198

## **CAPITOLUL V**

<b><u>ANALIZA TRIBOLOGICĂ A HIDROGELURILOR</u></b> (Analyse tribologique des hydrogels)	200
<b><u>V.1. STUDII DE FRECARĂ LA SCARA MACROSCOPICĂ</u></b> (Études macroscopiques du frottement des hydrogels)	201
<b><u>V.1.1. STABILIREA PARAMETRIILOR EXPERIMENTALI</u></b> (Paramètres expérimentaux)	202
<b><u>V.1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII</u></b> (Résultats et discussion)	203
<b><u>V.2. TESTE NANOTRIBOLOGICE</u></b> (essais nanotribologiques)	204
<b><u>V.2.1. STABILIREA PARAMETRIILOR EXPERIMENTALI</u></b> (Paramètres expérimentaux)	206
<b><u>V.2.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII</u></b> (Résultats et discussion)	206
<b><u>V.3. STUDII DE TOPOGRAFIE</u></b> (Etude de topographie)	208
<b><u>V.3.1. STABILIREA PARAMETRIILOR EXPERIMENTALI</u></b> (Paramètres expérimentaux)	208
<b><u>V.3.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII</u></b> (Résultats et discussion)	208
<b><u>V.4. CONCLUZII</u></b> (Conclusions)	209

## **CAPITOLUL VI**

### **STUDII CINETICE DE ÎNCĂRCARE ȘI ELIBERARE DE PRINCIPII ACTIVE ÎN/DIN**

<b><u>HIDROGELURI P(HEMA-CO-AA)</u></b> (Etudes cinétiques de chargement et libération contrôlées des principes actifs auprès des hydrogels P (HEMA-CO-AA))	211
<b><u>VI.1. ELIBERAREA CONTROLATĂ DE PRINCIPII ACTIVE: GENERALITĂȚI</u></b> (Libération contrôlée des principes actifs : Principe)	212
<b><u>VI.1.1. ALEGEREA PRINCIPIULUI ACTIV</u></b> (Choix du principe actifs)	215
VI.1.1.1. Ibuprofenul (L'ibuprofène)	218
VI.1.1.2. Ketoprofen (Le kétoprofène)	220
<b><u>VI.2. STUDII CINETICE PRIVIND DIFUZIA UNOR SUBSTANȚE BIOLOGIC ACTIVE ÎN HIDROGELURI</u></b> (Étude cinétique de diffusion des principes actifs auprès des hydrogels)	223
<b><u>VI.2.1. CARACTERIZAREA HIDROGELURILOR ÎNCĂRCATE CU PRINCIPII ACTIVE</u></b> (Caractérisation des hydrogels chargés avec des principes actifs)	223
VI.2.1.1. Încărcarea medicamentului în hidrogelurile pe baza de p(HEMA) (Caractérisation des hydrogels chargés avec des principes actifs)	224
<b><u>VI.3.1. MODELUL TEORETIC DE DIFUZIE</u></b> (Modèle théorique de la diffusion)	226
<b><u>VI.4. CONCLUZII</u></b> (conclusions)	230
<b><u>CONCLUZII GENERALE</u></b> (conclusions générales)	231
<b><u>BIBLIOGRAFIE</u></b> (bibliographie)	235

# INTRODUCTION

Les maladies ostéoarticulaires représentent environ 10% de l'ensemble des pathologies identifiées en France chaque année [Bulletin d'information en économie de la santé 111(2006)]. Ces maladies inflammatoires et dégénératives des articulations sont la plupart consécutives au vieillissement ou à un traumatisme et évoluent vers l'usure des cartilages, ce qui se traduit par un handicap sévère, de plus que aucun traitement actuel ne permet pas la réparation totale du tissu cartilagineux.

Pour cela que la recherche médicale développe des techniques d'ingénierie tissulaire, par lesquelles est possible de reconstruire la structure vivante du cartilage articulaire. Ces techniques utilisent des substrats polymériques et des cellules souches, qui sont contraintes de manière biochimique à se développer dans un tissu cartilagineux. Mais, malgré leur avancement, ces techniques ne peuvent pas être utilisées à l'échelle d'une articulation complète. Il est en effet impossible de reproduire *ex vivo* à grande échelle la structure du cartilage articulaire : celle-ci est générée *in vivo* sous l'action de contraintes mécaniques, mal connues, et qui ne sont donc pas actuellement reproductibles *ex-vivo* dans des cultures cellulaires.

Dans ce contexte, les travaux de cette thèse visent à développer des matériaux polymères capables d'être implantée à l'échelle macroscopique dans l'articulation pathologique afin de combler l'usure des cartilages articulaires.

Actuellement, les matériaux polymères jouent un rôle important dans toutes les sphères de l'activité humaine, en prenant part de plus en plus à la vie quotidienne. Parmi ceux-ci, les biomatériaux polymères sont de grande actualité étant donné la diversité des besoins médicaux et pharmaceutiques. La principale préoccupation concernant ces biomatériaux est d'améliorer leurs qualité pour arriver à avoir (1) le minimum d'intervention chirurgicale, (2) une grande biocompatibilité, (3) une résistance mécanique comparable aux tissus destinés à substituer, et (4) d'éviter les réactions inflammatoire à l'implantation par des systèmes de libération contrôlé des principes actifs anti-inflammatoire.

Bien qu'il soit disponible un grand nombre de matériaux polymériques, leur biocompatibilité et leur propriétés mécaniques limitent le nombre réel de polymères qui peuvent être utilisés dans le domaine médical. Ainsi afin d'obtenir des biomatériaux bien efficaces les matériaux polymères doivent répondre aux critères précis relatifs à leurs propriétés physicochimiques et mécaniques. Ces critères vise à contrôler des paramètres

d'intérêt biomédicaux comme: la géométrie de l'implant, le degré de gonflement à l'équilibre, l'homogénéité du matériaux, les propriétés de résistance mécanique (module d'Young, comportement viscoélastique ...) et les propriétés liées à libération contrôlée de principes actifs. En outre, ces biomatériaux doivent être stérilisés sans altérer leurs propriétés et sans agents de stérilisation permanente. De plus, ils ne doivent pas induire des réactions inflammatoires quand ils entrent en contact avec des tissus naturels et ils ne doivent pas être dégradés dans les liquides biologiques sous actions enzymatiques naturelles.

Jusqu'à présent, une variété de matériaux (naturels ou synthétiques) ont été étudiés en tant que produits potentiels pour l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire. Les matériaux naturels peuvent souvent interagir avec les cellules en facilitant l'intégration du substitut, mais ont également un certain nombre d'inconvénients liés à la réponse immunitaire et de mauvaises propriétés mécaniques à celles du cartilage articulaire. C'est pour cela qu'on s'est intéressé aux matériaux synthétiques comme candidats pour l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire. De plus, la structure des matériaux synthétiques peut être contrôlée afin de prévoir les propriétés physiques et chimiques et d'obtenir propriétés mécaniques comparables aux tissus biologiques.

Ces biomatériaux peuvent être synthétisés dans une variété de matrices (éponges, réseaux ou hydrogels). Les réseaux et l'éponges synthétiques sont des structures 2D qui ont une porosité très élevée (> 90%), qui peut servir comme moyen de transport des cellules ou des différents principes actifs, mais ne peut pas assurer les fonctions mécaniques.

En ce qui concerne le cartilage articulaire, l'aspect le plus important réside dans sa capacité à résister au cisaillement et à la compression. C'est pour cela que cette thèse s'intéresse aux polymères méthacrylates connus pour offrir des propriétés intéressantes en terme de résistances mécanique. Parmi eux, des polymères méthacrylates hydrophiles de type hydrogel p(HEMA) sont largement utilisées dans les applications biomédicales en raison de leurs propriétés remarquables de biocompatibilité étant souvent utilisé comme un produit commercial (lentilles de contact). En outre, la synthèse de ces hydrogels à base de p (HEMA) se fait en peu de temps sans nécessiter un appareillage compliqué, et un coût réduit.

Par ailleurs, il a été montré que le hydrogel p(HEMA) a une structure et un comportement mécanique en compression similaires au cartilage articulaire, résistance à la bio-dégradation (n'est pas absorbée par l'organisme), résistance à la stérilisation. Le grand désavantage de ces hydrogels vient de son caractère hydrophile qui est bien inférieur à celui du cartilage articulaire. Ainsi le hydrogel p(HEMA) est capable de retenir dans sa structure seulement ~21% massique d'eau, tandis que le cartilage articulaire retient ~70% massiques

en eau. C'est pour cela que **cette thèse vise à modifier le caractère hydrophile du hydrogel p(HEMA) afin de s'approcher du cartilage articulaire et de retrouver ses propriétés mécaniques et physicochimiques afin d'envisager leur utilisation dans la substitution du cartilage articulaire.**

Dans ce contexte, la thèse se compose de deux parties, l'une théorique et expérimental, structuré en six chapitres. Ainsi, la première partie présente le choix des moyens expérimentaux et théorique utilisées (chapitre I et II) tandis que dans la deuxième partie sont présenté les développements expérimentaux et les résultats.

Dans le **chapitre I** sont présenté la structure et les propriétés du cartilage articulaire sain ainsi que l'altération de ces propriétés dans les cas pathologiques. L'état actuel des méthodes de traitement est décrit ainsi que leurs limitations. Une telle alternative pour comble ses limitation est présentée : l'ingénierie tissulaire. Ainsi ce chapitre converge vers la nécessité de développer des nouveaux matériaux afin de substituer le cartilage articulaire pathologique.

Dans le **chapitre II** est présenté le choix de la classe des matériaux polymériques (hydrogel p(HEMA)) par rapport à l'ensemble des matériaux polymères existants. Puis il sont présenté les méthodes de caractérisation expérimentaux et théorique de ces hydrogel p(HEMA).

**Chapitre III** présente la méthodologie développée pour la synthèse et la caractérisation chimique et physicochimique des hydrogels p(HEMA). Le caractère hydrophile des hydrogels p(HEMA) est modifié avec des monomères à fort caractère hydrophile (acide acrylique - AA, l'acrylamide - AAM) ou hydrophobe (acrylate d'éthyle - AE, acrylate de butyle - AB) en présence d'un monomère bi-fonctionnel avec le rôle de réticulation : tetraéthylène glycol diacrylate (TEGDA). La caractérisation des ces hydrogels est présentée, pour vérifier leur : structure, morphologie, propriétés thermique, propriétés de surface, caractère hydrophile. Toutes ces caractérisations ont été réalisées comparatifs aux caractérisations du cartilage articulaire frais du poulet.

Dans le **chapitre IV** est une sélection critique des hydrogels synthétisés a été réalisée selon des caractérisation mécanique en compression et cisaillement des hydrogels p(HEMA). Ainsi, ont été sélectionnés uniquement les hydrogels avec un comportement en compression, cisaillement et un caractère hydrophile, similaire à celle du cartilage articulaire (hydrogels HEMA, HEMA 5% AA, HEMA 25% AA). Des essais de compression supplémentaires ont été réalisées à l'échelle nanométrique, afin de vérifier l'homogénéité des propriétés à différents échelles.

Dans le **chapitre V** les propriétés tribologiques de ces hydrogels ont été testées afin de garantir leur résistance aux contraintes mécaniques in vivo. Des essais ont été effectués à la fois au niveau macro et a micro afin de garantir leur possibilités des applications a différents échelles.

Dans le **chapitre VI** une étude de la libération contrôlée des principes actifs anti-inflammatoires auprès de hydrogels p(HEMA). Les résultats confirme leur possible utilisation dans la libération contrôlé des médicament ce qui minimise le risque d'une réaction inflammatoire souvent observée dans le cas des implants orthopédiques.

# CHAPITRE I

## MATERIAUX POLYMERES AVEC APPLICATIONS DANS L'INGENIERIE TISSULAIRE DU CARTILAGE ARTICULAIRE

### I.3 Biomatériaux utilisés dans l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire

L'ingénierie tissulaire a été défini dans une perspective très générale comme «les principes et les méthodes des sciences de l'ingénierie de la vie pour comprendre les relations fondamentales entre la structure et la fonction dans les tissus normaux et pathologiques et à développer des substituts biologiques afin de rétablir, maintenir ou améliorer leur fonctionnalité "[1]. Langer et les Vacanti ont souligné le rôle de l'ingénierie tissulaire en médecine régénérative. Ils ont remarquée que le génie tissulaire est un domaine qui nous permet d'avoir une nouvelle vision de la médecine régénératrice. Grâce à cette technologie, il devient possible de remplacer ou de régénérer les tissus endommagés.

Le concept d'ingénierie tissulaire est de combiner ou utilisée individuellement, des matrices /réseaux et des cellules et/ou des substances biologiquement actives pour former des produits qui seront implantés *in vivo*, et de contribuer à la réparation et la régénération des tissus (Figure 20).

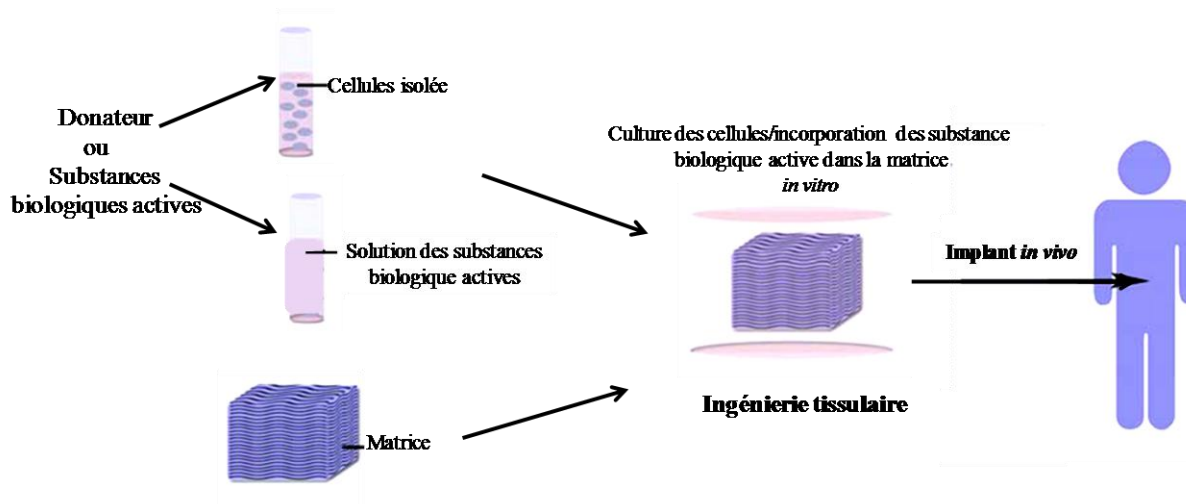


Figure 20. Schéma du principe de l'ingénierie tissulaire

1. Skalak R. and Fox C. F., *Tissue Engineering*, Ed. Alan R. Liss(1988), New York, p.30.



La matrice doit permettre la colonisation, la migration, la différenciation et la croissance cellulaire, et de guider le développement du tissu ou de permettre la libération contrôlée de médicaments. L'objectif de l'ingénierie tissulaire est de réaliser une matrice d'un matériau biocompatible, biodégradable ou non, en fonction de l'application souhaitée.

Jusqu'à présent, une variété de matériaux (naturels ou synthétiques) a été étudiée en tant que produits potentiels de l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire. Les matériaux naturels peuvent souvent interagir avec les cellules, mais aussi un certain nombre d'inconvénients liés à la réponse immunitaire et de mauvaises propriétés mécaniques en comparaison avec celles du cartilage articulaire.

Ainsi, les matières synthétiques ont été proposées comme candidats pour l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire, parce que leur structure peut être contrôlée de sorte que nous pouvons anticiper certaines propriétés physiques et chimiques, afin d'obtenir certaines propriétés mécaniques.

## CHAPITRE II

### STRATÉGIE EXPERIMENTAUX

Une variété de biomatériaux est aujourd'hui utilisée dans la chirurgie plastique et reconstructive, la dentisterie et la restauration des muscles, des os et du cartilage.

Les candidats pour les polymères biomédicaux doivent avoir une série de caractéristiques liées à leur structure, le caractère physico-chimique et mécanique et l'interaction avec l'environnement physiologique où ils seront utilisés (conditions physiologiques). Bien qu'il soit disponible dans un grand nombre de matériaux polymères, la biocompatibilité et les propriétés mécaniques ont sérieusement limité le nombre réel de polymères qui peuvent être utilisés dans le domaine médical.

L'évaluation des performances de ces polymères est absolument nécessaire pour effectuer des tests dans des conditions qui simulent les conditions physiologiques, de sorte que les résultats vont aider à des prédictions du comportement du matériau *in vivo*.

Les biomatériaux doivent avoir un degré de pureté élevé, et aussi l'utilisation d'additifs n'est pas recommandée. Pour une période plus courte ou plus long de temps, la migration de ces composants aux tissus adjacents et les liquides biologiques n'est pas souhaitable, par conséquent, composés n'ayant pas réagi doit être retiré avant l'utilisation.

Un certain nombre de propriétés des polymères peuvent être obtenus, pas avec des additifs, mais en faisant varier la structure chimique, par exemple en optant pour l'utilisation des autres copolymères.

Une fois synthétisés, les candidats doivent satisfaire à nombreuse exigences, décrites comme les propriétés chimiques et mécaniques des polymères. Les paramètres d'intérêt comprennent : la géométrie de l'implant, le degré de gonflement à l'équilibre, les propriétés élastiques, répondre aux demandes de comportement viscoélastique, la possibilité de libération contrôlée des principes actifs (médicaments).

L'analyse des résultats de la recherche scientifique sur les dispositifs médicaux utilisés pour le remplacement du cartilage a été choisi pour ce travail à une stratégie de recherche qui vis

#### L'ETUDE DE LA MODIFICATION D'HYDROPHILIE D'HYDROGELS A BASE DE P(HEMA) SUR LES PROPRIÉTÉS PHYSICO-CHIMIQUE ET MÉCANIQUES POUR L'UTILISATION COMME SUBSTITUE DU CARTILAGE ARTICULAIRE

Pour les modifications des propriétés des hydrogels à base de p (HEMA) a été introduite dans la matrice tridimensionnelle de comonomères avec une fortement caractère

hydrophile (acide acrylique-AA, l'acrylamide-AAM) ou hydrophobe (l'acrylate d'éthyle - AE, acrylate de butyle - AB). Les monomères hydrophobes et ceux hydrophiles, ont une haute résistance aux agents d'oxydation et de réduction. En plus, ces monomères ont une grande résistance à la dégradation sous l'action d'un rayonnement laser UV et la dégradation thermique.

Compte tenu du fait que le cartilage articulaire est fortement hydratés, nous avons opté pour la fabrication de réseau tridimensionnel par copolymérisation de monomères HEMA avec un comonomère AA, AAM, AE ou AB et réticulée avec un monomère bifonctionnel, le tetraéthylenglicol diacrylate (TEGDA). Quant à la réaction du système initiateur copolymérisation a été utilisée un système redox : persulfate d'ammonium (APS) et de diamine N, N, N', N'-tetraéthyletilen (TEMED).

Le caractère hydrophile a été contrôlé en changeant la quantité de comonomère pris en expérimentation, alors que la quantité d'agent de réticulation (TEGDA) a été maintenue constante. L'initiateur du système a été utilisé dans une concentration de 1% en mole par rapport au mélange total de monomères.

L'évaluation des hydrogels analyse visant la composition et la structure des matériaux synthétisés (tests de spectroscopie infrarouge, la dégradation thermique, et des études de l'énergie de surface), l'analyse morphologique (MEB-microscopie électronique à balayage, EMEB- microscopie électronique à balayage environnementale), l'évaluation de l'interaction avec fluides d'intérêt biologique.

Pour la sélection des hydrogels avec des propriétés mécaniques similaires au cartilage articulaire ont été réalisées des tests mécaniques de compression et de cisaillement.

Mais pour les hydrogels obtenus les propriétés mécaniques ont été vérifiées à l'échelle nanométrique, de manière à sélectionner les hydrogels avec une structure homogène. Une des propriétés mécaniques les plus importantes du cartilage articulaire est un très faible coefficient de friction et une usure réduite, ce qui en fait un matériau très performante du point du vue tribologiques. Par conséquent, les hydrogels synthétisés ont été évaluées en termes de propriétés tribologiques, le coefficient de frottement obtenues ont été analysées et les valeurs obtenues ont été comparées avec celles du cartilage articulaire. Les études ont été menées au moyen de l'évaluation à macro-échelle et aussi à nano-échelle.

Dans les hydrogels synthèse ont été incorporés les principes actifs utilisés dans le traitement de l'inflammation du cartilage, un mécanisme a été constituée par la diffusion, ne change pas les propriétés mécaniques des hydrogels. Ainsi, les hydrogels ont été chargés avec de l'ibuprofène et le kétoprofène. Il est étudié onc, la possibilité de libération des principes

actifs des hydrogels synthétisé et l'analysé du mécanisme de diffusion du composé thérapeutique pour les matériaux avec des propriétés mécaniques similaire du cartilage articulaire. Tous les tests ont été menés dans des conditions qui simulent le milieu physiologique le cartilage articulaire.

## CHAPITRE III

### Synthèse et caractérisation des hydrogels

#### III.1. Synthèse des hydrogels à base de HEMA et comonomères hydrophile ou hydrophobe

Les hydrogels ont été synthétisés par la méthode de polymérisation radicalaire, le processus étant celui de polymérisation en masse. La polymérisation radicalaire entre les monomères et le réticulant conduit à la formation de réseau plus ou moins dense d'hydrogel, ce type de réticulation peut introduire hétérogénéité spatiale dans le réseau des hydrogels.

Dans la réticulation chimique, les chaînes de polymères sont réticulées à différents segments de différentes longueurs. Sous l'action de la compression, la déformation est souvent localisée sur les chaînes de polymères plus courtes, et donc, le réseau réticulé est détruit. Ce problème mécanique au niveau moléculaire est également pris en charge au niveau macro, ainsi que les hydrogels classiques sont mécaniquement fragiles. Pour améliorer les propriétés physico-chimiques et mécaniques des hydrogels p (HEMA), ils ont été copolymérisés par réaction de polymérisation radicalaire de monomères présentant un caractère hydrophile (AA, AAM), ou hydrophobes (AE, AB).

Pour obtenir la structure réticulée, l'agent de réticulation utilisé est tétraéthylenglicol diacrylate (TEGDA). Comme initiateur nous avons utilisé un système redox. Ce système est composé de APS et TEMED qui forment un système redox d'initiation de la polymérisation, utilisé pour la fabrication de gels chimiques par polymérisation radicalaire [2,3]. Ce système est idéal pour déclencher l'initiation de la réaction de polymérisation facilement dans un court temps, et ce qui est important, sans aucune cytotoxicité (il permet de faire la réaction dans la température ambiante, évitant comme ça l'utilisation de la chaleur ou des solvants organiques, qui donnent la contamination toxique).

---

2. Feng X. D., Guo X. Q., Qiu K. Y., *Study of the initiation mechanism of the vinyl polymerization with the system persulfate/N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine*, *Makromolekulare Chemie* (1988), 189: 77-83.

3. Zhang X. Z., Zhuo R. X., *Synthesis and properties of fast responsive, temperature sensitive p(NIPA-co-AA) hydrogel*, *Chemical Journal of Chinese University* (2000), 21(8): 1309-1311

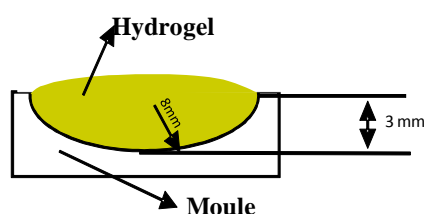
Duan et ses collègues [4] ont étudié le mécanisme d'initiation de l'APS / TEMED, et a montré que ce système a une faible toxicité, la vitesse de polymérisation est augmentée en diminuant donc la durée de synthèse de l'hydrogel.

Le degré de gonflement dans des solutions d'intérêt biologique a été contrôlé en changeant la quantité de comonomère prises dans des expériences, la concentration comprise entre 5 et 25% (mol/mol). Le montant d'agent de réticulation TEGDA était de 5% mol / mol par rapport au mélange total de monomères (HEMA + comonomère) et l'initiateur était de 1% (mol/mol) du mélange en fonction de monomère total (y compris agent de réticulation). L'Initiateur des solutions ont été préparées à des concentrations de 5% (pour cent de masse, dans l'eau distillée). Les composants ont été mélangés dans l'ordre présenté dans le tableau 5 dans le flacon de pesage et mélanger délicatement avec une spatule pour l'homogénéisation.

**Tableaux 5. Exemple des quantités calculée pour la synthèse des hydrogel HEMA 5%AA**

Substance	Quantité (ml)
HEMA	8,85
AA	0,48
TEGDA	0,05
APS	3,65
TEMED	1,85

Après l'homogénéisation, le mélange est versé dans un moule en céramique (Figure 62) pour obtenir des surfaces avec une rugosité faible. Ils sont maintenus comme ça pendant 24 heures.



**Figure 62. Représentation schématique du moule utilisée pour la synthèse des hydrogels**

Pour mieux contrôler les paramètres de la réaction (bulles dans la structure, la réponse à grande vitesse en raison de ne pas laisser tout l'air de l'hydrogel), la polymérisation a eu lieu

4. Duan S., Zhu W., Yu L. and Ding J., *Negative cooperative effect of cytotoxicity of a di-component initiating system for a novel injectable tissue engineering hydrogel*, Chinese Science Bulletin (2005), 50(11): 1093-1096.

dans des conditions anaérobies. Les substances ont été dégazéifiées avant d'être utilisées, et la polymérisation a eu lieu sous vide pour éviter les bulles d'air dans les hydrogels.

Hydrogels obtenus ont été purifiés par lavage à l'eau distillée pendant 5 jours à éliminer les produits n'ayant pas réagi, en changeant l'eau tous les jours. Cela a été révélé par la mesure du pH et de l'eau distillée : l'eau a été changée jusqu'à quand le pH de la solution de lavage n'était pas différent de celui de l'eau distillée.

Les réactions chimiques de la polymérisation sont illustrées dans la figure 63.

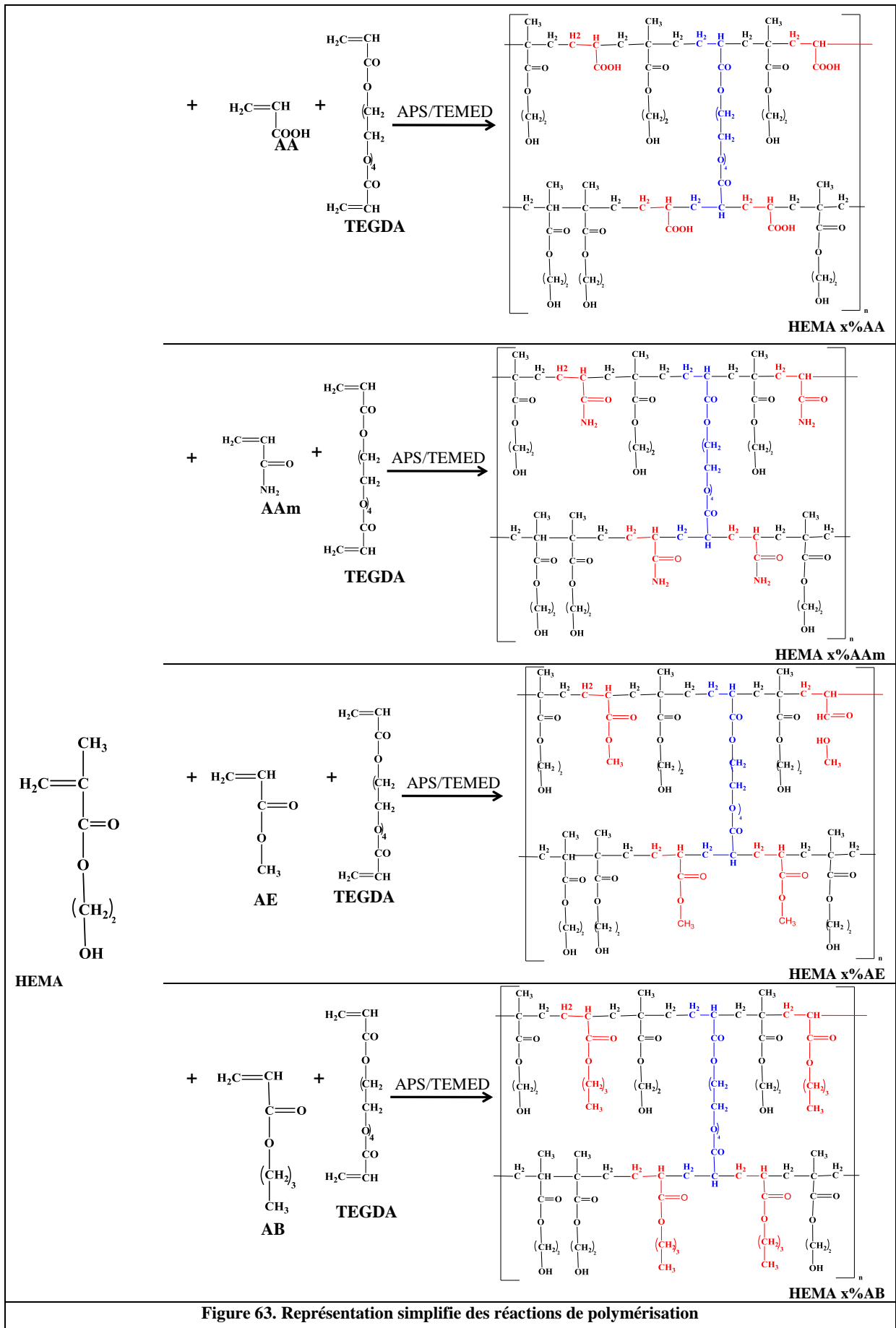


Figure 63. Représentation simplifiée des réactions de polymérisation



Par copolymérisation du HEMA avec AA ou AAm en présence d'agent de réticulation TEGDA sont obtenus des hydrogels très hydrophiles, par l'introduction des groupes-COOH ou-NH<sub>2</sub>.

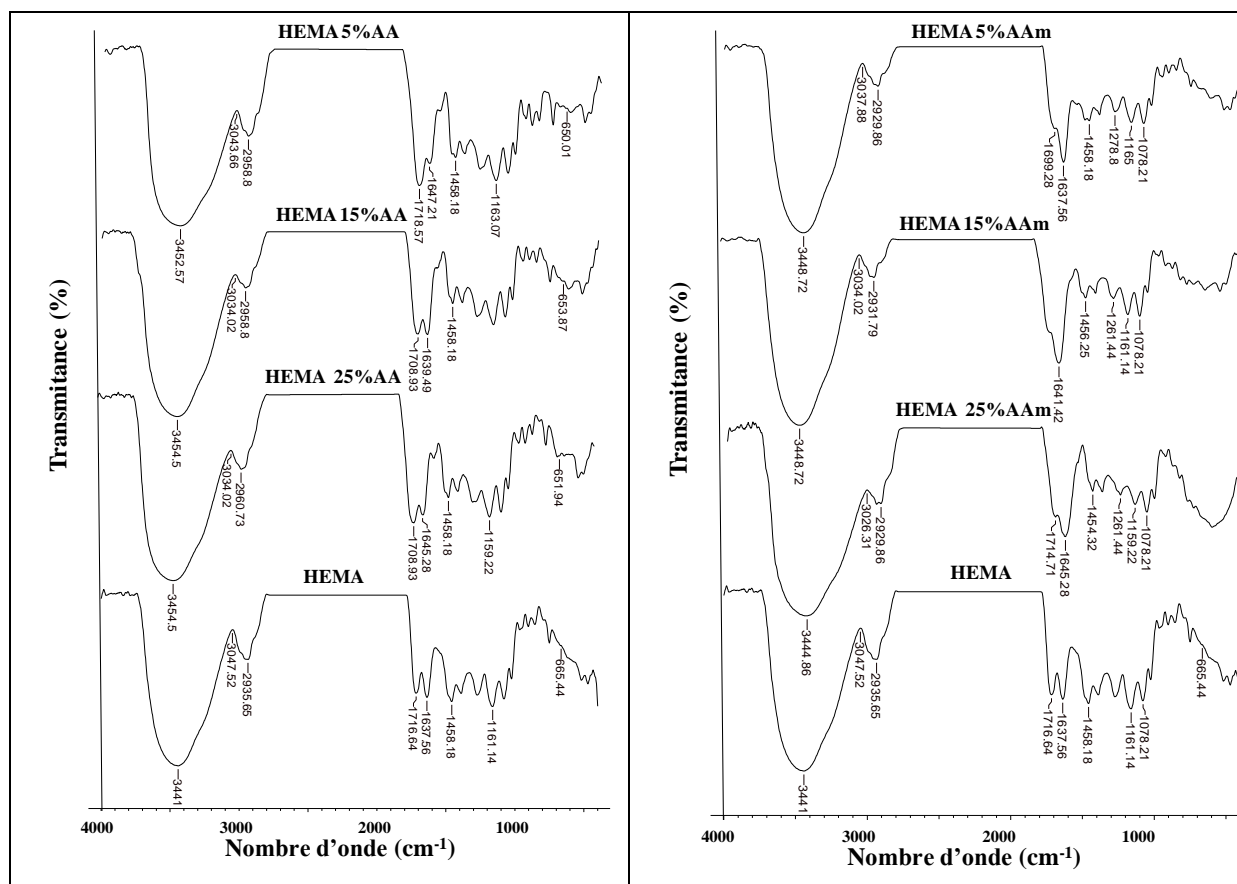
Par copolymérisation du HEMA avec AE ou AB, en présence d'agent de réticulation TEGDA sont obtenus des hydrogels avec hydrophilie réduite par rapport à p(HEMA); les caractéristiques de gonflement, dans ce cas, sont contrôlés par liaisons hydrogène mais, aussi par l'organisation des composants hydrophobes dans la matrice de polymère hydrophile.

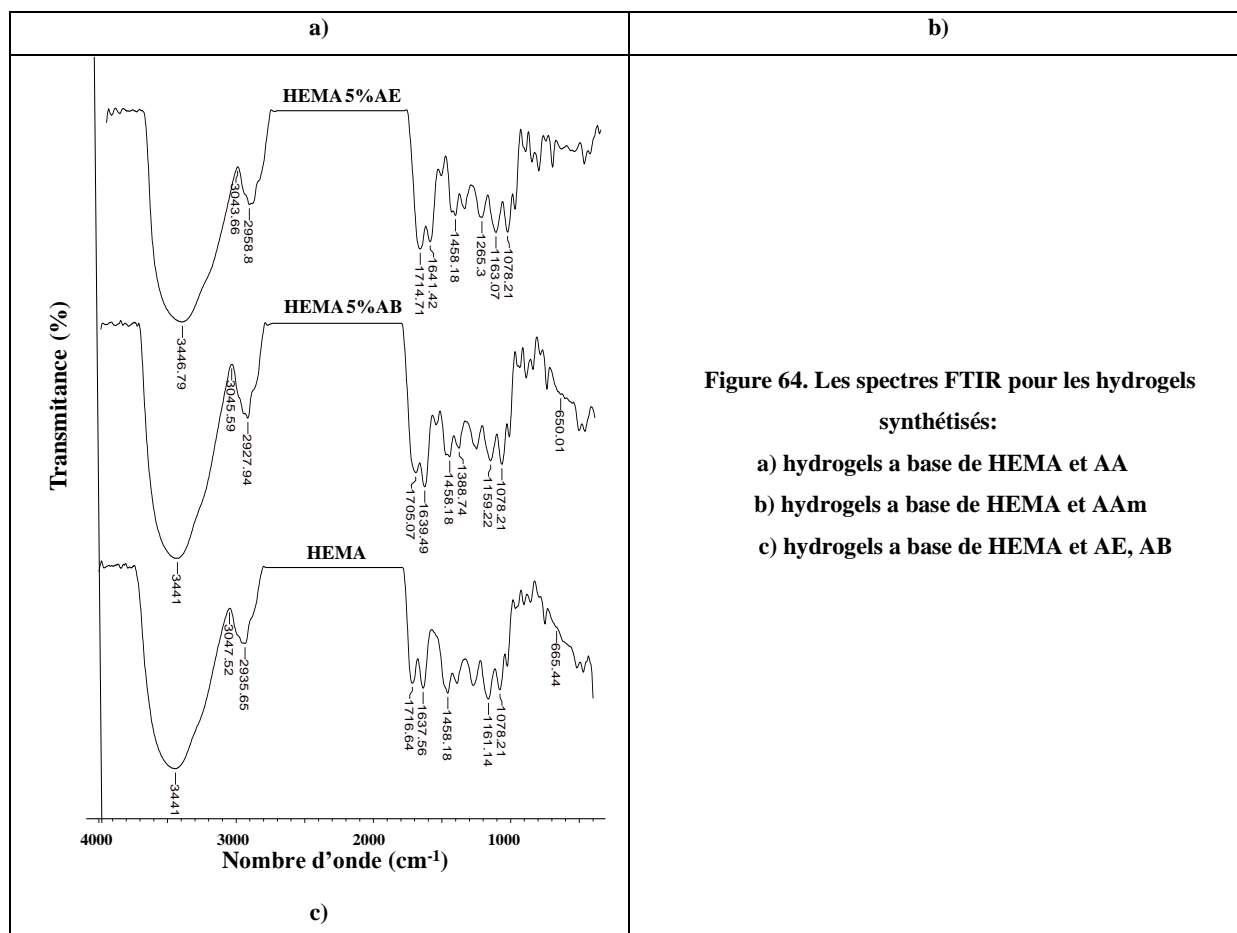
## III.2. Caractérisation des hydrogels

### III.2.1. Analyse par spectroscopie FTIR

L'analyse spectroscopique par la transformée de Fourier (FTIR) a été basée sur l'identification des bandes d'absorption correspondant à des vibrations des groupes fonctionnels des molécules dans le domaine 400-4000 cm<sup>-1</sup>. La réaction de polymérisation produit un écrasement de liaison C=C, qui a un pic d'absorption en FTIR à 1636 cm<sup>-1</sup>. Ce pic ne figure pas dans l'une des spectres des hydrogels synthétisés, ce qui nous a confirmée que la polymérisation a eu lieu.

Les spectres d'absorption des hydrogels synthétisés sont présentés dans la figure 64.





Pour tous les hydrogels synthétisés, les bandes d'absorption spécifiques pour HEMA et les comonomères utilisés, apparaissent: le pic caractéristique à  $\sim 1730 \text{ cm}^{-1}$  due à la présence de liaison C-O du réticulant TEGDA, le pic à  $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$  correspond à vibration d'élongation la liaison C = O. Les groupes OH de HEMA sont représentés par le pic à  $\sim 3440 \text{ cm}^{-1}$ , et le pic à  $\sim 1458 \text{ cm}^{-1}$  correspond à la liaison CH<sub>3</sub>. Les groupements méthyle et méthylène ont été observés à  $\sim 2960 \text{ cm}^{-1}$ . A  $1458 \text{ cm}^{-1}$  est représenté par la formation de liaisons C-C de polymères.

Le pic caractéristique observé à  $650 \text{ cm}^{-1}$  est due à des vibrations des groupes OH du la liaison carboxyle de AA. Pour hydrogels avec l'acrylamide, des autres pics caractéristiques ont été observés à  $1261 \text{ cm}^{-1}$  qui appartient à la liaison C-N.

Avec la croissance du pourcentage de comonomère on peut observer une augmentation de l'intensité de la bande -OH ( $\sim 3440 \text{ cm}^{-1}$ ), la bande correspondant à liaison C = O ( $\sim 1640 \text{ cm}^{-1}$ ) et la bande caractéristique du groupe méthyle, ce qui confirme que le copolymère est bien représenté dans la structure des hydrogels synthétisés.

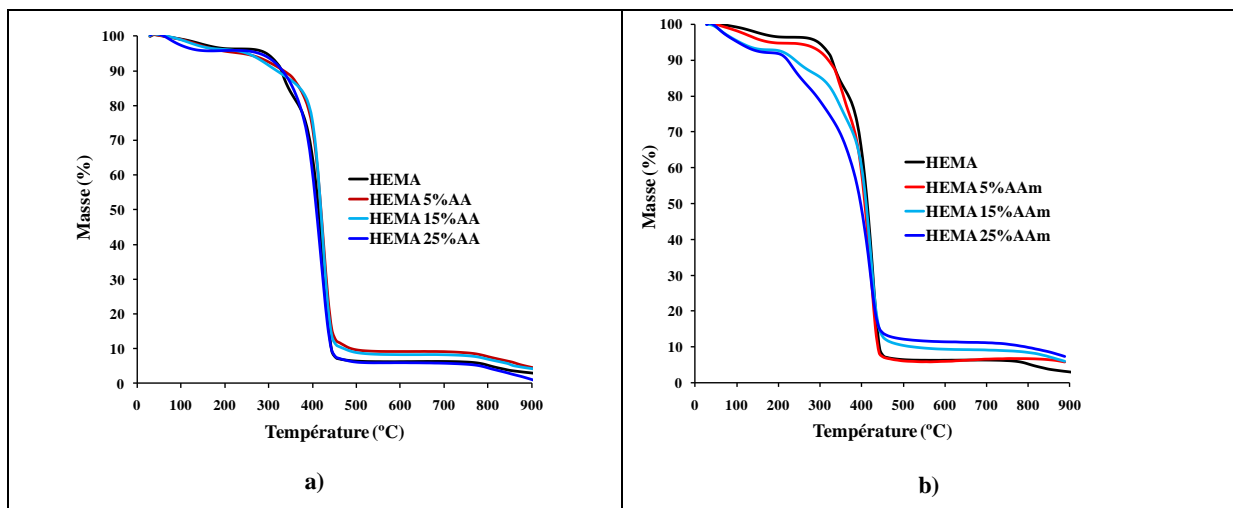
Les spectres FTIR montrent que la réaction de polymérisation a eu lieu.

## III.2.2. L'analyse par dégradation thermique

### III.2.2.1. L'analyse thermogravimétrique

Pour caractériser la stabilité thermique a été déterminée la température laquelle a lieu la dégradation thermique des polymères. Fondamentalement, avec l'initiation de la dégradation thermique des modifications de changements de poids moléculaire ont lieu [3]. Il est considéré comme la température maximale pour la stabilité du polymère, la température à laquelle la poids de l'échantillon a perdu 1% de la masse initiale. On voit facilement (Figure 62) que la dégradation thermique des hydrogels avec une intensité maximale se produit lorsque la pente est maximale, et la dérivée a une perte de poids maximum.

La flexibilité des chaînes est liée à la morphologie des systèmes polymères, la géométrie et l'activité chimique. Les thermogrammes enregistrés dans les conditions mentionnées au chapitre 2, sont notamment les courbes thermogravimétrique (TG) des hydrogels synthétisé (Figure 66) et indique que la dégradation a eu lieu en deux ou trois étapes de la dégradation thermique. La décomposition thermique est enregistrée dans deux ou trois zones distinctes. Dans le pourcentage de perte de phase, la première masse perdue est inférieure à 10%. Les principales caractéristiques thermogravimétriques sont présentées dans le tableau 6.



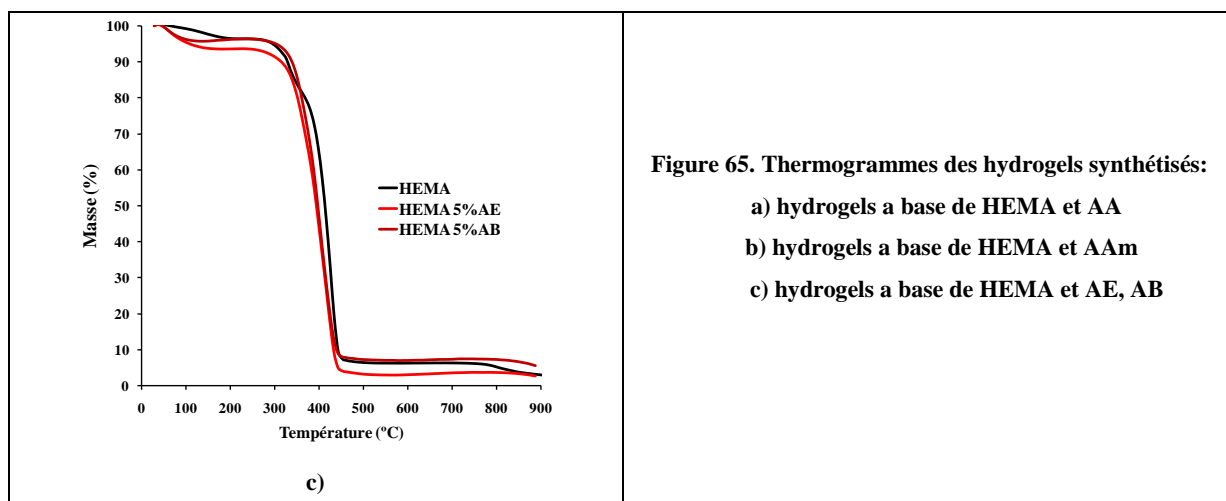


Figure 65. Thermogrammes des hydrogels synthétisés:

- a) hydrogels a base de HEMA et AA
- b) hydrogels a base de HEMA et AAm
- c) hydrogels a base de HEMA et AE, AB

Tableaux 6. Principales caractéristique thermogravimétrique

Echantillon	ETAPE	Tonse t	Tpeak	Tendset	W%	Résidu
HEMA	I	71	89	188	4	2,6
	II	<b>294</b>	335	381	18,2	
	III	381	426	445	75,2	
HEMA 5%AA	I	54	72	138	5	0
	II	<b>331</b>	419	450	95	
HEMA 15%AA	I	91	195	195	5,5	3,5
	II	<b>362</b>	425	449	91	
HEMA 25%AA	I	62	123	164	4,4	3,3
	II	251	285	392	11	
	III	<b>392</b>	423	443	81,3	
HEMA 5%AAm	I	64	163	316	5,75	5,37
	II	<b>316</b>	353	388	25,32	
	III	388	421	440	63,56	
HEMA 15%AAm	I	50	55	147	6,92	5,48
	II	<b>325</b>	337	380	26,60	
	III	380	421	445	61	
HEMA 25%AAm	I	46	57	141	8	6
	II	209	229	360	60	
	III	<b>360</b>	421	439	26	
HEMA 5%AE	I	44	62	120	7	2

	II	322	414	440	91	
HEMA 5%AB	I	43	60	104	5	6
	II	328	404	440	89	

Tonset – température laquelle commence la dégradation dans chaque étape,

Tpeak – température laquelle la vitesse de dégradation est maximum,

Tendset – température laquelle se fini le processus de degradation,

W% – le pourcentage de perte massique dans chaque étape,

Résidu – la quantité d'échantillon qui reste nedégradée a une température plus de 700°.

D'après les résultats, on peut voir que les hydrogels synthétisés ont une plus grande stabilité thermique que l'hydrogel HEMA, et cette stabilité augmente généralement avec l'augmentation de la pourcentage de co-monomère utilisé dans la synthèse.

Ces résultats sont compatibles avec les spectres FTIR, ainsi que, l'intensité du champ augmente avec augmentation des groupes-OH qui est lieu à l'augmentation du pourcentage de comonomère.

Une évaluation correcte scientifiquement peut être fait abordant le processus de dégradation thermique en termes d'énergie cinétique qui, dans ce cas un processus cinétique peut être modélisée à l'aide Arrhenius équation. En utilisant ce modèle, nous pouvons déterminer les paramètres spécifiques du processus de dégradation thermique et l'ordre de la réaction n (sur lequel des informations peuvent être obtenues sur le mécanisme de dégradation) et de l'énergie d'activation pour la décomposition thermique (tableau 7).

**Tableaux 7. Valeurs d'énergie d'activation**

<b>Echantillon</b>	<b>Ea (kJ/mol)</b>	<b>n</b>
HEMA	144±0,77	0,44±4,41e-03
HEMA 5%AA	137±1,72	0,60±24,70e-03
HEMA 15%AA	252±1,19	1,06±1,09e-03
HEMA 25%AA	304±2,69	1,24±15,33e-03
HEMA 5%AAm	134±2,05	0,47±12,66e-03
HEMA 15%AAm	113±2,30	1,06±7,5e-03
HEMA 25%AAm	240±1,42	0,36±13,16e-03
HEMA 5%AE	70±1,36	0,34±19,56e-03
HEMA 5%AB	88±22,6	0,55±22,6e-03

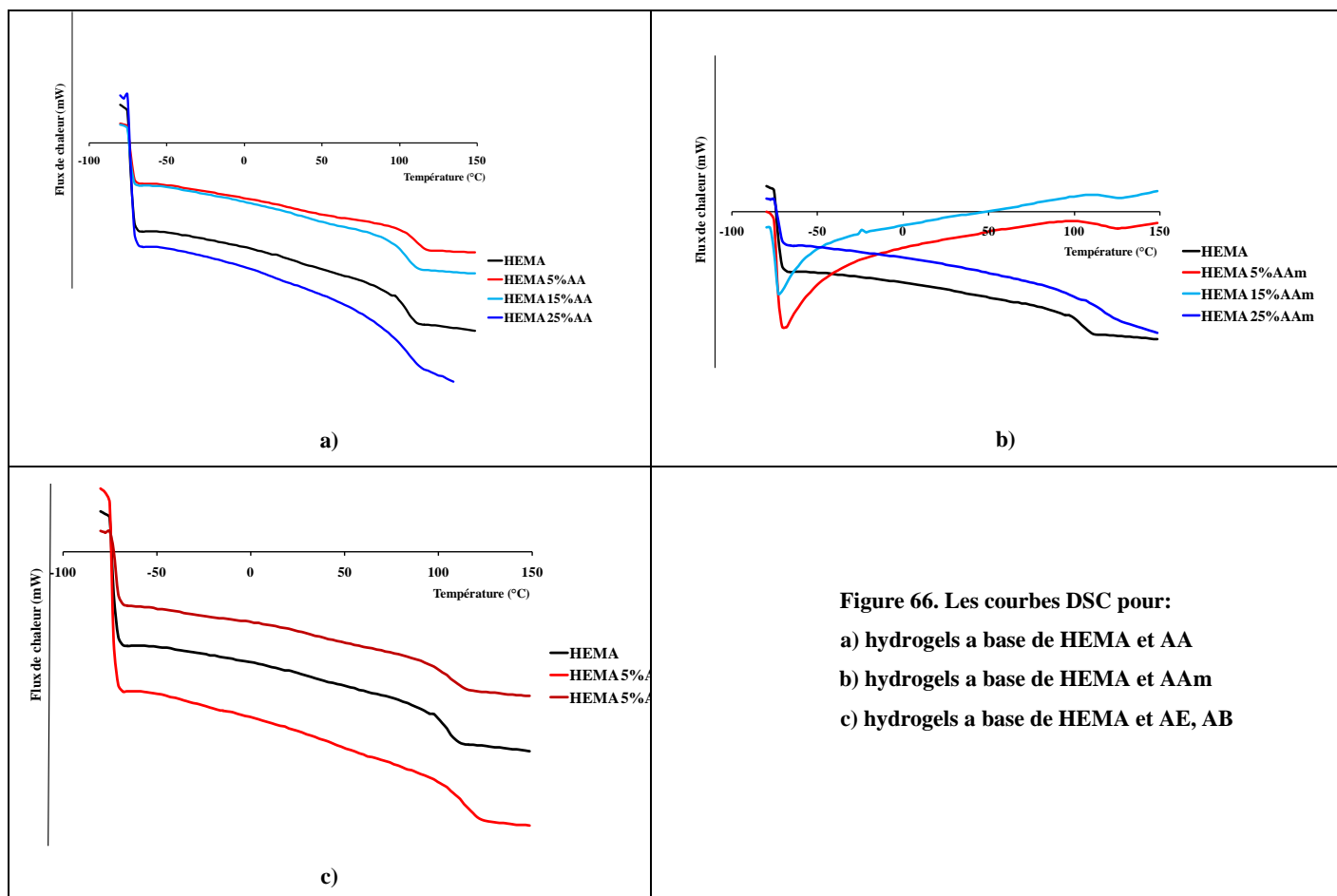
L'énergie d'activation augmente généralement avec l'augmentation de la proportion de copolymère ajouté, suggérant une amélioration de la stabilité thermique des hydrogels synthétisés. L'ordre de réaction faible suggère que la décomposition thermique des hydrogels, est liée à des processus physiques de transport.

### III.2.2.2. Analyse de la calorimétrie différentielle à balayage (DSC)

Les états de la température de transition révèlent les conditions dans lesquelles ont lieu les modifications des changements de la structure physique et chimique du polymère, avec des conséquences sur les propriétés physiques et mécaniques et ses performances [5]. Les mesures de DSC ont déterminées la température de transition vitreuse ( $T_g$ ).  $T_g$  est la température à laquelle la matrice de polymère passe d'un état vitreux à un état élastique de type caoutchouc. Pour obtenir la  $T_g$ , l'échantillon est chauffé, c'est pour ça que les thermogrammes DSC apparaissent comme une étape transitoire et comme un pic (Figure 66). Les hydrogels avec une grande valeur  $T_g$  ont une stabilité thermique en temps et à des températures très élevées (Tableau 8).

---

5. Freeman E.S., Carroll B., *The application of thermoanalytical techniques to reaction kinetics. The thermogravimetric evaluation of the kinetics of the decomposition of calcium oxalate monohydrate*, Journal of Physical Chemistry (1958), 62: 394.



Tableaux 8. Valeurs pour la température de transition

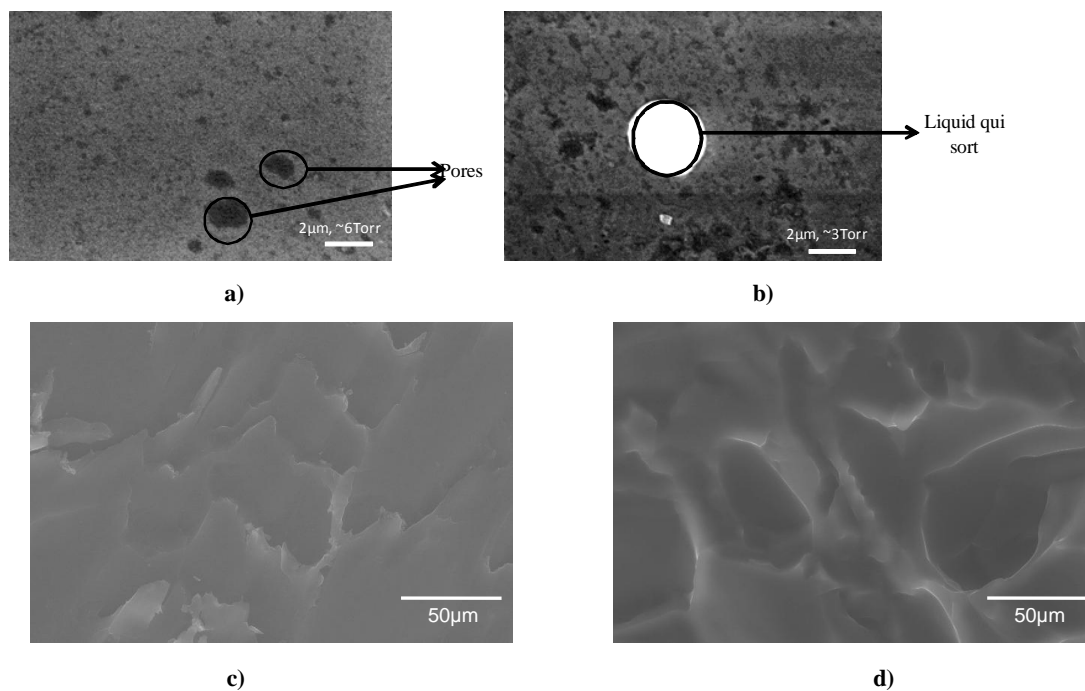
Echantillon	Tg
HEMA	96
HEMA 5% AA	111
HEMA 15% AA	107
HEMA 25% AA	104
HEMA 5% AAm	120
HEMA 15% AAm	121
HEMA 25% AAm	106
HEMA 5% AE	113
HEMA 5% AB	110

La valeur de  $T_g$  augmente avec l'augmentation de comonomère, ce qui confirme que les propriétés thermiques ont été améliorées avec l'introduction de la quantité de monomère hydrophile ou hydrophobe.

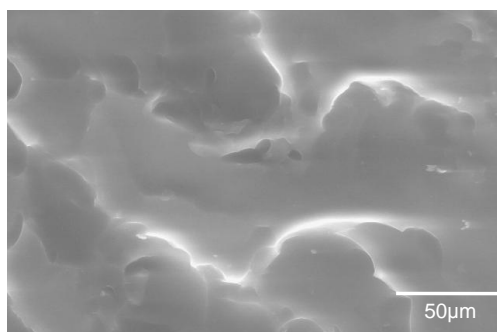
### III.3.1. L'analyse des hydrogels par EMEB

EMEB est une technique avancée de la MEB utilisée pour la caractérisation des hydrogels. Bien que les techniques MEB utilisent le vide pour éviter les interférences atmosphériques avec des électrons secondaires, ESEM peut être fait dans des conditions de vide prolongées (jusqu'à une pression de 10 Torr). L'avantage majeur de cette technique est que les échantillons ne souffrent pas d'autres types de traitements (couchage, séchage), et sous atmosphère contrôlée tiennent la structure stable de hydrogels hydratés. Pour assurer une bonne résolution des micrographies, la résolution variait entre 2-5 Torr à une tension d'accélération de 30kVA. Les hydrogels ont été maintenus à une température de 5° C en utilisant un pan de refroidissement: cette procédure permet un environnement hydraté, ce qui empêche la déshydratation des hydrogels.

Avec l'EMEB a été examiné la surface et la coupe en transversale des hydrogels synthétisés. Une micrographie EMEB typique de la surface et la coupe de l'hydrogel HEMA synthétisés avec AA est présentée dans la figure 67.







e)

**Figure 67. Microgrphs EMEB de surface et coupe en transversale des hydrogels:**

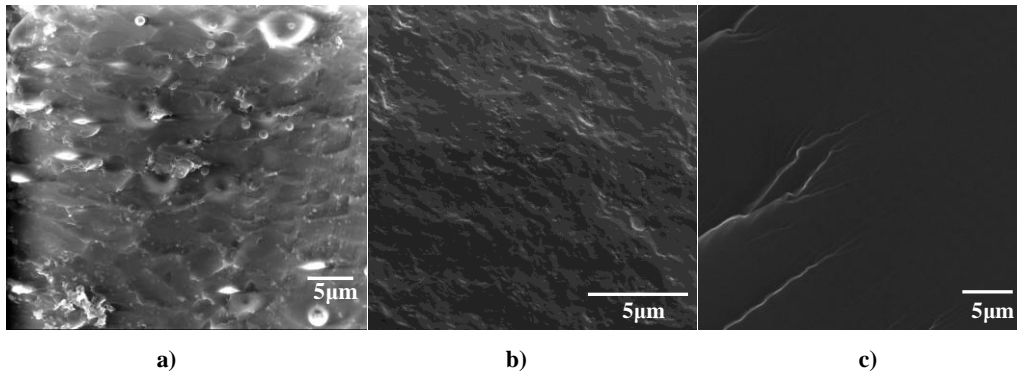
- a) surface hydrogel a ~6Torr
- b) surface hydrogel a ~3Torr
- c) coupe en transversale du hydroge IHEMA
- d) coupe en transversale du hydrogel HEMA 5%AA
- e) coupe en transversale du hydrogel HEMA 25%AA

Les micrographies EMEB en surface on peut observer une structure microporeuse avec un diamètre de pores de  $\sim 2\mu\text{m}$ . Bien que la résolution n'est pas très bonne à une pression de  $\sim 3$  Torr, quand la pression augmente ( $\sim 6$  Torr) on peut voir comment le liquide de ces pores sort, et on peut donc conclure que nous avons une structure microporeuse. Cela est dû au moule dans lequel la polymérisation a été réalisée, et qui nous va faciliter l'interprétation des essais mécaniques (section V.2).

Les micrographies ESEM en coupe transversale montre que par la copolymérisation on a obtenue une structure poreuse mieux représenté que dans les hydrogel HEMA. La présence de comonomère conduit à la formation d'une structure plus lâche avec pores sphériques, sans zones compactification. La distribution des pores est relativement homogène, et la taille des pores est d'environ  $50\mu\text{m}$ .

### **III.3.2. L'analyse des hydrogels par MEB**

Avec la micrographie MEB on peu mettre en évidence la morphologie de surface d'hydrogels mais en état sec. La photomicrographie illustrée dans la figure 68 de la surface des hydrogels avec un contenu différent de AA. Nous pouvons voir une structure dans laquelle les pores sont fermés.



**Figure 68. Micrographie MEB de surfaces des hydrogels:**

- a) HEMA
- b) HEMA 5%AA
- c) HEMA 25%AA

Les hydrogels sont sensibles à un bombardement d'électrons, donc, il y a des artefacts dans l'image hydrogel provoquée par le faisceau d'électrons. Mais néanmoins, nous pouvons voir qu'en ajoutant le comonomère AA la structure hydrogels est devenu plus lisse.

### **III.4. Gonflement des solutions ayant des caractéristiques semblables aux liquides biologiques**

La propriété la plus importante des hydrogels est qu'il se gonfle en présence d'eau ou de liquides similaires du corps et ils se rétrécissent en leur absence. Le degré de gonflement est déterminé par la nature de la chaîne polymérique et la densité de réticulation.

La teneur en eau influence les propriétés mécaniques, la diffusion et l'adsorption des hydrogels, en leur donnant la possibilité de simuler les tissus vivants, en particulier l'endothélium des vaisseaux sanguins. Il permettra également d'augmenter la fraction de biomolécules lié à la surface, contrôlant les interactions hydrogel-biopolymères.

Le degré de gonflement des hydrogels est influencée principalement par leur composition chimique. Les hydrogels avec une teneur plus élevée de groupes hydrophiles aura un plus haut degré de gonflement de ces contenant groupes hydrophobe.

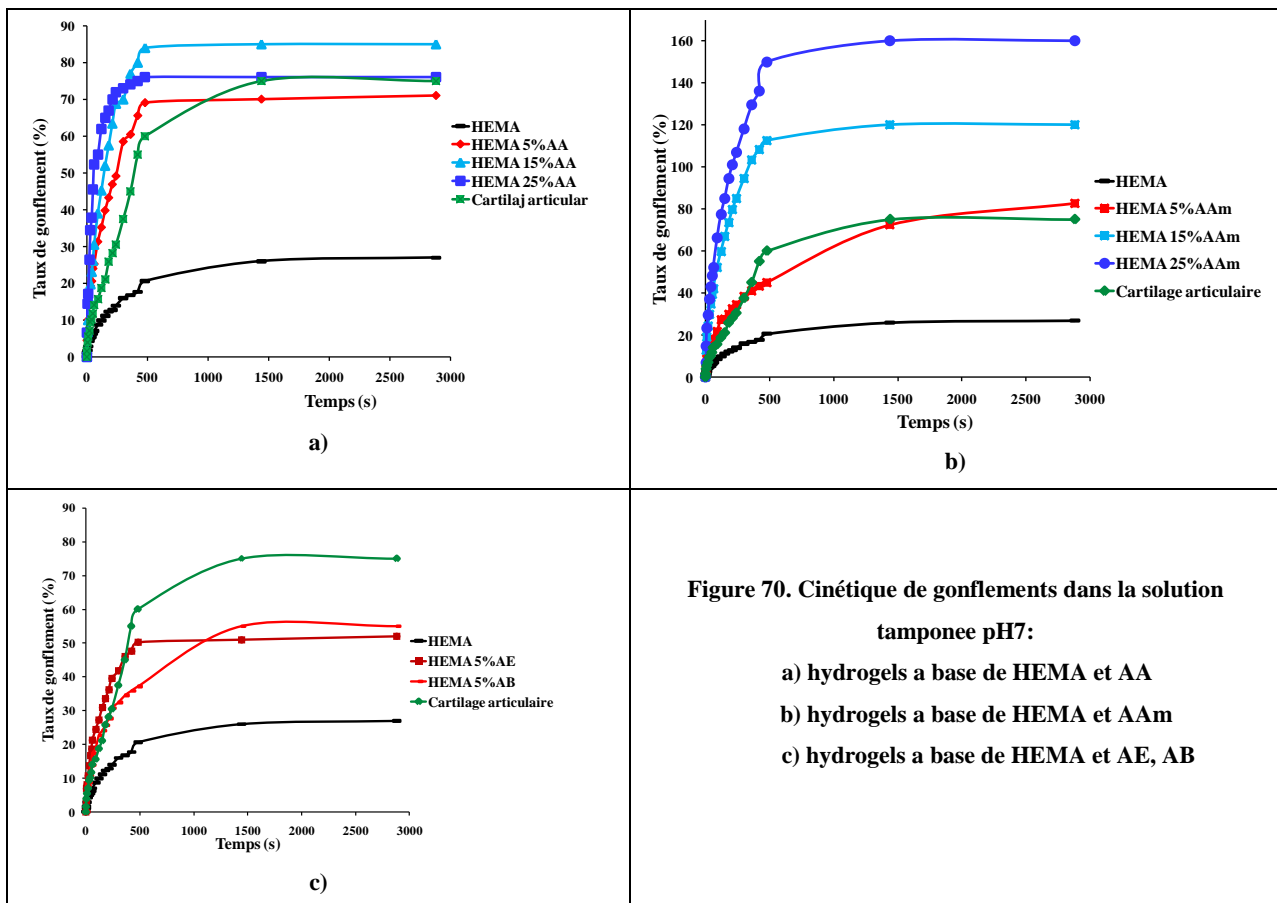
En raison de la présence du groupe carboxyle, les hydrogels à base de p (HEMA) présente une sensibilité accrue aux changements de pH.

Pour caractériser le degré de gonflement des hydrogels, les tests ont été effectués à différentes valeurs de pH 3 et 9. Les solutions tampons de pH différents ont été préparées en mélangeant des quantités différentes de TRIS, d'acide chlorhydrique et de l'eau pure. Le

chlorure de sodium a été ajouté à établir une force ionique de 0,5 M, qui est sous la force ionique physiologique.

Les hydrogels séchés ont été immergés dans des solutions tampons et en bain d'eau thermostaté à 37 °C. Les hydrogels ont été retirés à différents moments, et, avant délicatement retirée l'excès de solution en utilisant un papier filtre, ils ont été et pesés. Le degré de gonflement a été calculé selon la formule présentée dans le chapitre II.

L'hydrogels se gonfle dans des solutions a différents pH; les graphiques sont représenté sur les figures 70-72. Ce comportement est dû à l'absorption de l'eau dans la structure poreuse. La dissociation des liaisons hydrogène, combiné avec les forces de répulsion électrostatique rendre le réseau hydrogel à se gonfler. P(HEMA) est un hydrogel neutre, sans groupement ionisants sur la chaîne, c'est pour ca que le degré de gonflement est très faible, indépendamment du pH.



Dans tous les cas, le degré de gonflement des hydrogels augmente avec augmentation du pH du milieu d'hydratation, due à la répulsion électrostatique entre les groupes ionisé sous forme de carboxyle.

Les différences dans le degré de gonflement peut s'expliquer en raison du pH: dans le milieu acide, le groupes -COOH des copolymères sont non-dissocié et en milieu basique sont dissociés [6]. Dans l'état de dissociation, il y a une répulsion électrostatiques entre les groupes anioniques carboxyle, provoquant l'espacement et le volume occupé est augmentée qui va conduit à un plus grand degré de gonflement.

Dans leurs applications en tant que substitut du cartilage articulaire, le pH physiologique est de 7. Dans ce milieu d'hydratation, il ya un degré croissant de gonflement avec l'augmentation de pourcentage de comonomère.

Pour les monomères hydrophobes AE et AB, en raison de leur hydrophobicité on peut voir une diminution du degré de gonflement.

on peut observer aussi que dans le cas des hydrogels HEMA 5%AA, HEMA 15%AA, et HEMA 5%AAM, on a un comportement similaire avec le cartilage articulaire.

En conclusion, le protocole expérimental utilisé nous a permis de modifier le caractère hydrophile du hydrogels pHEMA afin qu'ils aient un comportement hydrophile similaire à celle du cartilage articulaire.

### III.5. Détermination de l'énergie de surface

La capacité de mouillage/la hydrophilie peut être évalué lorsque une goutte de liquide entre en contact avec une surface solide. Le degré de mouillage est déterminé par les forces de cohésion entre les molécules de liquide utilisée et les forces d'adhérence résultant des interactions moléculaires entre liquide et solide (Figure 73). Le degré de mouillage est mesuré en utilisant la méthode de l'angle de contact.

L'angle de contact diminue, si le taux de mouillage augmente. Ainsi, lorsque l'angle de contact atteint  $180^\circ$ , le degré de mouillage est minimum. Le degré de mouillage peut être expliqué par les forces de cohésion et l'adhérence. Une force d'adhérence grande avec une force de cohésion est inférieure c'est en cas des très petits angles de contact. Du moment où les interactions

---

6. Kurkuri M.D., Aminabhavi T.M., *Poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) sequential interpenetrating network pH-sensitive microspheres for the delivery of diclofenac sodium to the intestine*, Journal of Controlled Release (2004), 96: 9-20.

entre le solide et le liquide sont réduits, et la force de cohésion est augmentée, le taux de mouillage baisse et l'angle du contact augmente.

Le travail de l'adhérence ( $W_a$ ) peut être calculée à partir de la relation Young-Dupré (équation 25):

$$W_a = \gamma (1 + \cos \theta) \quad (25)$$

où:  $\gamma$  est la tension superficielle;

$\theta$  est l'angle de contact.

Le travail mécanique des valeurs d'adhérence obtenue pour différentes compositions des hydrogels sont présentés dans la figure 74.

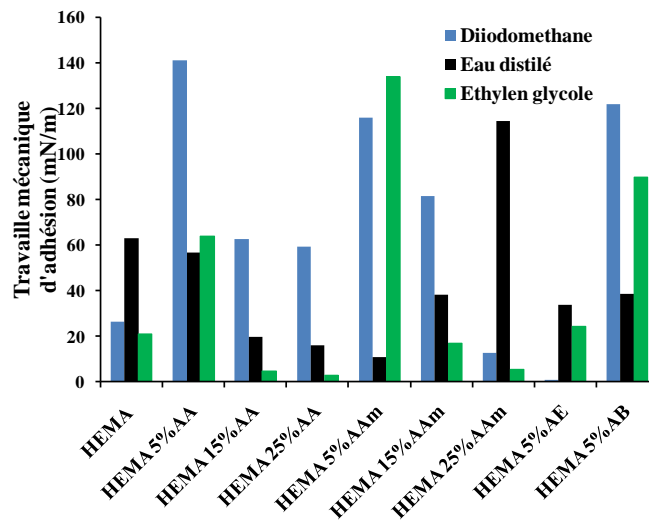


Figure 74. Valeurs de travaille mécanique d'adhésion

Le travail de cohésion est définie comme la force requise pour séparer le fluide en plusieurs parties, et pour la calculé est utiliser la formule de calcul (relation 26):

$$W_c = 2\gamma \quad (26)$$

Les valeurs obtenues pour les hydrogels synthétisés sont répertoriés dans le tableau 9.

Tableaux 9. Valeurs de travaille de cohésion obtenues

Echantillon	Travaille de cohésion (mN/m)
HEMA	70
HEMA 5% AA	144
HEMA 15% AA	86
HEMA 25% AA	78
HEMA 5% AAm	138
HEMA 15% AAm	130

HEMA 25% AAm	46
HEMA 5% AE	34
HEMA 5% AB	132

Ainsi que entre l'angle de contact est le degré de mouillage est un rapport l'inverse proportionnelle (Figure 75).

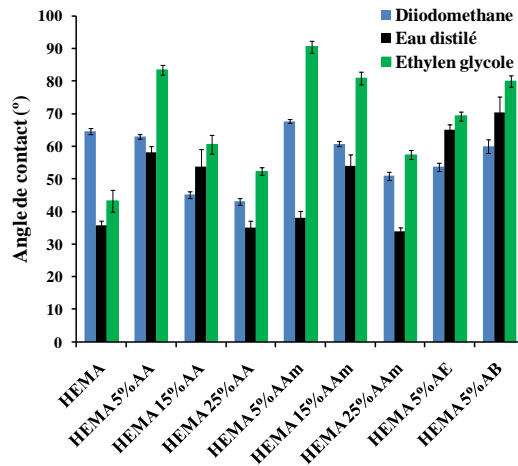


Figure 75. Valeurs d'angle de contact pour différents liquides utilisé

Avec les valeurs d'angles de contact obtenues a été calculée l'énergie de surface pour les hydrogels synthétisée, valeurs présentée dans le tableau 10.

Tableaux 10. Valeurs d'énergie de surface

Echantillon	Énergie de surface (mN/m)
HEMA	35
HEMA 5% AA	72
HEMA 15% AA	43
HEMA 25% AA	39
HEMA 5% AAm	69
HEMA 15% AAm	65
HEMA 25% AAm	23
HEMA 5% AE	17
HEMA 5% AB	66

L'énergie de surface est l'énergie nécessaire pour écraser les liaisons chimiques des hydrogels, qui sont principalement liaison l'hydrogène [7]. Ainsi, l'ajout de comonomère augmente la valeur de l'énergie de surface, si l'énergie ainsi qu'il est nécessaire d'une énergie de plus en plus grande pour écraser les liaisons d'hydrogel.

La mesure d'angle du contact nous donne des relations en ce qui concerne la texture de surface, s'il est homogène ou non-homogène. Une surface homogène lorsque le liquide remplit toutes les rugosité de surface, on obtiens une grande hystérésis[8]. Les valeurs des hystérésis obtenues pour les hydrogels testés sont présentées dans la figure 76.

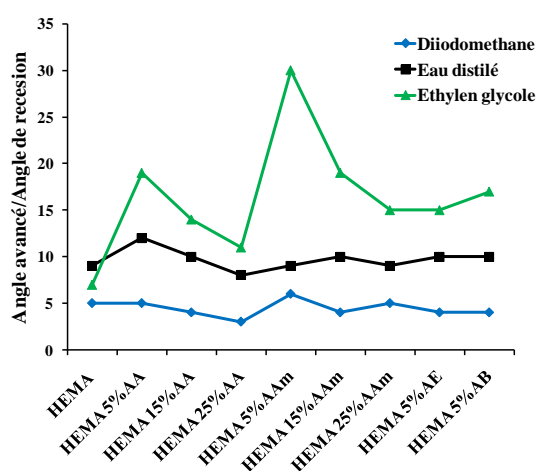


Figure 76. Valeurs d'hystérésis obtenue par mesure d'angle du contact dynamique

On peut observer une diminution des valeurs d'hystérésis avec l'ajout de comonomère, par conséquent, l'accroître de l'homogénéité de la surface d'hydrogels synthétisés en ce sens.

7. Schrader M.E., Loeb G.I., *Modern Approaches to Wettability. Theory and Applications*, New York: Plenum Press. (1992), ISBN 0306439859.

8. Marmur A., *Wetting of Hydrophobic Rough Surfaces: To be heterogeneous or not to be*, Langmuir (2003), 19: 8343–8348.

## ÉVALUATION BIOMÉCANIQUE DES HYDROGELS

## IV.1.1. Paramètres expérimentaux

**ECHANTILLONS:** les hydrogels plan cylindriques d'un diamètre de 50mm et une épaisseur de 2mm ~mesure hydraté dans solution du milieu d'hydratation. Pour tester le cartilage articulaire, on a utilisée du cartilage de poulet avec une épaisseur de 2 mm et un diamètre de 3 mm dans la partie convexe.

Dans les expériences de compression on peut voir deux cas [9]:

- l'hydrogel a un frottement considérable a la paroi, qui ne peut pas être négligeable. Dans ce cas, pour évaluer la réponse mécanique du volume d'hydrogel, on doit essayez d'augmenter la friction et d'immobilisée l'hydrogel a la paroi (figure 77a).
- la friction d'hydrogel est négligeable ( $\sim 0$ ). Dans ce cas, la réponse mécanique de l'hydrogel a deux composantes: une partie coulissante et une de compression. Les problèmes qui se posent dans ce cas, des distorsions importantes sont favorisées par environ un glissement maximum, ce qui peut causer des fissures dans la zone externe de l'hydrogel (figure 77b).

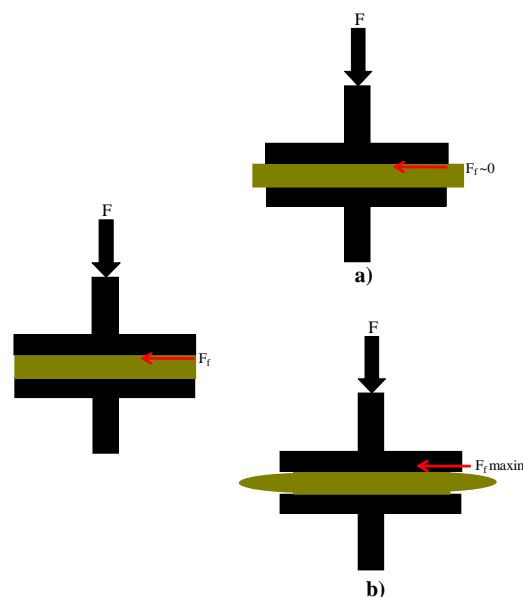


Figure 77. Condition limites à la paroi de plateaux de rhéomètre:

a) glissement maximum

b) adhérence maximum

9. Margaron Y, **Bostan L.**, Exposito J.-Y., Malbouyres M., Trunfio-Sfarghiu A.-M., Berthier Y., Lethias C., *Tenascin-X increases the stiffness of collagen gels without affecting fibrillogenesis*, Biophysical Chemistry (2010), 147: 87–91.



Pour éviter ces problèmes qui résultent de la compression d'un hydrogel, on a choisi d'utiliser du papier abrasif (grain de  $\sim 180\mu\text{m}$ ) collé sur les deux paroi de rhéomètre, réalisant ainsi une adhérence maximale à la paroi. Pour éviter les fissures de l'hydrogel, les compressions ont été effectuées par 20% en une seule étape ou quatre compressions de 5%. Chaque compression a été suivie par une période de relaxation de 600 s, le temps requis pour une détente complète de l'hydrogel.

**L'HYDRATATION ET LA PRE-CHARGE:** Pour avoir les mêmes conditions physiologiques ainsi que le cartilage articulaire, tous les essais de compression ont été effectués en milieu hydraté, en utilisant la solution tamponnée pH 7. Bien que les plats ne sont pas adaptés pour effectuer des tests environnementaux hydrate, un tourne-disque a été improvisée pour permettre de tester l'environnement en milieu hydraté, en collant un «manchon» en plastique (figure 78a).

Pour la rugosité de surface soit uniforme pour chaque essai de compression, une pré-charge de 0,02 N a été exercée sur chaque hydrogel avant les mesures(ce qui correspond à  $h_i$ , de épaisseur initiale  $h_0$  (figure 78b)).

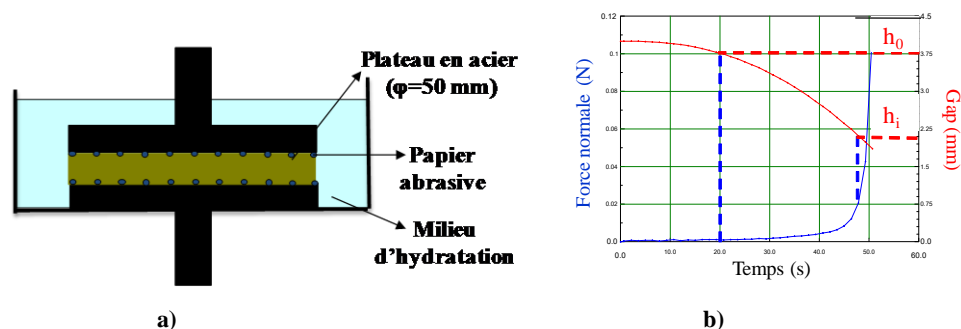


Figure 78. a) Dispositif final pour le test en compression

b) La pré-charge

**CALCUL DE LA SURFACE DE CONTACT (S):** La zone de contact a été considéré comme constant hydrogels, car l'hydrogels ont a eu un diamètre égal à celui des plateaux de rhéomètre, en utilisant du papier abrasif et adhérent fortement. Mais, en cas de la mesure du surface du cartilage articulaire de contact a été réalisée par compression de la surface du cartilage avec une lame de verre (qui prévoit de pré-chargement de 0,02 N) et en utilisant un microscope optique pourrait calculer la surface de contact.

**LE PROTOCOLE DE COMPRESSION /RELAXATION:** Après le pré-charge, a été appliquées dans une déformation seule étape ( $\sim 20\%$ ), ou 4 étapes, 5% chaque compression. La compression a été suivie d'une période de relaxation à l'équilibre (600 s). La vitesse de compression a été choisie constante de 0,02 mm/s, cette vitesse est choisie en

fonction de données bibliographiques afin d'affecter des valeurs dans les exigences physiologiques des cartilages articulaires [10]. Ce protocole a été choisi afin de déterminer les caractéristiques élastiques des hydrogels synthétisé par rapport à celle du cartilage articulaire.

#### IV.1.2. Résultats et discussion

Les tests rhéologiques ont été effectuées sur hydrogels synthétisés et le cartilage articulaire de poulets. Le graphique du force normale en fonction du temps nous permet de comparer les essais de compression effectués dans une seule étape de 20% ou 4 tranches de 5% chacun (Figure 79).

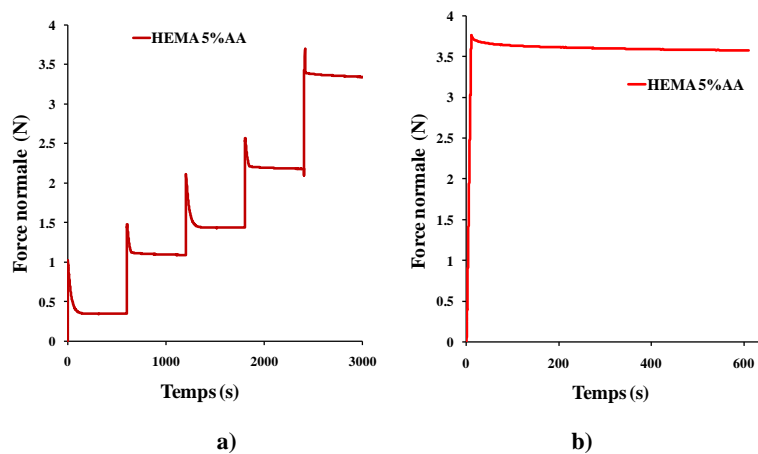


Figure 79. Courbes de compression de 20% de l'épaisseur d'hydrogel:

- a) compression en 5 pas de 4% chaque'un;
- b) compression dans un seul pas de 20%.

De la figure 79 nous pouvons voir que la même réponse à la compression, c'est qu'il est cinq étapes ou une étape. Ce résultat confirme que nous avons une reproductibilité des résultats sur les propriétés du matériau, ce qui entraîne la même réponse, quelle que soit la méthode d'application.

Pour quantifier le comportement de la compression d'hydrogels par rapport à celle du cartilage articulaire a été calculé le module d'élasticité apparente,  $E^*$ . Selon la loi de Hooke,  $E^*$  est calculée à partir de la pente de la partie droite de la courbe pression ( $\sigma = F / S$ ) en fonction de la déformation ( $\varepsilon$ ). Si les compressions en cinq étapes, a été pris en compte les

---

10. Hayes W.C., Keer L.M., Herrmann G., Mockros L.F., *A mathematical analysis for indentation tests of articular cartilage*, *Journal of Biomechanics* (1972), 5(5): 541-551.

cinq pics de compression maximale, tandis que pour la compression dans une seule étape a été tenu compte de toutes les valeurs liées à la courbe de pression de compression (Figure 80).

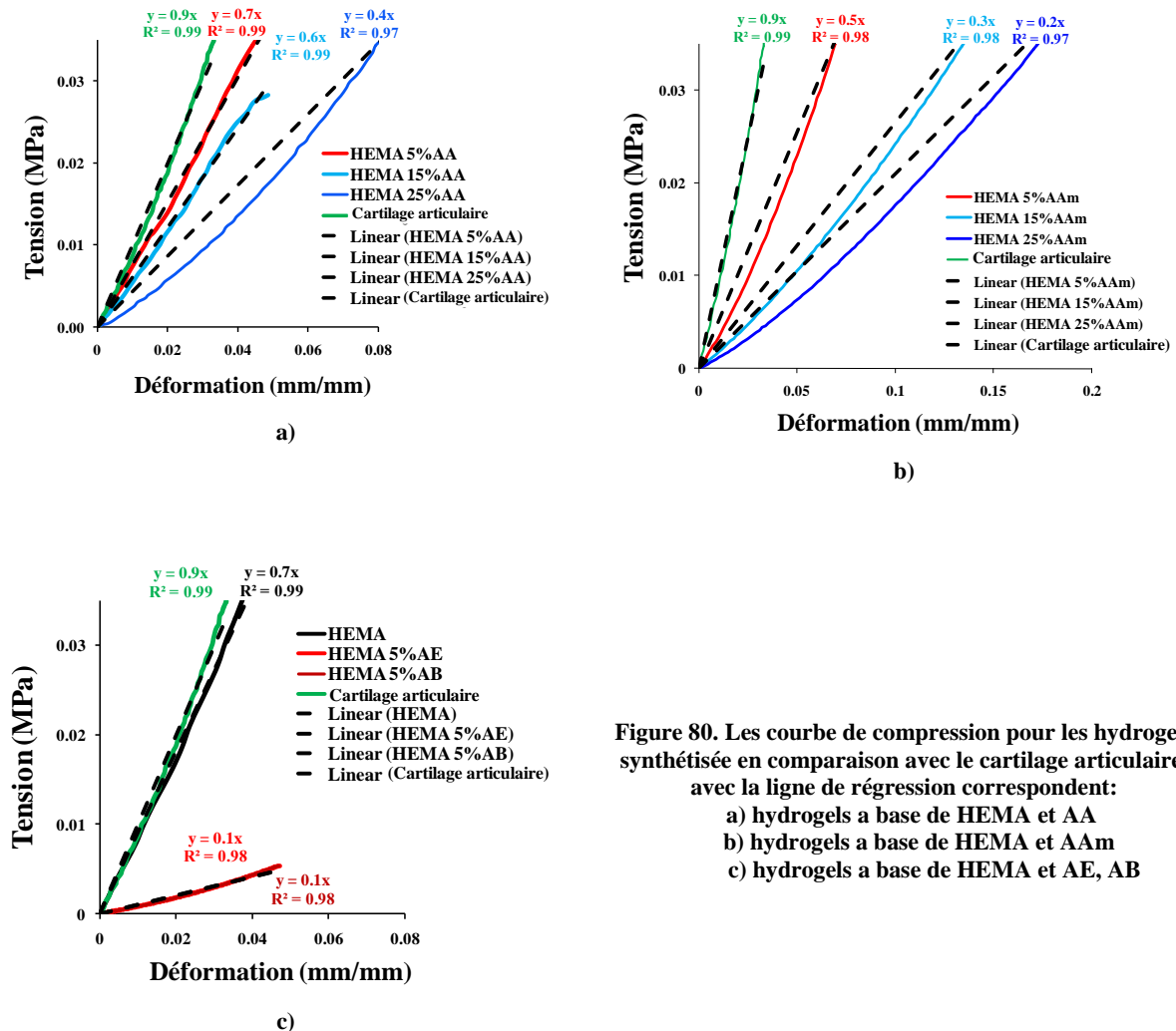


Figure 80. Les courbe de compression pour les hydrogels synthétisée en comparaison avec le cartilage artulaire, avec la ligne de régression correspondent:  
a) hydrogels a base de HEMA et AA  
b) hydrogels a base de HEMA et AAm  
c) hydrogels a base de HEMA et AE, AB

On peut remarquer que chaque réponse d'hydrogel en compression est différente selon le comonomère utilisé. L'amplitude de pic de compression, donc, la réponse immédiate à la compression, des hydrogels avec HEMA, HEMA 5%AA est similaire à celle du cartilage artulaire. Avec l'augmentation du pourcentage du comonomère, la flexibilité des chaînes de polymère augmente, ainsi que l'élasticité des hydrogels va augmenter avec le pourcentage de comonomère ajouté. Ainsi, le module d'élasticité apparent va diminuer avec l'ajout de comonomère.

Les résultats sont présentés dans le tableau 11.

**Tableaux 11. Les valeurs pour le module élastique apparent obtenue:**

Echantillon	E* (MPa)
<b>HEMA</b>	<b>0,7±0,02</b>
<b>HEMA 5%AA</b>	<b>0,7±0,03</b>
<b>HEMA 15%AA</b>	<b>0,6±0,01</b>
<b>HEMA 25%AA</b>	<b>0,4±0,03</b>
HEMA 5% AAm	0,5±0,02
HEMA 15% AAm	0,3±0,01
HEMA 25% AAm	0,2±0,03
HEMA 5% AE	0,1±0,01
HEMA 5% AB	0,1±0,04
<b>Cartilage articulaire</b>	<b>0,9±0,05</b>

On peut observer que pour les hydrogels synthétisés avec le comonomère AA ont un comportement similaire à celui du cartilage articulaire.

## **IV.2. LA DETERMINATION DU CARACTERISTIQUES DE VISCOELASTICITEE**

**PROTOCOLE EXPERIMENTAUX:** Les essais pour évaluer les propriétés de viscoélasticité ont été réalisée sur le même rhéomètre dans la même configuration que les test de compression (Figure 78a). Elle a été imposée une déformation de 15% de l'épaisseur de l'hydrogel et une fréquence de 0-15 Hz.

### **IV.2.2. Résultats et discussion**

Les tests rhéologiques ont permis de analyser dans des conditions dynamique et d'oscillation, mesurent en même temps le module élastique et visqueux des matériaux polymères. Les deux modules ont augmenté avec la fréquence appliquée,  $G'$  étant supérieur à  $G''$ , indiquant que les hydrogels testé ont un comportement solide élastique dans les fréquences étudiées. Cependant, à valeurs de la fréquence petits, on peut voir quelques petits

changements dans  $G'$ , qui peut être attribuée à la composante visqueuse des hydrogels (Figure 82).

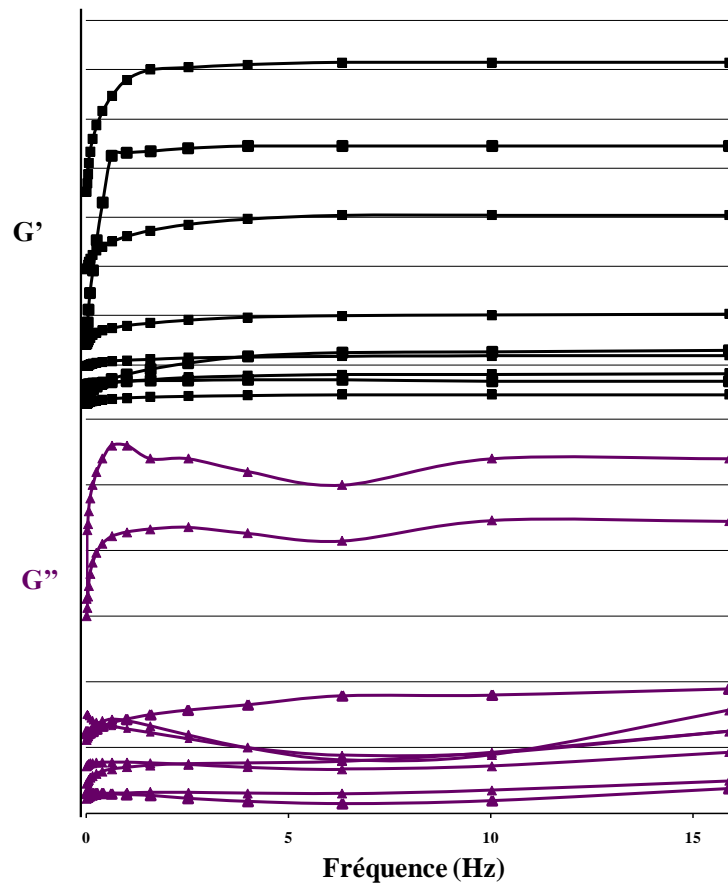
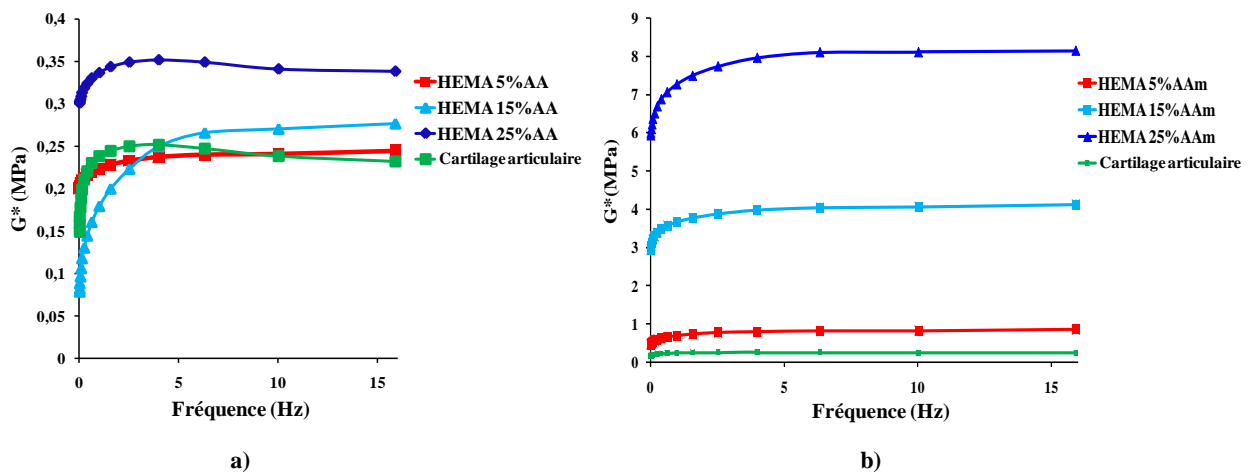
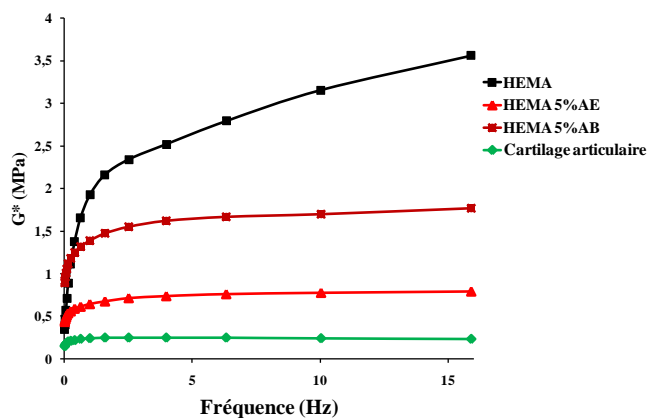


Figure 82. Représentation du  $G'$  et  $G''$  pour les hydrogels obtenues

Le calcul du module de cisailment dynamique,  $G^*$  (Figure 83) on a permis les représentations de son évolutions par rapport a les fréquences appliquée.





c)

Figure 83. Le module de cisaillement obtenu pour les hydrogels synthétisés par rapport au cartilage artulaire:

- a) hydrogels a base de HEMA et AA
- b) hydrogels a base de HEMA et AAm
- c) hydrogels a base de HEMA et AE, AB

Les valeurs de  $\tan(\delta) < 1$  indiquent la présence d'un réseau interne stable des forces, la mesure de sa stabilité mécanique (Figure 84). La forte augmentation de la valeur de  $\tan(\delta)$  montre que les hydrogels ont une structure constituée d'un réseau permanent réticulé.

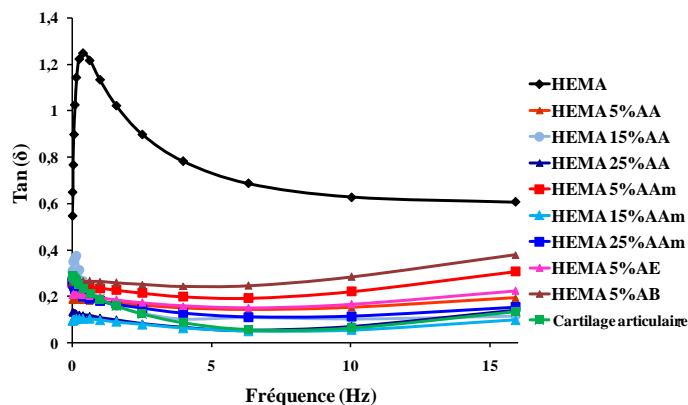


Figure 84. Valeurs de  $\tan(\delta)$  obtenues

En outre, les valeurs obtenues pour les hydrogels synthétisés avec des comonomères, tombe dans la gamme du cartilage artulaire normal, qui pour le  $\tan(\delta)$  a des valeurs comprises entre 0,15 et 0,36.

En conclusion, la copolymérisation a améliorées les propriétés de hydrogel HEMA , avec des résultats comparables à ceux obtenus à partir de cartilage artulaire.

### IV.3. L'ANALYSE CRITIQUE ET LA SÉLECTION DES MATÉRIAUX AVEC DES POTENTIALLES APPLICATIONS DANS L'INGÉNIERIE DE CARTILAGE ARTICULAIRE

Le tableau 12 résume les principales propriétés obtenues pour des hydrogels et de synthèse de cartilage articulaire.

Echantillon	Grad de umflare (%)	G* (MPa, la 3Hz )	E* (MPa)
HEMA	26 ±1	2,3±0,5	<b>0,7±0,02</b>
HEMA 5% AA	<b>71 ±1</b>	<b>0,23 ±0,1</b>	<b>0,7±0,03</b>
HEMA 15% AA	<b>76±1</b>	<b>0,22±0,4</b>	<b>0,6±0,01</b>
HEMA 25% AA	<b>85 ±1</b>	<b>0,24 ±0.1</b>	<b>0,4±0,03</b>
HEMA 5% AAm	<b>82±1</b>	0,76±0,2	0,5±0,02
HEMA 15% AAm	120±1	7,7±0,3	0,3±0,01
HEMA 25% AAm	160±1	3,87±0,1	0,2±0,03
HEMA 5% AE	52±1	0,71±0,4	0,1±0,01
HEMA 5% AB	55±1	1,61±0,5	0,1±0,04
Cartilage articulaire	<b>75 ±1</b>	<b>0,25 ±0.2</b>	<b>0,9±0,05</b>

Les valeurs proches de celles du cartilage articulaire sont indiquées en gras dans le tableau 12. On peut donc constater que les hydrogels synthétisés avec les comonomères nous a permis de contrôler les propriétés des hydrogels à base de HEMA. Cependant, l'addition de comonomère AA a déterminé l'obtention des hydrogels qui se rapproche le plus le comportement du cartilage articulaire. Par conséquent, d'autres tests suivants seront pris en compte seulement trois échantillons : HEMA 5% AA car il présente une réponse similaire à la compression du cartilage articulaire, HEMA 25% AA car il présente une réponse mécanique en cisaillement similaire à cartilage articulaire et l'étalon représentée par l'hydrogel HEMA et le cartilage articulaire, pour pouvoir comparer les valeurs obtenues. La

valeurs obtenue pour le cartilage articulaire est reproductible avec des données bibliographiques [11].

## IV.4. Analyse des hydrogels nanomécanique p (HEMA-co-AA)

### IV.4.1. Tests de nanoindentation

**PRINCIPE:** pour mesurer les propriétés nanomécaniques du cartilage de poulet et hydrogels synthétisés a été utilisée l'évaluation par le microscope à force atomique. Pour cette application, l'échantillon entre en contact avec la pointe nanométrique du l'AFM d'une manière contrôlée, en déplaçant le tube piézoélectrique ( $z$  (nm)). Après contact, il ya un déflexion du levier. Ce déflexion est mesuré par la réflexion du faisceau laser, qui est proportionnelle à la force ( $F_n$  (N)) pris en charge par cantilever (figure 87). Pour interpréter les résultats des courbes de force  $F$  ont été tracées en fonction du mouvement dans la direction  $z$ .

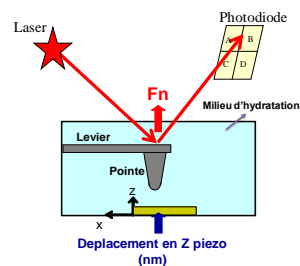


Figure 87. Représentation schématisée du AFM

### PARAMETRES:

**MODÈLE THÉORIQUE DE CONTACT HERTZ:** Le contact de Hertz se réfère à des forces quand deux surfaces sphériques sont en contact, et se déforme sous les forces appliquées. Dans ce cas, la pointe nanométrique et la surfaces de l'échantillon sont considérés à l'échelle nanométrique comme sphérique. La théorie de Hertz nous permet de mettre dans l'équation ( $F = 4 / 3 \sqrt{RE} (dz)^{1,5}$ ) la force dans la zone de contact en fonction de la force normale appliquée ( $F$  (pN)), le rayon de la pointe nanométrique ( $R$ ) et module apparent ( $E^*$  (MPa)).

11. Mow V.C., Ratcliffe A., *Structure and function of articular cartilage and meniscus*, In: Basic orthopaedic biomechanics, 2nd ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven (1997), p. 113–177.



#### IV.4.1.1 Mise en place des paramètres expérimentaux

##### PROTOCOLE

##### EXPERIMENTAL

**ECHANTILLONS:** Les hydrogels synthétisés et le cartilage de poulet frais, prise le même jour ont été fixés (collés avec une petite quantité de colle cyanoacrylate) en supports de Teflon (Figure 88).

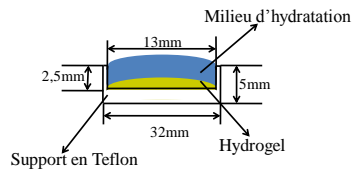


Figure 88. Schéma du support en Teflon utilisé pour la nanoindentation

L'utilisation de ce moule nous a permis la formation d'un ménisque, permettant la réalisation des tests en milieu hydraté, maintenues pendant les expériences.

Pour l'analyse ont été utilisés deux types de pointe (Figure 89):

- pointe de nitrure de silicium ( $\text{Si}_3\text{Ni}_4$ ) rayon de 10 nm et constante élastique de 1 N/m (Veeco, DNP-S10) (figure 89a);
- pointe sphérique de rayon  $20\mu\text{m}$  en borosilicate avec une constante élastique de 2,8 N/m (NanoandMore, CP-FM-BSG) (Fig. 89b).

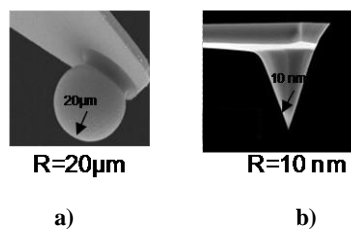


Figure 89. Micrographies de sondes AFM utilisées:  
a) avec pointe sphérique  
b) avec pointe aiguë

Des essais ont été réalisés à une vitesse moyenne de 500 nm / s.

#### IV.4.1.2. Résultats et discussion

Pour la mesure de la déflexion du levier qui soutient la pointe nanométrique, quand l'échantillon s'approche, nous avons les situations suivantes (Figure 90):

- Quand la pointe est en contact avec la surface de la déflexion du cantilever est nul, donc la force sur la sonde est de zéro ;
- Quand la pointe est en contact avec une surface rigide (dans notre cas est la référence), la zone de contact reste constante, car la surface n'est pas déformée, seront mesurés la comportement élastique du cantilever, alors on obtient une ligne droite de pente proportionnelle constante du ressort du levier:  $k_c$ ;
- Quand la pointe est en contact avec une surface élastique (pour les hydrogels et de cartilage articulaire) la déviation du cantilever sera composée de la déflexion du cantilever +échantillon:  $k_c + k_s$ . Comment le contact est considéré à l'échelle nanométrique l'aire de contact varie avec la force normale, et nous obtenons une courbe parabolique.

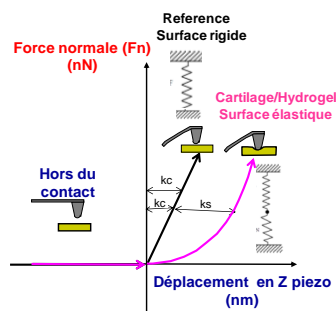


Figure 90. Interprétation des courbes obtenues par indentation

Pour interpréter ces mesures on va tracer une courbe régression type puissance (Figure 91).

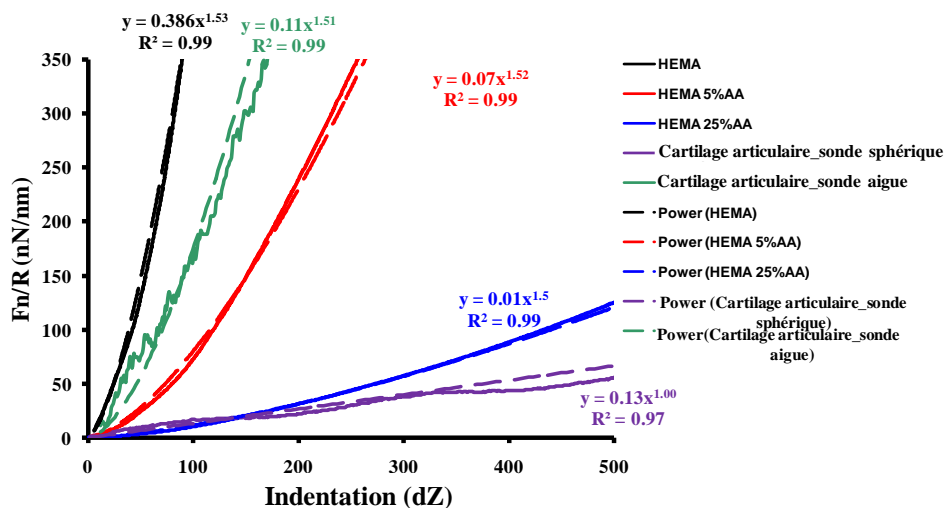
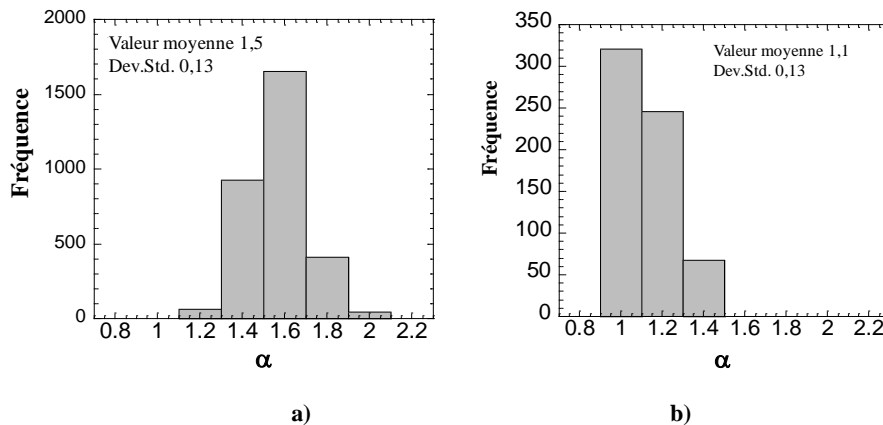


Figure 91. Représentation des courbes  $F_n/R$  en fonction de indentation et la courbe type puissance respective

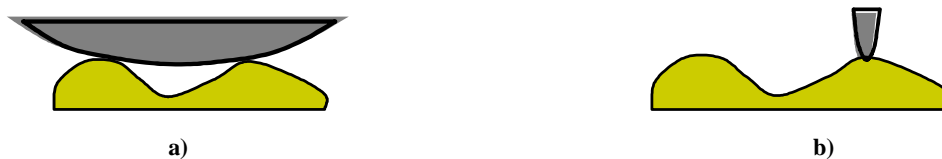
Dans la figure 90 les courbes peuvent être observés pour les hydrogels synthétisé et du cartilage articulaire obtenues dans les essais avec une pointe sphérique. Les résultats (mesure statistique ~ 1000 points) montre que si les hydrogels sont testé avec une pointe sphérique et le cartilage est testée avec une pointe aigüe, une analyse de régression en utilisant une courbe type puissance on obtiens une valeur du coefficient  $\alpha$  de 1,5 (Figure 92A) . Toutefois, lorsque le cartilage articulaire est testé avec la sonde sphérique on obtient un coefficient d'une valeur de 1 (figure 92b).



**Figure 92. Histogrammes obtenues pour:**

- a) hydrogels testée avec sonde sphérique et cartilage articulaire teste avec sonde aigüe
- b) cartilage articulaire teste avec sonde sphérique

L'explication de ce phénomène peut être mis sur la rugosité du cartilage articulaire. Le cartilage articulaire a une rugosité de ~1000nm . Le même ordre de grandeur du pointe, et est possible d'avoir plusieurs contacts (Figure 93), qui se traduira par un coefficient d'une valeur de 1.



**Figure 93. Schéma simplifiée du cartilage articulaire testé avec:**

- a) sonde sphérique
- b) sonde aigüe

Par conséquent, pour avoir des résultats pertinents a échelle nanométrique, les paramètres d'essai doit être contrôlée afin d'éviter les malentendus. Par exemple, les courbes obtenues quand on a utilisee la pointe sphérique avec un rayon de 20 $\mu$ m, on obtient un coefficient de régression de 1,5, car la rugosité est faible (pour des hydrogels), mais quand la rugosité est du même ordre de grandeur avec le rayon de pointe (pour le cartilage), les résultats ne suivent pas la même loi, plutôt avoir une loi linéaire, qui peut être dû à plusieurs contacts à partir des zones de contact. Pour résoudre ce problème, on a utilisee une pointe

avec un rayon inférieur à la rugosité du articulaire cartilage [12].

Donc, pour être en mesure de lire les données de la théorie de Hertz, il faut choisir la sonde propice a partir de la rugosité des échantillons.

Une autre condition d'application de la théorie d'Hertz est, qu'on ne doit pas avoir des forces d'adhérence. On peut voir dans l'histogramme de la figure 94, seulement 40% des courbes obtenues ont une adhérence de 0,7 nN, tandis que plus de la moitié d'entre eux étaient sans adhérence.

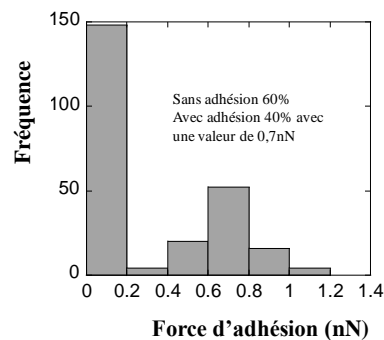


Figure 94. La histogramme obtenue pour les forces d'adhésion

Toutes ces résultats nous a permis d'appliquer la théorie du contact de Hertz, avec laquelle on va calculer le module élastique apparent a l'échelle nano (Figure 95).

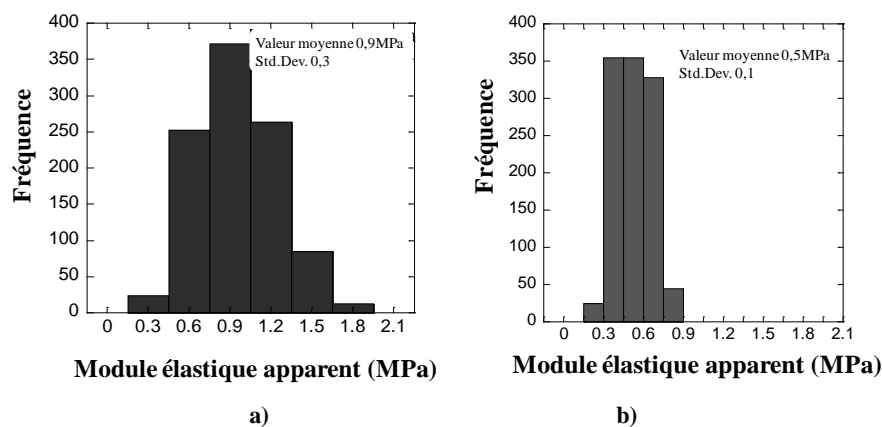


Figure 95. Histogramme obtenue pour le module élastique apparent:

- a) cartilage articulaire
- b) hydrogel HEMA 5%AA

Les valeurs obtenue sont présentée dans le tableau 11.

12. **Bostan L.**, Sfarghiu-Trunfio A-M., Vereștiuc L., Popa M.I., Munteanu F., Berthier Y., *Macro and nano-tribological characterisation of a new HEMA hydrogel for articular cartilage replacement*, Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering 92(10), 13(1): 33-35, ISSN: 1025-5842.

**Tableaux 14. Valeurs du module élastique apparent obtenues à échelle nano**

Echantillon	E* (MPa)
HEMA	0,9±0,08
HEMA 5%AA	0,5±0,1
HEMA 25%AA	0,2±0,07
Cartilage articulaire	0,9±0,1

Le module d'élasticité apparent obtenue à l'échelle nano sont comparables à ceux obtenus dans l'échelle macro, mais avec quelques différences. Ces différences augmentent avec l'inhomogénéité d'hydrogels, comme le montrent les tests pour déterminer l'angle de contact dynamique.

## CHAPITRE V

### ANALYSE TRIBOLOGIQUE DES HYDROGELS

#### V.1. Des études de frottement à échelle macro

Les paramètres utilisés pour les essais tribologiques ont été établis en utilisant le même rhéomètre ARES, que pour les tests de compression et en cisaillement. Habituellement, les essais tribologiques ont été faits avec un tribomètre mais le rhéomètre nous permet en plus de contrôler certains paramètres comme la vitesse de déformation. En outre, la géométrie des hydrogels n'a pas d'importance, et la sensibilité dans la mesure pour les faibles coefficients de frottement est supérieure à un tribomètre [13]. Pour les tests on a imposé une déformation (15% de l'épaisseur des hydrogels) et le couple de frottement a été mesuré, celui-ci se compose de la force normale et tangentielle, qui nous a permis de tracer le coefficient de frottement (COF) avec le temps. Pour éviter la superposition des lignes de frottement des trois hydrogels un mouvement alternatif approprié a été fait un tiers de la circonférence des plateaux (Figure 97). Les essais ont été faits dans un milieu hydraté, pH 7 solution à imiter l'environnement physiologique *in vivo*.

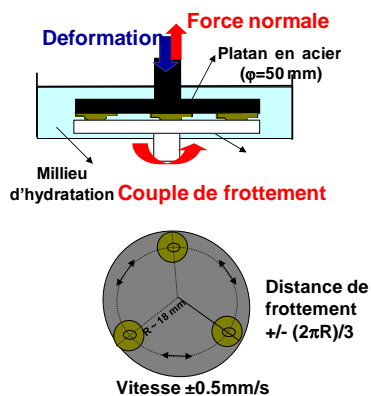


Figure 97. Représentation schématique du dispositif pour le test de frottement

#### V.1.2. Résultats et discussion

Pour calculer le coefficient de frottement a été tracé sa valeur en fonction du temps (Figure 98). Les valeurs du coefficient du frottement COF est en moyenne des valeurs aller retour.

13. Gong J.P, Osada Y., *Surface friction of polymer gels*, Polymeric Science (2002), 27: 3-38.

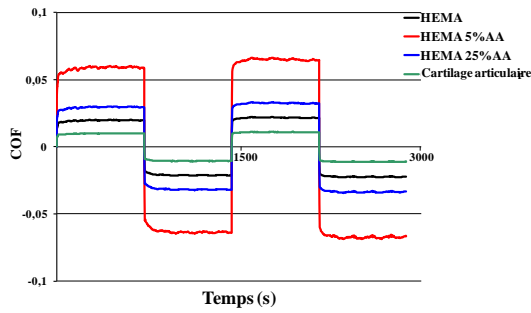


Figure 98. Le graphique du COF en fonction du temps

Les valeurs obtenues ont été de l'ordre de  $10^{-2}$ , et ces valeurs ont été constantes pour une période de 30 minutes sans dégradation (Tableau 15).

Tableaux 15. Valeur de COF obtenue

Echantillon	COF
HEMA	$0.02 \pm 0.002$
HEMA 5% AA	$0.05 \pm 0.004$
HEMA 25% AA	$0.03 \pm 0.003$
Cartilage articulaire	$0.01 \pm 0.005$

## V.2. Tests nanotribologique

Le PRINCIPE de la méthode utilisée c'est que, en plus des forces normales, le cantilever est sensible et les forces de friction ( $F_f$ ), qui crée un couple de torsion, et donc une variation du signal sur la direction horizontale de la photodiode. Les tests de frottement ont été réalisés dans le mode de la modulation latérale. Cette technique est basée sur le fait que la pointe est en contact avec l'échantillon et on impose une force normale constante, et un déplacement de l'échantillon sur l'axe X, et il est mesuré la réponse en torsion, c'est-à-dire, la force latérale créée (Figure 102).

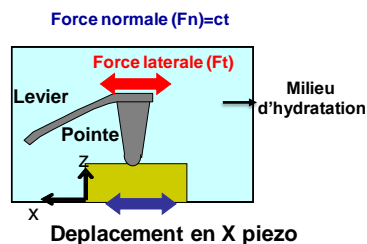


Figure 102. Représentation schématique du dispositif pour les tests de frottement

## V.2.2. Résultats et discussion

À l'échelle nanométrique les valeurs de coefficient du frottement en fonction du temps sont présentés dans la figure 103. Pour le cartilage articulaire, en raison de sa rugosité du même ordre que celle de la sonde AFM, les valeurs obtenues ce n'est pas réaliste.

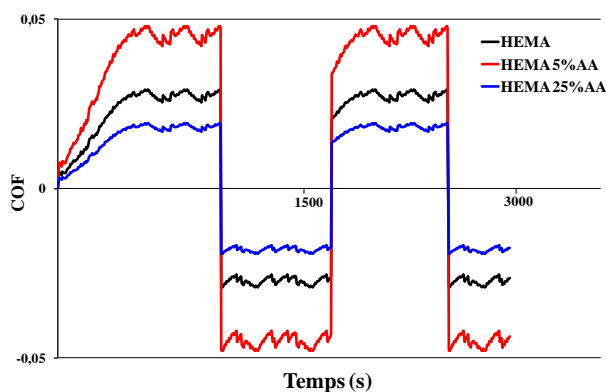


Figure 103. Graphique du COF obtenues en fonction du temps

Dans le tableau 16 sont présentées les valeurs obtenues.

Tableaux 16. Valeurs de COF obtenues

Echantillon	COF
HEMA	0.03±0.005
HEMA 5% AA	0.05±0.007
HEMA 25% AA	0.02±0.003
Cartilage articulaire	-

## V.3. Les études topographiques

La méthode de mesure la topographie par AFM est de balayer avec la pointe la surface. Les images sont générées par un signal issu du photodétecteur, qui est associé avec le débattement du levier à partir de son interaction avec la surface. La force entre la pointe et la surface, est la valeur de référence pour la déflexion du cantilever.

### V.3.1. Paramètres expérimentaux

Le protocole expérimental: a été optée pour un sonde AFM avec un constante élastique de 0,2 N / m (VEECO, DNP-S-10) et les images ont été prise en mode contact, en



milieu hydraté dans un tampon pH 7. La rugosité pic-à-pic a été mesurée, qui est la moyenne entre le pic maximum et du pic minimum de la rugosité de surface.

### V.3.2. Résultats et discussion

Les images topographiques sont présentées dans la figure 106.

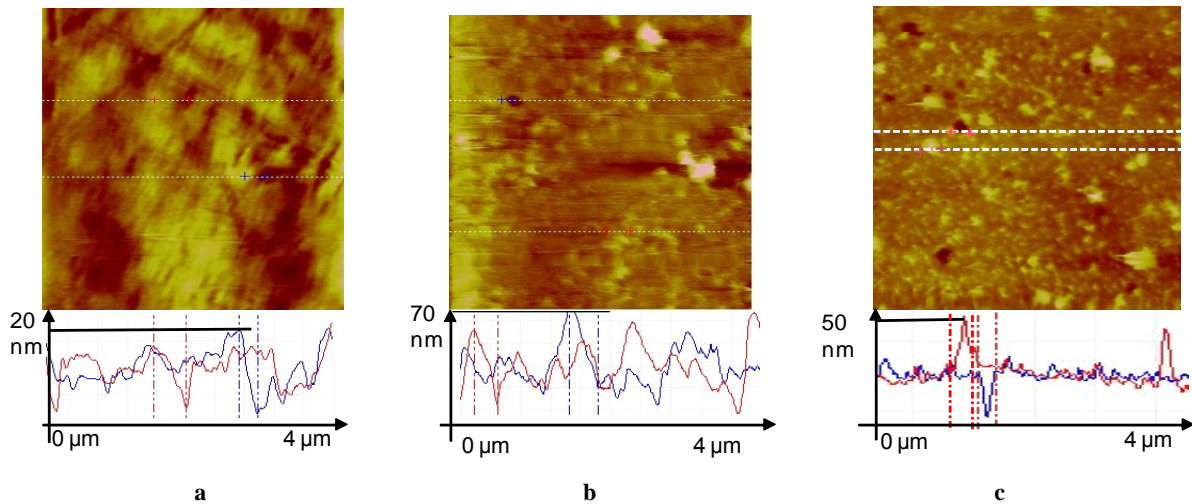


Figure 106. Topographies AFM pour les hydrogels:

- a) HEMA
- b) HEMA 5%AA
- c) HEMA 25%AA

Les valeurs de la rugosité pic-a-pic sont présentées au tableau 17. On voit que les valeurs de rugosité sont faible a cause de l'utilisation de la moule en céramique.

Tableaux 17. Valeurs de rugosité pic-a-pic

Echantillon	Rugosité pic-a-pic (nm)
HEMA	$\sim 15 \pm 2$
HEMA 5%AA	$\sim 50 \pm 5$
HEMA 25%AA	$\sim 25 \pm 2$

La valeur de la rugosité est modifiée par l'ajout comonomères AA sans une variation linéaire avec l'augmentation de la concentration de AA dans l'hydrogel. L'ajout d'AA dans l'hydrogel a permis, cependant, l'augmentation de la rugosité de matériel.

## CHAPITRE VI

# DES ETUDES CINETIQUES DE CHARGEMENT ET DE LIBERATION DES PRINCIPES ACTIFS DANS/DE HYDROGELS P(HEMA-CO-AA)

### VI.2.1.1. La chargement des hydrogels avec les principes actifs

Les hydrogels à base de HEMA et comonomère AA avec un poids sec de 0,5 à 1 g ont été immergés dans une solution du kétoprofène de ou de l'ibuprofène, où ils étaient gardés 48h. Passé ce délai, le médicament chargé dans l'hydrogel ont été séchés dans un four à 37 ° C pendant 72 h. dans la figure 112 est représenté le schéma pour de processus de inclusion du médicament dans les hydrogels.

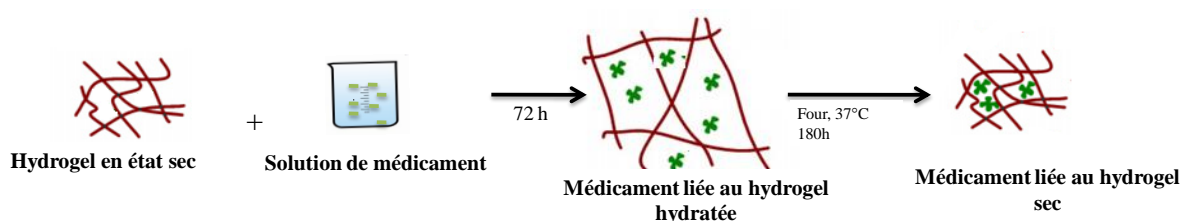


Figure 112. Schéma simplifié d'incorporation des médicaments dans des hydrogels

Le mécanisme de constitution fut un processus physique, qui ne change pas les propriétés mécaniques des hydrogels en modifiant le degré de réticulation et des propriétés de gonflement des changements essentiels. Ainsi, les hydrogels peuvent être chargés avec des médicaments considérés en fonction de la solubilité des médicaments dans cet environnement. Le degré de gonflement dans la solution de médicament a été dépendant de la concentration des hydrogels d'acide acrylique, augmentant avec la concentration en acide acrylique et le montant maximal de l'ibuprofène ou le kétoprofène incorporée a été déterminée par la courbe standard (figures 113 et 114).

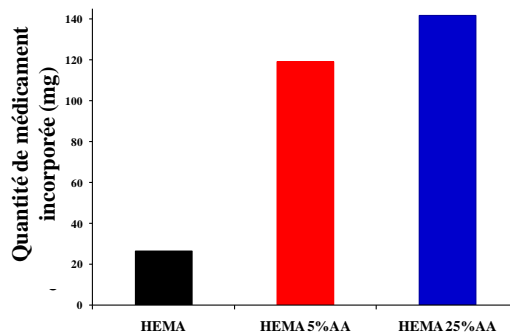


Figure 113. La quantité maximale de kétoprofène incorporée dans les hydrogels

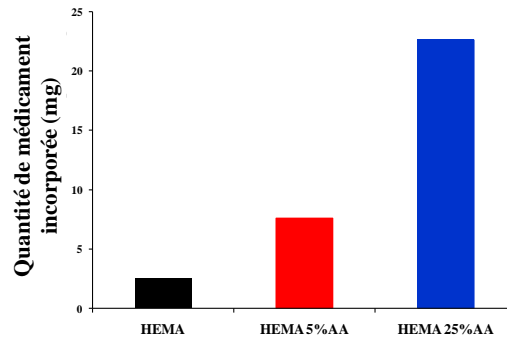


Figure 114. La quantité maximale d'ibuprofène incorporée dans les hydrogels

### VI.3. Les études cinétiques sur la diffusion de substances biologiquement actives synthétisées hydrogels. Modèle théorique de la diffusion

La schéma générale de la libération des médicaments auprès des hydrogels est illustré à la figure 115.

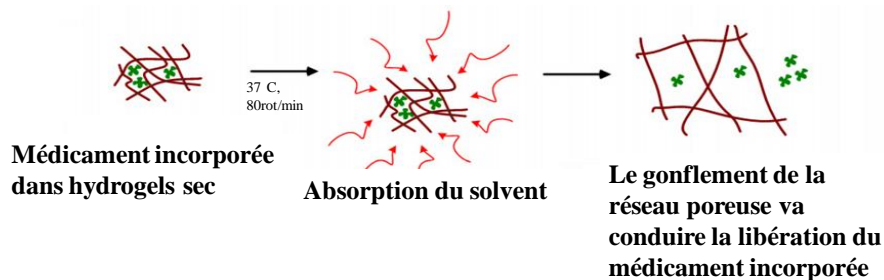


Figure 115. Schéma de libération contrôlée du médicament auprès des hydrogels

La cinétique de libération de principes actifs dépend de la proportion de comonomère AA, la quantité de la médecine et les caractéristiques moléculaires de la solubilité des médicaments dans l'environnement de diffusion. Ainsi, les hydrogels avec une grande quantité d'acide acrylique ont libérée une grande quantité de médicament. La quantité de médicament libérée était la même avec celui incorporée. Les courbes cinétiques de libération de médicament sont présentées dans les figures 116 et 117.

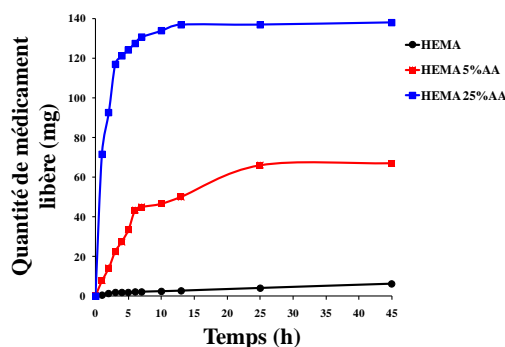


Figure 116. Courbes cinétique de la libération du ketoprofène

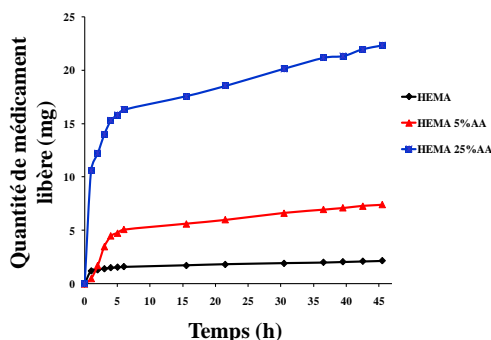


Figure 117. Courbes cinétique de la libération du ibuprofène

Dans le cas du kétoprofène la libération a été réalisée en environ 14 heures pour toutes les formulations. Pour l'ibuprofène, la libération a été fait en environ 45 heures pour tous les hydrogels testées (tableau 20).

Tableaux 20. La quantité de médicament libère

Echantillon	Quantité d'ibuprofène libéré (mg)	Temps (h)	Quantité de ketoprofène libéré (mg)	Temps (h)
HEMA	2,5	~45	26	~15
HEMA 5%AA	7,6	~45	118	~15
HEMA 25%AA	22,6	~45	141	~15

### VI.3.1. Le modèle de la cinétique de diffusion

Pour analyser la libération in vitro des principes actifs (médicaments) sont utilisés pour décrire certaines modèles mathématiques pour modéliser la cinétique de diffusion. Pour

cette étude nous avons choisi le modèle de Korsmeyer-Peppas, qui décrit la libération du médicament à partir de systèmes polymères. Pour nous aider à trouver le mécanisme de libération, les courbes de libération ont été appliquées à ce modèle (l'équation décrite dans le chapitre II) (figures 116 et 117).

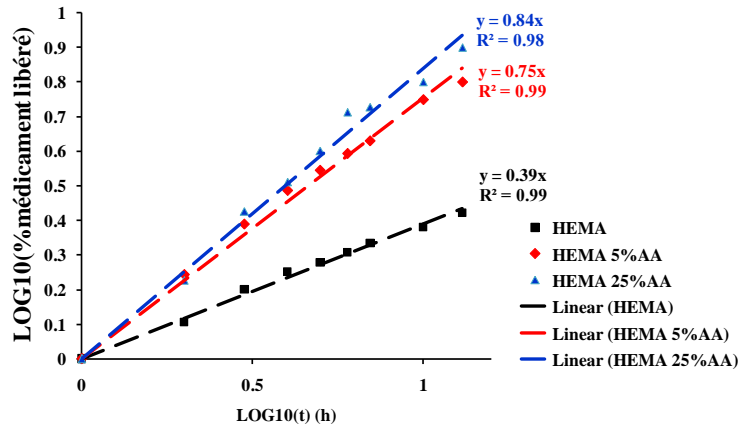


Figure 116. Le modèle mathématique Korsmeyer-Peppas pour la libération contrôlée du ketoprofène

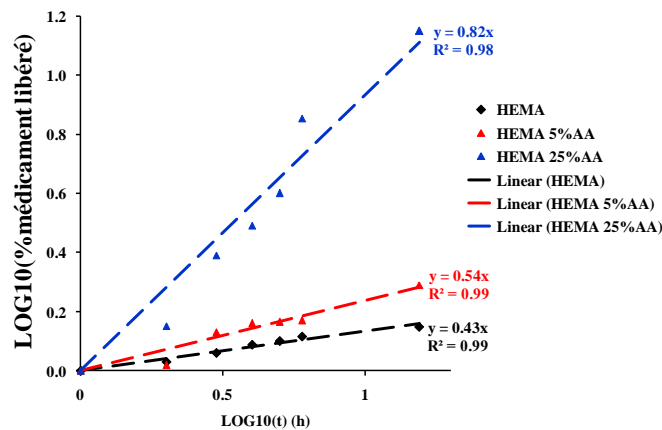


Figure 117. Le modèle mathématique Korsmeyer-Peppas pour la libération contrôlée d'ibuprofène

Les indices de la libération obtenus sont utilisés pour caractériser le mécanisme de libération de la diffusion de médicaments auprès de hydrogels. Les indices ont été obtenus dans l'intervalle  $0,39 < n < 0,89$ , indiquant un type de diffusion non-Fickian. La diffusion de la médicament de la matrice hydrogels était fortement liée au taux de gonflement des hydrogels dans l'environnement (tableau 22).

Tableaux 22. Coefficient de diffusion obtenue par application du modèle mathématique Korsmeyer-Peppas

Echantillon	Ibuprofène	Ketoprofène
HEMA	0,43; r2~0,99	0,39; r2~0,99
HEMA 5%AA	0,54; r2~0,99	0,75; r2~0,99
HEMA 25%AA	0,82; r2~0,98	0,84; r2~0,98

## CONCLUSIONS GENERALES

Les propriétés mécaniques remarquables (grande résistance aux chocs, coefficient de frottement et usure très faibles) du cartilage comme surface portante sont dues à la fois : (1) à l'organisation de sa structure du niveau macro au niveau nano, (2) aux espèces chimiques composant la matrice extracellulaire qui imposent son caractère très hydrophile. Cependant, de nombreuses maladies affectant le cartilage articulaire conduisent à son usure. Dans ces conditions le cartilage articulaire montre sa plus grande déficience : son incapacité d'autoréparation. Les tentatives de réparation à la fois naturelles et chirurgicales permettent actuellement la régénération d'un tissu fibreux ayant une moins bonne résistance aux chocs et à l'usure que le cartilage. C'est pour cela que les recherches actuelles s'orientent à stimuler la réparation du cartilage articulaire en développant des techniques d'ingénierie tissulaire. Le but de l'ingénierie tissulaire du cartilage est de partir de cellules et/ou de différents « biomatériaux » pour obtenir *in vitro* un matériau qui est l'équivalent au cartilage articulaire sain, à la fois structurellement et fonctionnellement.

Dans ce contexte, cette thèse vise à développer des biomatériaux polymères à base de p(HEMA) afin de reproduire la structure et les propriétés mécaniques et physico-chimiques du cartilage sain afin de les appliquer dans l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire.

Pour ce faire, des nouveaux biomatériaux - hydrogels p(HEMA) ont été obtenus en contrôlant le caractère hydrophile des hydrogels p(HEMA) au cours de leur synthèse chimique en présence de différents co-monomères. Ensuite, ces nouveaux hydrogels ont été contrôlés de point de vue propriétés physico-chimiques, mécaniques et tribologiques afin de sélectionner les hydrogels ayant les propriétés les plus proches du cartilage articulaire. Pour les hydrogels ainsi sélectionnés ont été vérifiées leurs propriétés de libération contrôlée de médicament afin de minimiser les risques inflammatoires au cours de leur utilisation dans l'ingénierie tissulaire afin de substituer le cartilage articulaire.

Ainsi, cette thèse comporte 3 étapes principales : (1) obtention des hydrogels HEMA avec hydrophilie contrôlée, (2) sélection des hydrogels ayant les propriétés physico-chimiques et mécaniques semblables au cartilage articulaire, (3) vérification des propriétés de libération contrôlée des médicaments anti-inflammatoires afin d'augmenter leur chance d'être utilisés dans l'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire.

Dans la première étape des nouveaux hydrogels p(HEMA) ont été obtenues en contrôlant le caractère hydrophile par utilisation des différents co-monomères à caractère hydrophile fort (acide acrylique - AA, l'acrylamide - AAM) ou hydrophobes (acrylate d'éthyle - AE, acrylate de butyle - AB) en présence d'un monomère bi-fonctionnel avec le rôle de réticulation : tetraéthylenglicol diacrylate (TEGDA). L'optimisation de la synthèse de ces biomatériaux a été réalisée en utilisant un protocole simple nécessitant un coût et un temps de polymérisation réduit (24 heures). Les nouveaux hydrogels p(HEMA) ainsi obtenus ont été vérifiés de point de vue :

1. **chimique (réaction de co-polymérisation).** Cela a été réalisé par des analyses en spectroscopie infrarouge (spectres FTIR) qui montrent :

- a. l'absence de pics d'adsorption correspondant à la liaison C = C (~ 1640 cm<sup>-1</sup>) présente dans les monomères et absente dans les polymères. Cela signifie que la réaction de polymérisation a bien eu lieu,
- b. la présence de pics d'adsorption d'intensité correspondant aux groupements spécifiques montrant que le co-monomère est bien présent dans la structure du polymère HEMA synthétisés : (1) ~ 3440 cm<sup>-1</sup> montre la présence de liaison -OH (groupement montrant le caractère hydrophile), (2) ~ 1640 cm<sup>-1</sup> montre la présence de liaison C = O (groupement montrant la réticulation), (3) ~ 2960 cm<sup>-1</sup> montre la présence du groupe fonctionnel méthyle (groupement identifiant la chaîne polymérique principale : p(HEMA)).

2. **stabilité thermique.** Cela a été réalisé par l'étude de la dégradation thermique (TG/DSC) de ces hydrogels. Ces études montrent que l'énergie d'activation augmente généralement avec l'augmentation de la proportion de co-monomère ajouté ce qui suggère une amélioration de la stabilité thermique des hydrogels. Ces résultats sont en corrélation avec les spectres FTIR ou on peut voir que l'intensité du pic augmente avec le nombre des groupes -OH introduites par le co-monomère. D'autre part l'obtention d'un ordre de réaction faible dans les essais TG suggère que dans la décomposition thermique de ces hydrogels les processus physiques de transport sont plus importants que les processus chimiques. Les résultats quantitatifs TG/DSC ont permis de calculer la

température de transition des hydrogels ( $T_g$ ). Cette température augmentée avec l'ajout de co-monomère, ce qui confirme que la stabilité thermique est améliorée avec l'augmentation en quantité de co-monomère.

3. **structure.** Cela a été réalisé par des analyses ESEM et AFM des surfaces et coupes transversales des nouveaux hydrogels HEMA. Ces analyses montrent que la copolymérisation a permis de garder la structure poreuse des hydrogels en augmentant la taille des pores par rapport au polymère obtenu sans co-monomère. Aussi ces analyses montrent que la rugosité des surfaces de ces hydrogels a été diminuée par l'augmentation du % de co-monomère.
4. **l'énergie de surface.** Cela a été estimée à partir des mesures d'angles de contact des 3 solvants différents (eau ultra pure, diiodométhane et éthylène glycol) en contact avec la surface des hydrogels. Les résultats montrent que l'ajout du co-monomère a augmenté l'énergie de surface. Ces résultats confirment les analyses thermiques et montrent que, avec l'ajout de co-monomère les liaisons covalentes présentes dans le hydrogel sont plus difficiles à rompre. La mesure d'angle dynamique (l'hystérésis de l'angle de contact), a révélé des informations sur l'homogénéité des surfaces de ces hydrogels. Ainsi ces mesures ont montré que l'homogénéité de la surface d'hydrogels synthétisés diminue avec l'augmentation de la concentration en co-monomère.

Dans la deuxième étape de ce travail une sélection des nouveaux hydrogels obtenus dans l'étape antérieure a été faite afin de se rapprocher le plus possible des propriétés physico-chimiques et mécaniques du cartilage articulaire. Cette sélection a été réalisée à partir des analyses physico-chimiques, mécaniques et tribologiques qui ont permis de contrôler :

1. **le caractère hydrophile.** Cela a été réalisé par la mesure de la masse d'eau retenue (degré de gonflement) dans chaque hydrogel en absence des contraintes mécaniques mais en présence des contraintes physico-chimiques (pression osmotique et pH) propres au milieu biologique. Les résultats montrent que pour les co-monomères hydrophiles le degré de gonflement augmente avec le pourcentage de co-monomère. Pour les co-monomères hydrophobes AE et AB, on peut observer une diminution du degré de gonflement, due à leur hydrophobicité. Ces mesures ont permis de sélectionner le HEMA 5%AA, HEMA 15%AA et



HEMA 5%AAm qui ont un caractère hydrophile similaire à celui du cartilage articulaire.

2. **résistance mécanique en compression.** Comme la grande résistance mécanique du cartilage articulaire aux sollicitations mécaniques (notamment en compression) est due à son organisation structurale du niveau macro au niveau nano, la validation de la résistance mécanique et tribologique des hydrogels synthétisés ici a été réalisée à deux échelles :
  - a. macroscopique : les propriétés mécaniques (module d'élasticité –  $E^*$  et cisaillement  $G^*$ ) des hydrogels HEMA et du cartilage articulaire ont été évalués à partir des essais de compression et cisaillement réalisés en adaptant une configuration plan/plan d'un rhéomètre ARES afin de contrôler le glissement à la paroi (glissement total dans le cas des essais de compression et glissement 0 dans le cas des essais de cisaillement). Les résultats ont montré que les hydrogels synthétisés avec le co-monomère AA ont un comportement mécanique macroscopique similaire à celui du cartilage articulaire.
  - b. Micro/nanométrique. Les propriétés mécaniques (module d'élasticité) des hydrogels HEMA et du cartilage articulaire ont été évaluées dans des mesures de nano-indentation utilisant la microscopie à force atomique et des billes de borosilicate de 20  $\mu\text{m}$  en rayon comme nano-indentor. Les résultats montrent que le module d'élasticité obtenu à l'échelle nano est comparable à celui obtenu à l'échelle macro pour des concentrations faibles de co-monomère (0%-5% massique). Pour des concentrations de co-monomère plus grandes on observe une diminution de la valeur moyenne du module d'élasticité et un élargissement de l'intervalle de variation des résultats. Cela pourra être corrélé avec une diminution de l'homogénéité des hydrogels contenant des concentrations plus grandes de co-monomère ; cela est en concordance avec les mesures dynamiques de l'angle de contact qui montre aussi une diminution de l'homogénéité des hydrogels avec l'augmentation du % de co-monomère.
3. **les propriétés tribologiques (coefficient de frottement, usure).** Une des propriétés mécaniques les plus importantes du cartilage articulaire est un très faible coefficient de friction, ce qui fait un matériau très performant du point de

vue tribologiques. Il a donc fallu analyser les hydrogels en termes de propriétés tribologiques. Cette analyse a été faite à la fois la échelle macro et l'échelle micro/nano afin de valider ces hydrogels comme implants a différentes échelles. Les coefficients de frottement obtenus sont de l'ordre  $10^{-2}$ , comparables avec le coefficient de frottement du cartilage articulaire et comparables à la macro et le niveau nano. La valeur du coefficient de frottement diminue avec l'augmentation du co-monomère AA.

La troisième étape de ce travail a consisté a sondé les propriétés de libération contrôlée des médicaments anti-inflammatoires a travers les hydrogels sélectionnées comme ayant des propriétés similaires au cartilage articulaire, afin de vérifier leur chance de résister a l'implantation. La libération contrôlée de principes actives (médicaments anti-inflammatoires : ketoprofène et ibuprofène) a été testé pour les hydrogels à base de HEMA et AA qui ont été soumis aux tests de chargement et de libération de ces principes actifs. Ces principes actifs réduisent considérablement le risque d'inflammation due a l'implantation d'un biomatériaux. De plus elles sont souvent utilisés dans le traitement des maladies du cartilage, mais leur efficacité est réduite a cause d'une administration systémique (voie orale ou sanguine) qui génère une métabolisation précoce du médicament et un réduction du temps d'action (la demi-vie du médicament est d'environ 2h), de plus ces médicaments ne peut pas être administrée dans les maladies du foie, reins et gastro-intestinale. Par conséquence cette étude vise à tester l'inclusion et la libération de ces principes actives a travers les hydrogels implantés. Ainsi l'inclusion et la et la libération des principes actifs auprès des hydrogels HEMA-AA a été testé en mesurant le temps de diffusion du principe actif du hydrogel dans un solution tampon biologique et inverse. On a utilisé le modèle cinétique de libération décrit par Korsmeyer-Peppas dans lequel on a vérifié que indices dérivés correspond à un diffusion type non-Fikian ( $0,39 < n < 0,89$ ) ce qui nous confirme que la libération contrôlée des principes actives a lieu a cause de diffusion a travers les hydrogels. Les résultats montrent que la demi-vie a été augmentée jusqu'à ~15 heures pour ketoprofène et ~45 pour ibuprofène.

Universitatea Tehnică "Gh.Asachi" din Iași, România  
Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului

în cotutelă cu

Institutul Național de Științe Aplicate din Lyon, Franța  
Școala Doctorală MEGA

# **TEZĂ DE DOCTORAT**

**Conducători științifici:**

**Prof.Dr.Ing. Marcel Ionel POPA**

**Prof. Yves BERTHIER**

**Bioinginer:**

**Luciana Elena BOSTAN**

**-2011-**

Universitatea Tehnică "Gh.Asachi" din Iași, România  
Facultatea de Inginerie Chimică și Protecția Mediului

în cotutelă cu

Institutul Național de Științe Aplicate din Lyon, Franța  
Școala Doctorală MEGA

**MATERIALE POLIMERICE CU  
HIDROFILIE CONTROLATĂ CU  
APLICAȚII ÎN INGINERIA  
TISULARĂ A CARTILAJULUI  
ARTICULAR**

**Conducători științifici:**

**Prof.Dr.Ing. Marcel Ionel POPA**

**Prof. Yves BERTHIER**

**Bioinginer:**

**Luciana Elena BOSTAN**

**-2011-**

*“Știința...nu a rezolvat niciodată o problemă fără să creeze altele 10.”*

*George Bernard Shaw*  
*(1856-1950)*

*“Succesul nu este definitiv, eșecul nu este fatal:  
curajul de a continua este ceea ce contează.”*

*Winston Churchill*  
*(1874-1965)*

*"Singuri facem foarte puține lucruri;  
dar împreună putem realiza foarte  
multe"*

*Helen Keller  
(1880-1968)*

*"Individual sunt doar o picătură.  
Împreună suntem un ocean"*

*Ryunosuke Satoro  
(1892-1962)*

Mulțumesc,

Vreau să mulțumesc în primul rând conducătorilor tezei mele de doctorat: **Marcel Ionel POPA** și **Yves BERTHIER**. Ei m-au introdus într-un domeniu foarte interesant, mi-au dat sfaturi utile de fiecare dată, au răspuns cu răbdare întrebărilor și cerințelor mele. De asemenea, au avut întotdeauna grijă să mă încurajeze. Mi-au împărtășit și mie pasiunea pe care o au în domeniul lor de știință. Ei au fost întotdeauna alături de mine, atât în perioade dificile cât și în momente de mare bucurie. Ei au continuat să-mi ofere sprijin în toți acești ani, și și-au adus un mare aport pe tot parcursul acestei teze. Pot afirma că, această teză a fost rodul unei colaborări depline.

Vreau să mulțumesc și raportorilor **Viorel MELNIG** și **Jacques DESBRIERES** pentru acceptul lor de a raporta teza de doctorat, și, de asemenea, interesul lor pentru munca depusă pe tot parcursul acestor ani și rapiditatea cu care au citit manuscrisul. Mulțumesc și celorlați membri:

**Dan CASCAVAL, Ana-Maria TRUNFIO-SFARGHIU** pentru acceptarea să facă parte din juriu.

Aș dori să mulțumesc de asemenea, celor care au jucat un rol fundamental în formarea mea. În primul rând pentru cei care au trezit în mine o pasiune pentru cercetare: **Florin MUNTEANU**, oferindu-mi un stagiu Erasmus la INSA.

**Liliana VERESTIUC** care m-a introdus în universul mare al biomaterialelor, și **Ana-Maria TRUNFIO-SFARGHIU** care mi-a împărtășit vasta sa experiență în biomecanica, și nu numai. În calitate de coordonatori ai tezei mele de doctorat, m-au sprijinit pe tot parcursul tezei mele, și, de asemenea, au analizat cu atenție acest manuscris. Vă mulțumesc pentru timpul acordat corectării acestui manuscris, ori de câte ori, "pixul" meu, tindea să derapeze.

Îi mulțumesc foarte călduros laboratorului LaMCoS (INSA Lyon) care mi-a oferit un mediu de lucru excelent în timpul pregătirii acestei teze: **Marie-Hélène MEURISSE Michel QUERY, Claude GODEAU, Silvie DESCARTES, Anne-Marie Colin, Alexandra PODGOURSKAIA**. Ei m-au ajutat foarte mult în munca mea de cercetare, dar și în problemele mele administrative. Apreciez prietenia și sinceritatea lor.

Am avut, de asemenea, plăcerea de a colabora cu alte laboratoare: LPMCN (Lyon), platforma MATMIP, Universitatea "Gh.Asachi" (Iași). Mulțumiri în special lui **Jean-Paul RIEU** și **Gabi LISA** pentru colaborare.

Mulțumesc, de asemenea tuturor colegilor mei, prietenilor de birou, atât din România cât și din Franța, care sunt foarte drăguți și prietenoși: **Ovidiu NOVAC, Gina DODI, Vera BALAN, Edi TANASE, Simona BETIANU, Ionut MATEI, Livia CUERU, CRISAN Nicoleta, CORNECI Magdalena, Na WANG**.

În cele din urmă, aș vreau să mulțumesc **părinților mei**, logodnicului meu, **Ionut** și întregii sale familii, pentru dragostea și suportul lor constant.





# CUPRINS

## INTRODUCERE

## CAPITOLUL I

### MATERIALE POLIMERICE CU APLICAȚII ÎN INGINERIA TISULARĂ A CARTILAJULUI ARTICULAR 1

#### I.1. STRUCTURA ȘI PROPRIETĂȚILE CARTILAJULUI ARTICULAR 1

##### I.1.1. STRUCTURA CARTILAJULUI ARTICULAR 2

##### I.1.2. COMPOZIȚIA CARTILAJULUI ARTICULAR 2

I.1.2.1. Condrocitele 3

I.1.2.2. Matricea extracelulară 4

I.1.2.2.1. Componenta lichidă 4

I.1.2.2.2. Macromoleculele de structură 4

##### I.1.3. ZONELE STRUCTURALE ALE CARTILAJULUI ARTICULAR 9

##### I.1.4. PROPRIETĂȚILE CARTILAJULUI ARTICULAR 10

I.1.4.1. Proprietățile biologice 11

I.1.4.1.1. Mecanismul de compensare al uzurii 11

I.1.4.1.2. Mecanismul remodelării osoase 11

I.1.4.2. Proprietățile fizico-chimice 12

I.1.4.3. Proprietățile biomecanice 13

I.1.4.3.1 Rezistența la compresiune 13

I.1.4.3.2. Rezistența la forfecare 16

I.1.4.3.3. Rezistența la tracțiune 17

I.1.4.3.4. Rezistența la fisurare 17

I.1.4.4. Lubrifierea cartilajului articular 17

I.1.4.5. Nutriția condrocitelor 18

##### I.2. PATOLOGIA CARTILAJULUI ARTICULAR: METODE DE CURENTE DE TRATAMENT 20

##### I.2.1. RĂSPUNSUL CARTILAJULUI ARTICULAR LA AGRESIUNE 20

I.2.1.1. Microleziunea 21

I.2.1.2. Fractura condrală 21

I.2.1.3. Fractura osteocondrală 22

##### I.2.2. TRATAMENTUL LEZIUNILOR CARTILAJULUI ARTICULAR 22

I.2.2.1. Tratamentul medicamentos al leziunilor cartilajului articular 22

I.2.2.1.1. Glucozamina și condroitin sulfatul 22

I.2.2.1.2. Acidul hialuronic 22

I.2.2.1.3. Glucocorticoizii 23

I.2.2.1.4. Antiinflamatoare nesteroidiene 23

I.2.2.2. Tratamentul chirurgical al leziunilor cartilajului articular 23

I.2.2.2.1. Transplantul ostocondral autolog	24
I.2.2.2.2. Implantarea de condrocite autologe	25
<b><u>I.3. BIOMATERIALE UTILIZATE ÎN INGINERIA TISULARĂ A CARTILAJULUI ARTICULAR</u></b>	<b>26</b>
<b><u>I.3.1. MATERIALE POLIMERICE SINTETICE UTILIZATE CA BIOMATERIALE ÎN ORTOPEDIE</u></b>	<b>28</b>
I.3.1.1. Polietilenele	30
I.3.1.2. Poli(clorura de vinil)	32
I.3.1.3. Politetrafluoretilena	33
I.3.1.4. Poli(alcoolul vinilic)	35
I.3.1.5. Polimeri acrilici	38
I.3.1.5.1. Poli(metacrilatul de metil)	38
I.3.1.6. Poliamide	40
I.3.1.7. Poliuretani	41
<b><u>I.3.2. POLIMERI UTILIZAȚI PENTRU ÎNLOCUIREA CARTILAJULUI ARTICULAR</u></b>	<b>43</b>
<b><u>I.3.3. HIDROGELURI PE BAZĂ DE P(HEMA)</u></b>	<b>50</b>
I.3.3.1. Structura p(HEMA)	51
I.3.3.2. Caracteristici fizico-chimice și mecanice	53
<b><u>I.3.4. PROPRIETĂȚILE DE VOLUM ALE HIDROGELURILOR</u></b>	<b>54</b>
<b><u>I.3.5. PROPRIETĂȚILE MECANICE ALE HIDROGELURILOR</u></b>	<b>54</b>
I.3.5.1. Extensiometria	55
I.3.5.2. Rezistența la compresiune	56
I.3.5.3. Testul de indentare	56
<b><u>I.4. CONCLUZII</u></b>	<b>57</b>
<b><u>CAPITOLUL II</u></b>	
<b><u>STRATEGIA EXPERIMENTALĂ</u></b>	<b>60</b>
<b><u>II.1. CONCEPT EXPERIMENTAL</u></b>	<b>60</b>
<b><u>II.1.1. MATERIALE FOLOSITE</u></b>	<b>62</b>
II.1.1.1. Reactivi	62
<b><u>II.2. METODE DE ANALIZĂ</u></b>	<b>66</b>
<b><u>II.2.1. ANALIZA PRIN SPECTROSCOPIE ÎN INFRAROȘU (FTIR)</u></b>	<b>66</b>
<b><u>II.2.2. METODE DE ANALIZĂ TERMICĂ</u></b>	<b>70</b>
<b><u>II.2.3. DETERMINAREA TENSIUNII SUPERFICIALE</u></b>	<b>72</b>
II.2.3.1. Teoriile tensiunii superficiale	73
II.2.3.1.1. Teoria lui Young	73
II.2.3.1.2. Teoria lui Fowkes	74
II.2.3.1.3. Teoria acid-bază	75
<b><u>II.2.4. STUDII DE UMFLARE</u></b>	<b>76</b>
II.2.4.1. Cinetica umflării	77
<b><u>II.2.5. MICROSCOPIE ELECTRONICĂ DE BALEIAJ (SEM, ESEM)</u></b>	<b>78</b>

<b><u>II.2.6. TESTE MECANICE ȘI TRIBOLOGICE LA SCARĂ MACRO ȘI NANO (REOMETRIE, MICROSCOPIE DE FORTĂ ATOMICĂ)</u></b>	<b>79</b>
II.2.6.1. Teste de reometrie	79
II.2.6.1.1. Teste de compresiune	80
II.2.6.1.2. Teste de forfecare	81
II.2.6.2. Microscopia de forță atomică	82
II.2.6.2.1. Tipuri de măsurători AFM	85
<b><u>II.2.7. TESTE <i>IN VITRO</i> DE ÎNCĂRCARE ȘI ELIBERARE DE PRINCIPII ACTIVE ÎN/DIN HIDROGELURI</u></b>	<b>88</b>
II.2.7.1. Modele matematice care descriu eliberarea controlată de principii biologice active	89
<b><u>CAPITOLUL III</u></b>	
<b><u>SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA HIDROGELURILOR</u></b>	<b>95</b>
<b><u>III.1. SINTEZA HIDROGELURILOR PE BAZĂ DE HEMA ȘI COMONOMERI CU CARACTER HIDROFIL SAU HIDROFOB</u></b>	<b>97</b>
<b><u>III.2. CARACTERIZAREA HIDROGELURILOR</u></b>	<b>100</b>
<b><u>III.2.1. ANALIZA PRIN SPECTROSCOPIE FTIR</u></b>	<b>100</b>
<b><u>III.2.2. ANALIZE TERMICE</u></b>	<b>103</b>
III.2.2.1. Analiza termogravimetrică (TG)	103
III.2.2.1. Analiza de calorimetrie diferențială (DSC)	106
<b><u>III.3. ANALIZA MORFOLOGICĂ A HIDROGELURILOR: ESEM, SEM</u></b>	<b>108</b>
<b><u>III.3.1. ANALIZA HIDROGELURILOR PRIN ESEM</u></b>	<b>108</b>
<b><u>III.3.2. ANALIZA HIDROGELURILOR PRIN SEM</u></b>	<b>109</b>
<b><u>III.4. UMFLAREA ÎN SOLUȚII CU CARACTERISTICI SIMILARE CU LICHIDELE BIOLOGICE</u></b>	<b>110</b>
<b><u>III.5. DETERMINAREA ENERGIEI DE SUPRAFAȚĂ</u></b>	<b>114</b>
<b><u>III.6. CONCLUZII</u></b>	<b>117</b>
<b><u>CAPITOLUL IV</u></b>	
<b><u>STUDII PRIVIND EVALUAREA BIOMECANICĂ A HIDROGELURILOR</u></b>	<b>119</b>
<b><u>IV.1. DETERMINAREA CARACTERISTICILOR MECANICE</u></b>	
<b><u>LA COMPRESIUNE</u></b>	<b>119</b>
<b><u>IV.1.1. STABILIREA PARAMETRILOR EXPERIMENTALI</u></b>	<b>120</b>
<b><u>IV.1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII</u></b>	<b>122</b>
<b><u>IV.2. DETERMINAREA CARACTERISTICILOR DE VÂSCOELASTICITATE</u></b>	<b>126</b>
<b><u>IV.2.1. STABILIREA PARAMETRILOR EXPERIMENTALI</u></b>	<b>127</b>
<b><u>IV.2.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII</u></b>	<b>127</b>
<b><u>IV.3. ANALIZA CRITICĂ A MATERIALELOR ȘI SELECȚIA SISTEMELOR CU POTENȚIALE APLICAȚII BIOMEDICALE</u></b>	<b>131</b>
<b><u>IV.4. ANALIZA NANOMECANICĂ A HIDROGELURILOR P(HEMA-CO-AA)</u></b>	<b>132</b>
<b><u>IV.4.1. TESTE DE NANOIDENTARE</u></b>	<b>132</b>

<b><u>IV.4.1.1 STABILIREA PARAMETRIILOR EXPERIMENTALI</u></b>	<b>133</b>
<b><u>IV.4.1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII</u></b>	<b>134</b>
<b><u>IV.5. CONCLUZII</u></b>	<b>138</b>
<b><u>CAPITOLUL V</u></b>	
<b><u>ANALIZA TRIBOLOGICĂ A HIDROGELURILOR</u></b>	<b>140</b>
<b><u>V.1. STUDII DE FRECARĂ LA SCARA MACROSCOPICĂ</u></b>	<b>141</b>
<b><u>V.1.1. STABILIREA PARAMETRIILOR EXPERIMENTALI</u></b>	<b>142</b>
<b><u>V.1.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII</u></b>	<b>143</b>
<b><u>V.2. TESTE NANOTRIBOLOGICE</u></b>	<b>144</b>
<b><u>V.2.1. STABILIREA PARAMETRIILOR EXPERIMENTALI</u></b>	<b>146</b>
<b><u>V.2.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII</u></b>	<b>146</b>
<b><u>V.3. STUDII DE TOPOGRAFIE</u></b>	<b>148</b>
<b><u>V.3.1. STABILIREA PARAMETRIILOR EXPERIMENTALI</u></b>	<b>148</b>
<b><u>V.3.2. REZULTATE ȘI DISCUȚII</u></b>	<b>148</b>
<b><u>V.4. CONCLUZII</u></b>	<b>149</b>
<b><u>CAPITOLUL VI</u></b>	
<b><u>STUDII CINETICE DE ÎNCĂRCARE ȘI ELIBERARE DE PRINCIPII ACTIVE ÎN/DIN HIDROGELURI P(HEMA-CO-AA)</u></b>	<b>151</b>
<b><u>VI.1. ELIBERAREA CONTROLATĂ DE PRINCIPII ACTIVE: GENERALITĂȚI</u></b>	<b>152</b>
<b><u>VI.1.1. ALEGEREA PRINCIPIULUI ACTIV</u></b>	<b>155</b>
<u>VI.1.1.1. Ibuprofenul</u>	158
<u>VI.1.1.2. Ketoprofen</u>	160
<b><u>VI.2. STUDII CINETICE PRIVIND DIFUZIA UNOR SUBSTANȚE BIOLOGIC ACTIVE ÎN HIDROGELURI</u></b>	<b>163</b>
<b><u>VI.2.1. CARACTERIZAREA HIDROGELURILOR ÎNCĂRCATE CU PRINCIPII ACTIVE</u></b>	<b>163</b>
<u>VI.2.1.1. Încărcarea medicamentului în hidrogelurile pe baza de p(HEMA)</u>	164
<b><u>VI.3. STUDII CINETICE PRIVIND DIFUZIA UNOR SUBSTANȚE BIOLOGIC ACTIVE DIN HIDROGELURILE SINTETIZATE. MODEL TEORETIC DE DIFUZIE</u></b>	<b>166</b>
<b><u>VI.3.1. MODELUL TEORETIC DE DIFUZIE</u></b>	<b>168</b>
<b><u>VI.4. CONCLUZII</u></b>	<b>170</b>
<b><u>CONCLUZII GENERALE</u></b>	<b>171</b>
<b><u>BIBLIOGRAFIE</u></b>	<b>175</b>

## INTRODUCERE

În prezent, materialele polimerice ocupă un loc foarte important în toate domeniile activității umane, fiind parte din ce în ce mai mult din viața de zi cu zi. Dintre acestea, biomaterialele polimerice constituie un subiect foarte actual și cu o dinamică deosebită, dată fiind diversitatea utilizării în domeniul medical și farmaceutic. Principala preocupare o reprezintă ameliorarea calității implanturilor și a dispozitivelor de analiză minim-invazivă ale organismului, creșterea biocompatibilității și a rezistenței mecanice a materialelor care urmează să intre în contact direct cu țesuturile biologice, punerea la punct a unor sisteme de elibere controlată, care să ducă la organul-țintă diferite principii biologice active.

Deși se află la dispoziție un număr mare de materiale, biocompatibilitatea și proprietățile mecanice, au restrâns sever numărul actual de polimeri care pot fi folosiți în domeniul medical. Candidatele la biomateriale trebuie să îndeplinească câteva cerințe, legate de proprietățile fizice și mecanice ale polimerilor. Acestea includ: geometria dispozitivului sau implantului, gradul de umflare la echilibru, omogenitatea, proprietățile elastice, răspunsul la tensiune, comportarea vâscoelastică în timp, și posibilitatea eliberării controlate de principii active.

De asemenea, biomaterialele trebuie să poată fi sterilizate, fără alterarea formei sau proprietăților și fără absorbția permanentă a agenților de sterilizare. Ele nu trebuie să prezinte reacții inflamatoare când vin în contact cu țesuturile naturale și acestea nu trebuie să fie degradate în prezența enzimelor naturale din fluidele biologice.

Până în prezent, o varietate de materiale (naturale sau sintetice) au fost studiate ca potențiale produse ale ingineriei tisulare a cartilajului articular. Materialele naturale pot adesea interacționa cu celulele, dar, în același timp o serie de dezavantaje legate de răspunsul imun și proprietățile mecanice necorespunzătoare cu cele ale cartilajului articular.

Astfel că, materialele sintetice au fost propuse ca și candidate pentru ingineria tisulară a cartilajului articular, pentru că structura lor poate fi controlată astfel încât să putem anticipa anumite proprietăți chimice și fizice specifice, pentru a putea obține anumite caracteristici mecanice.

Aceste biomateriale pot fi sintetizate într-o varietate de matrici (bureți, rețele și hidrogeluri). Rețelele și bureții sintetici sunt matrici 2D care au o porozitate foarte mare (>90%), și nu pot asigura funcțiile mecanice, însă pot servi ca o modalitate de transport ai celulelor sau diferitelor principii active.

În cazul cartilajului articular, cel mai important aspect constă în abilitatea de a rezista forțelor de forfecare și compresiune de la nivelul articulației. Din punct de vedere a

proprietăților mecanice, cei mai indicați sunt copolimerii metacrilici care se pretează la astfel de cerințe. Dintre aceștia, un loc important ca și component al hidrogelurilor de uz biomedical îl ocupă p(hidroxietyl metacrilatul) (p(HEMA)) datorită proprietăților sale remarcabile: lipsa de toxicitate și biocompatibilitate fiind folosit ca produs comercial (lentile de contact). În plus, sinteza acestor hidrogelurile pe bază de p(HEMA) se face într-un timp scurt, fără a necesita o aparatură complicată, precum și un cost redus. Hidrofilia lor poate fi ușor modificată utilizând diferiți co-monomeri.

Hidrogelurile pe bază p(HEMA) au fost folosite pentru protezarea țesuturilor moi, datorită caracteristicilor de biocompatibilitate, permeabilitate mare față de moleculele mici, hidrofilicitate mare și consistență moale, în plus, p(HEMA) are un conținut de apă similar cartilajului articular, prezintă rezistență la degradare, nu este absorbit de organism, suportă sterilizarea prin încălzire fără afectarea structurii și se poate obține într-o varietate mare de forme.

Mergând după aceste principii, teza de față își propune sinteza și caracterizarea unor materiale polimerice de tip hidrogel, care să aibă proprietăți atât de structură cât și mecanice, similare cu cele ale cartilajului articular.

Teza este alcătuită din două părți, una teoretică și cealaltă experimentală, structurate în șase capitole, în care: primul capitol reprezintă partea teoretică, iar celelalte, partea originală, experimentală.

În **capitolul I** sunt prezentate structura și proprietățile cartilajului articular, precum și patologia întâlnită la acest nivel de țesut. Stadiul actual al metodelor de tratament actuale sunt subliniate împreună cu limitările lor, pentru a evidenția problematica de la care s-a plecat în cadrul acestui studiu. Astfel o alternativă este prezentată prin prisma ingineriei tisulare a cartilajului articular.

Odată stabilită clasa de materiale polimerice cu care se va lucra, în **capitolul II** sunt prezentate metodele și analizele experimentale.

**Capitolul III**, care reprezintă cea mai mare parte originală a tezei, constă în sinteza și caracterizarea hidrogelurilor. La realizarea protocolul experimental s-a încercat realizarea testelor în aceleași condiții ca cele fiziologice ale cartilajului articular (parametrii de testare și mediul de hidratare tampon pH 7).

În **capitolul IV** se face selecția critică a hidrogelurilor sintetizate, în funcție de rezultatele obținute în urma testelor de compresiune și forfecare. Astfel, au fost alese doar hidrogelurile cu un comportament la compresiune și forfecare, asemănător cu cel al cartilajului articular (hidrogelurile cu HEMA, HEMA 5% AA, HEMA 25% AA). În continuare

au fost realizate teste de comprimare la scară nano, pentru a verifica dacă proprietățile sunt aceleași cu cele de la scară macro.

Datorită aplicației ca substituent de cartilaj articular, în **capitolul V** hidrogelurile au fost testate pentru a le caracteriza din punct de vedere tribologic. Testele au fost realizate atât la scară macro cât și nano.

În **capitolul VI** a fost realizat un studiu de eliberare controlată de principii active în/din hidrogeluri, pentru a se preveni, în cazul implantării, reacția de inflamare care apare în urma acestei intervenții.

Rezultate obținute pe parcursul acestei teze au fost valorificate prin următoarele publicații și comunicări științifice:

### **Lucrări publicate sau acceptate spre publicare în reviste cu factor de impact:**

1. Y. Margaron, **L. Bostan**, J.-Y. Exposito, M. Malbouyres, A.-M. Trunfio-Sfarghiu, Y. Berthier, C. Lethias, *Tenascin-X increases the stiffness of collagen gels without affecting fibrillogenesis*, Biophysical Chemistry (2010), 147:87–91.
2. **L. Bostan**, F. Munteanu, M. I. Popa, L. Vereștiuc, *Preliminary Studies on Fatigue Analysis of Hydrogels Based on p(HEMA)*, Revista de Chimie (Bucharest) 61 (2010), 12: 1235-1238.
3. **L. Bostan**, A.-M. Trunfio-Sfarghiu, L. Vereștiuc, M.I.Popa, F. Munteanu, Y. Berthier, *Macro and nano-tribological characterisation of a new HEMA hydrogel for articular cartilage replacement*, Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering, Volume 13, Supplement 1, (September 2010), ISSN: 1025-5842, 33-35.
4. **L. Bostan**, A.-M. Trunfio-Sfarghiu, L. Vereștiuc, M.I.Popa, F. Munteanu, J.-P. Rieu, Y. Berthier, *Mechanical and tribological properties of poly(hydroxyethyl methacrylate) hydrogels for articular cartilage substitute*, Tribology International, TRIBINT-D-10-00484 - trimisă spre publicare.

**Lista de lucrări comunicate la Congrese Naționale și Internaționale:**

1. **L.Bostan**, L. Vereștiuc, F. Munteanu, M.I. Popa, *Studii asupra caracteristicilor tribologice ale poli(hidroxietyl metacrilat)*, Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului IV, 15-16 noiembrie 2007, ISSN: 1912-1937-2007, Iași, România.
2. O. Novac, N. Popa, **L. Bostan**, L. Profire, M. I. Popa, “*Natural Polymers/Theophylline Nanostructured Systems*”, International Conference of Applied Sciences, Chemistry and Chemical Engineering, CISA-2008, 4-6 aprilie, 2008, Slănic Moldova, Bacău, România.
3. O. Novac, N. Aelenei, N. Popa, **L. Bostan**, M.I. Popa, “*Kinetics of polyphenol delivery from nanostructured systems*”, International Conference Applied Sciences – Chemistry and Engineering Chemistry: CISA – 2008, CISA-2008, 4-6 aprilie, 2008, Slănic Moldova, Bacău, România.
4. **L.Bostan**, L.Vereștiuc, M.I.Popa, *Model al cartilajului articular - Hidrogel pe baza de p(HEMA)*, *Polimeri hidrosolubili pentru aplicații avansate*, Curs pentru tinerii cercetători, 15 – 17 aprilie 2008, Iași, România.
5. **L. Bostan**, M. I. Popa, F. Munteanu, L. Vereștiuc, *Hydrogels based on poly(HEMA) with application in tissue engineering of cartilage*, 6th International Workshop for Musculoskeletal and Neuronal Interactions, 8-11 May 2008, Kardinal Schulte Haus, Bergisch Gladbach, Cologne, Germany.
6. **L. Bostan**, M. I. Popa, L. Vereștiuc, *P(HEMA) – application dans l’ingénierie tissulaire du cartilage articulaire*, aV-a Ediție a Colocviului Franco-Român de Chimie Aplicată, COFrRoCA – 2008, 25-29 iunie 2008, Universitatea din Bacău, România.
7. **L.Bostan**, M. I. Popa, L.Vereștiuc, C.Ibănescu, M. Danu, G. Lisa, *Hydrogels based on p(HEMA) with application in tissue engineering of articular cartilage*, 3rd International Conference on Biomaterials and Medical Devices (BiomMedD'2008), November 13-16th, 2008, Bucharest, Romania.



8. **L.Bostan**, M. I. Popa, L.Vereștiuc, C.Ibănescu, M. Danu, G. Lisa, *Tribological analysis of hydrogels based on p(HEMA). Possibility of using as articular surfaces in hip prothesis*, 3rd International Conference on Biomaterials and Medical Devices (BiomMedD'2008), November 13-16th, 2008, Bucharest, Romania.
9. **L.Bostan**, M. I. Popa, L.Vereștiuc, C.Ibănescu, M. Danu, G. Lisa, *Perspective în obținerea unui material de substituție al cartilajului articular*, Zilele Facultății de Inginerie Chimică și Protecția Mediului V, 19-21 noiembrie 2008, Iași, România.
10. **L. Bostan**, A –M. Trunfio-Sfarghiu , Y. Berthier, M.I. Popa, F.Munteanu, L.Vereștiuc, *Synthesis and biomechanical characterisation of hydrogels based on p(HEMA) with applications in articular cartilage substitution*, 22nd European Conference on Biomaterials, The annual conference of the European Society for Biomaterials, September 7-11, 2009, Lausanne, Switzerland.
11. **L. Bostan**, A –M. Trunfio-Sfarghiu , L.Vereștiuc, M.I. Popa, F.Munteanu, Y. Berthier, *Macro and nano-tribological characterisation of a new HEMA hydrogel for articular cartilage replacement*, 35ème congrès annuel de la Société de Biomécanique, 25 -27 Aout 2010, Le Mans, France.
12. **L.Bostan**, A-M. Trunfio-Sfarghiu, L.Vereștiuc, M.I.Popa, F. Munteanu, Y.Berthier, *Analyse of mechanical and tribological properties of polymers with controlled hydrophilic character for articular cartilage substitute*, 37th Leeds-Lyon Symposium on Tribology, Tuesday 7th - Friday 10th September 2010, Leeds, UK.
13. **L.Bostan**, A-M. Trunfio-Sfarghiu, L.Vereștiuc , M.I.Popa , F. Munteanu , Y.Berthier, *Tribological behavior of hydrogels based on p(HEMA)*, The 11th International Conference on Tribology, 4 – 7 noiembrie 2010, Iași, România, ISSN 2069-1718.

**Lucrări publicate în volume de specialitate:**

1. O.Novac, N. Aelenei, N.Popa, **L. Bostan**, M.I.Popa, “*Kinetics of polyphenol delivery from nanostructured systems*”, International Conference Applied Sciences – Chemistry and Engineering Chemistry: CISA – 2008, p.46-51, ISBN 978-973-1833-86-6.
2. O. Novac, N. Popa, **L. Bostan**, L. Profire, M.I. Popa, “*Natural polymers/theophylline nanostructured systems*”, International Symposium of Applied Sciences, Bacău, 4-6 aprilie, 2008.
3. **L.Bostan**, M.I.Popa, L.Vereștiuc, F. Munteanu, *P(HEMA) – Application dans l’ingenierie tissulaire du cartilage articulaire*, Scientific Study and Research, 2008, Vol. VII (4), p. 445-451.
4. **L. Bostan**, A.-M. Trunfio-Sfarghiu, L. Vereștiuc, M.I. Popa, Yves Berthier, *Tribological behavior of hydrogels based on p(HEMA)*, Buletinul Institutului Politehnic din Iași, Tomul LVII (LXI), Fasc. 1, 2011, p.1-9.

**Membri în echipele de cercetare al contractelor de cercetare**

1. CEEEX-M1-C2-1927, nr. 108/09.10.2006.
2. Contract PNCD II, Ministerul Educației și Cercetării, nr. 81051/2/14.09.2007.
3. Contact PNCD II, Ministerul Educației și Cercetării, nr. 41-017/2007.
4. Proiect PN II-ID, Ministerul Educației și Cercetării, 314/nr. 660/2009.

## CAPITOLUL I

# MATERIALE POLIMERICE CU APLICAȚII ÎN INGINERIA TISULARĂ A CARTILAJULUI ARTICULAR

*” Dacă vom consulta Manuscrisele scriitorilor Chirurgi de la Hipocrate până în zilele noastre, vom găsi că, un cartilaj ulcerat este considerat a fi o boală (...); foarte supărătoare și că, atunci când este distrus, nu este niciodată recuperat.”*

*William Hunter (1718 - 1783)*

## I.1. STRUCTURA ȘI PROPRIETĂȚILE CARTILAJULUI ARTICULAR

Articulațiile sinoviale sunt structuri complexe care sunt alcătuite din mai multe tipuri de țesuturi specializate, incluzând cavitatea articulară, tendoane, meniscuri, os, membrană sinovială și cartilaj articular (Figura 1). Aceste țesuturi nu sunt inerte, având capacitatea de a se regenera parțial și asigură stabilitatea articulației în repaus și în timpul mișcărilor, amplitudinea și gradele de mobilitate ale articulației, precum și un grad scăzut de frecare la nivelul articulației.

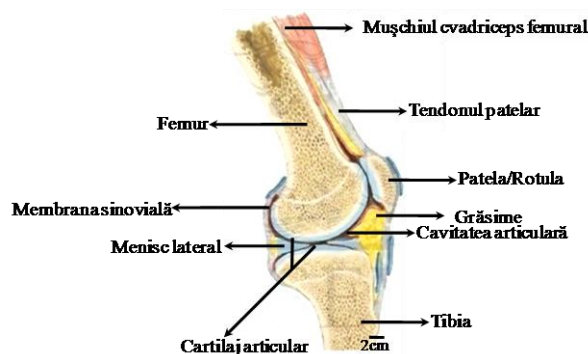


Figura 1. Articulația sinovială (secțiune sagitală a genunchiului)

Cartilajul articular este țesutul care reprezintă cheia funcțională a articulațiilor sinoviale. Acesta variază în grosime, densitate celulară și compoziție a matricei atât între diferite articulații cât și în cadrul aceleiași articulații. Oricum, toate articulațiile sinoviale conțin cartilaj articular alcătuit din aceleași componente și care îndeplinește același rol.

Proprietățile care îl fac remarcabil și unic sunt rezistența sa deosebită la deformare, rezistență mare la uzură (durabilitatea) și capacitatea de a repartiza presiunea atât pe suprafață cât și, consecutiv, pe o mai mare arie a osului subcondral.

### I.1.1. Structura cartilajului articular

Macroscopic, cartilajul articular matur apare ca un țesut neted, alb, lucios, care rezistă deformațiilor la care este supus. Grosimea cartilajului articular este de aproximativ 2-5mm, integritatea structurală a acestuia fiind menținută de condrocite. La microscopul optic (Figura 2) se evidențiază o matrice extracelulară în care se observă un singur tip de celule (condrocite) și lipsa vaselor sangvine sau a nervilor.

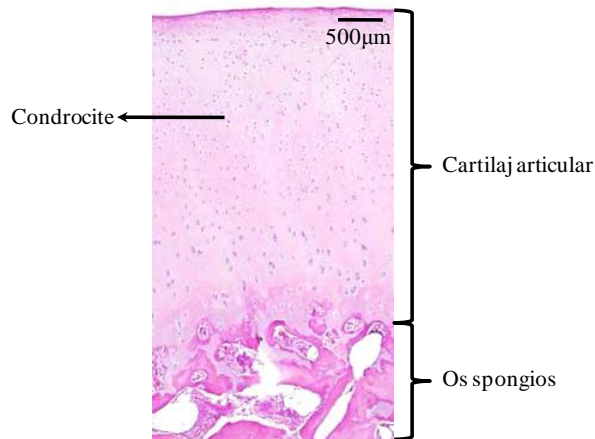


Figura 2. Secțiune histologică a cartilajului articular (microscop optic x5; colorație cu Hematoxină-Eozină) [14][15]

Comparat cu alte țesuturi (mușchi, os), cartilajul articular prezintă o activitate metabolică mai scăzută și răspunde mai lent la încărcare sau atunci când este lezat. În ciuda acestui fapt, studii recente au arătat că acest țesut prezintă o structură ordonată cu interacțiuni variate și complexe între condrocite și matricea extracelulară, care fac posibilă funcția normală a cartilajului și mențin integritatea structurii acestuia [16].

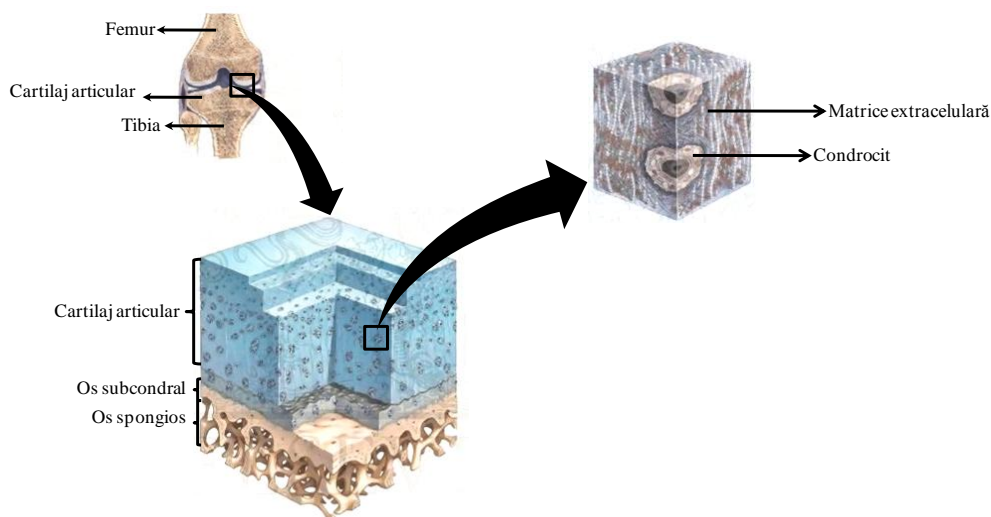
### I.1.2. Compoziția cartilajului articular

Cartilajul articular este compus din condrocite care se găsesc într-o structură organizată de colagen, proteoglicani, alte proteine, ioni și apă care formează matricea extracelulară (Figura 3).

14

15. Baran D., *Histologie generală și specială*, Ed. VIE, 2000 (Tipografia Editurii VIE) (2000), ISBN 973-85074-0-5 Vol.2., p.208.

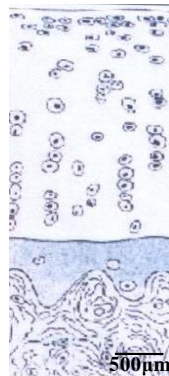
16. Buckwalter J.A., Mankin H.J., *The Articular Cartilage – part I: Tissue Design and Chondrocyte-Matrix Interactions* (An Instructional Course Lecture, The American Academy of Orthopaedic Surgeons), *Journal of Bone Joint Surgery* (1997), 79-A: 600-11.



**Figura 3. Compoziția cartilajului articular**

### I.1.2.1. Condrocitele

În structura cartilajului articular există un singur tip de celulă, și anume condrocitul. Condrocitele sunt celule mezenchimale înalt specializate care contribuie la 5% din masă și la 10% din volumul cartilajului articular. Densitatea celulară este cea mai mare în stratul profund și scade progresiv spre zona intermediară și superficială la aproximativ 1/3 din densitatea din zona profundă (Figura 4).



**Figura 4. Structura cartilajul articular (imagine de microscopie electronică)**

Condrocitele diferă în formă, mărime, în diferite zone ale cartilajului, însă toate conțin organele celulare (reticul endoplasmatic, membrane Golgi) necesare sintezei matricii. De asemenea, condrocitele conțin filamente intracitoplasmatic, lipide, glicogen și vezicule secretoare. Unele condrocite prezintă cili scurți care se extind înspre matrice, cu rolul de a recepționa modificările mecanice care se produc. Condrocitele se găsesc într-o matrice extracelulară [17] și nu intră în contact direct unele cu altele.

Condrocitele sintetizează colagen de tip II, proteoglicani și proteine specifice necolagenice care se regăsesc în matricea extracelulară (Figura 5). Condrocitele sunt foarte

17. Antonescu D.M., Pop D.M., *Elemente de patologie osteoarticulară*, Ed. Teora (2000), ISBN 9732005580, p. 7-9.

active metabolic, însă metabolismul total al țesutului cartilajinos este scăzut datorită densității mici de celule.

Condrocitele par să rămână în aceeași poziție, nemodificate pentru perioade îndelungate de timp.

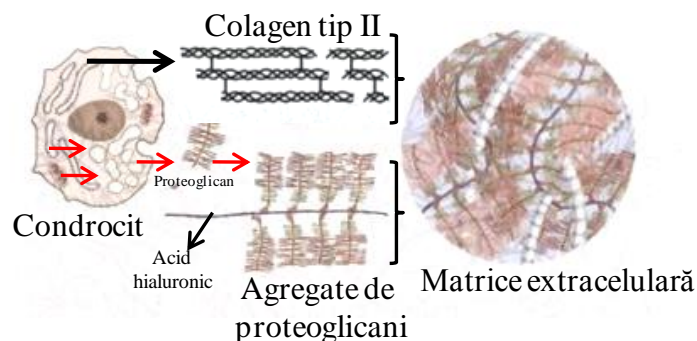


Figura 5. Schema sintezei de proteoglicani și colagen de tip II a condrocitelor

### I.1.2.2. Matricea extracelulară

Matricea cartilajului articular este alcătuită din două componente: țesutul fluid și rețele macromoleculare care dau acestui țesut formă și stabilitate. Interacțiunea dintre lichidul matriceal și macromolecule conferă cartilajului articular rezistență, duritate, elasticitate și reziliență [2, 18].

#### I.1.2.2.1. Componenta lichidă

Din masa cartilajului articular până la 80% este apă, care este distribuită neuniform (15% la suprafață și 65% în zona profundă). Interacțiunea dintre aceasta și macromoleculele matricei influențează proprietățile mecanice ale cartilajului, presiunea hidrostatică mare a țesutului, contribuind la rezistența la solicitări a acestuia. Lichidul tisular conține pe lângă apă și gaze, proteine, metaboliți și o mare cantitate de cationi pentru a contrabalansa sarcina electrică negativă a proteoglicanilor.

#### I.1.2.2.2. Macromoleculele de structură

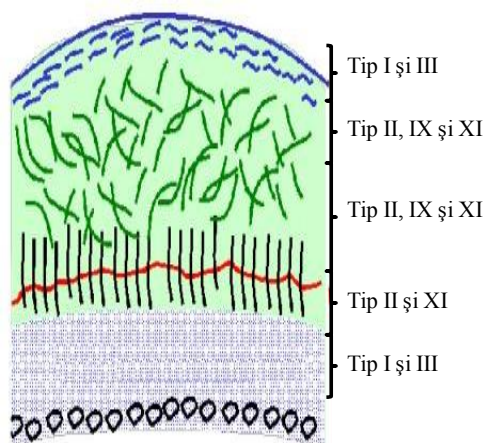
Macromoleculele din compoziția cartilajului contribuie cu 20-40% din masa țesutului. Există trei tipuri de macromolecule care diferă în concentrație în interiorul țesutului și care conferă proprietăți specifice în diferite zone ale cartilajului. Colagenul contribuie cu aproximativ 60% din greutatea uscată a cartilajului, proteoglicanii 25-35% iar proteinele necolagene și glicoproteinele 15-25%.

18. Bruckner P., Mendler M., Steinmann B., Huber S., and Winterhalter K.H., *The structure of human collagen type IX and its organization in fetal and infant cartilage fibrils*, Journal of Biological Chemistry (1988), 263:16911-16917.

Colagenul este distribuit relativ uniform în grosimea cartilajului, cu excepția stratului superficial bogat în acest tip de fibre. Rețeaua fibrilară a colagenului conferă cartilajului formă și rezistența la presiune. Proteoglicanii și proteinele necolagene leagă fibrele de colagen și rămân prinse în rețeaua acestora. Unele proteine necolagene ajută la organizarea și stabilizarea rețelei colagene, în timp ce altele au rolul de a lega condrocitele de macromoleculele matricei [2].

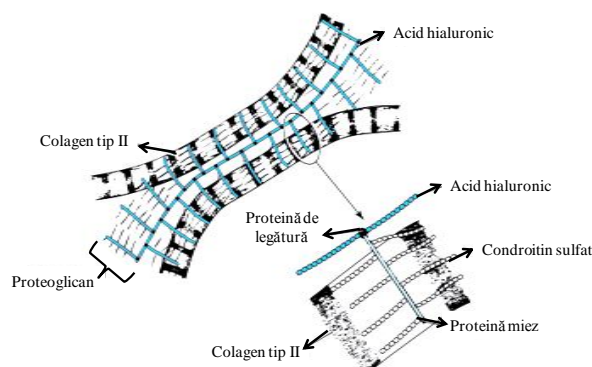
## Colagenul

Cartilajul articular conține mai multe tipuri de colagen (Figura 6), și anume tipurile: II, VI, IX, X, și XI. Tipurile II, IX și XI formează fibrile care se organizează într-o rețea ce conferă cartilajului rezistență la presiune și duritate și contribuie la coeziunea țesutului prin interacțiuni cu proteinele din proteoglicani cu masa moleculară mare.



**Figura 6. Tipuri de colagen din structura cartilajului articular**

Colagenul de tip II (Figura 7) este principalul tip din structura cartilajului articular (90-95%) și reprezintă componenta primară a rețelei de fibrile.



**Figura 7. Organizarea colagenului de tip II**

## Proteoglicanii

Proteoglicanii (PG) sunt formați dintr-un miez proteic și unul sau mai multe lanțuri de glicozaminoglicani, alcătuite la rândul lor din lanțuri lungi de polizaharide conținând molecule de dizaharide care se repetă în unitatea structurală (Figura 8).

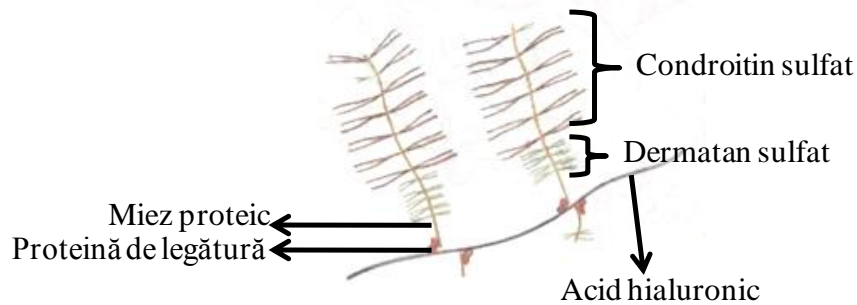
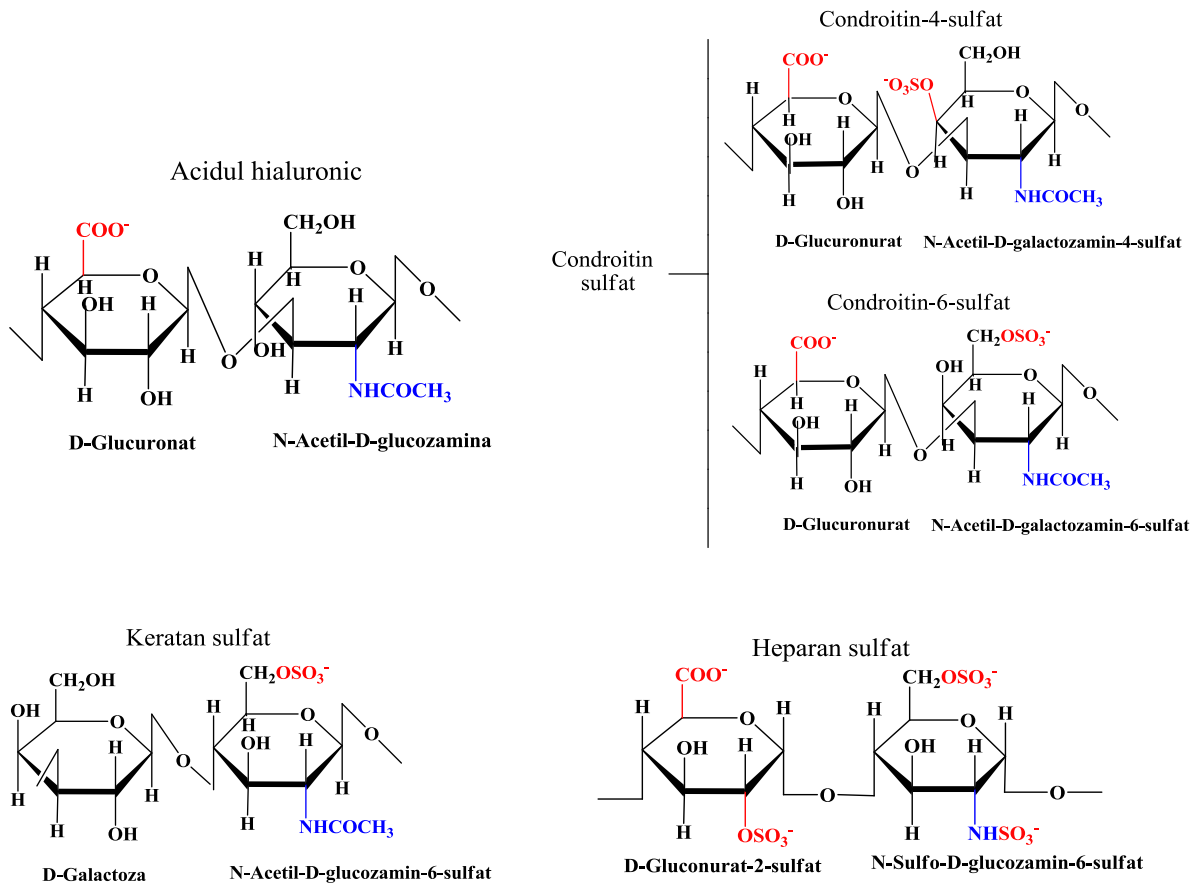


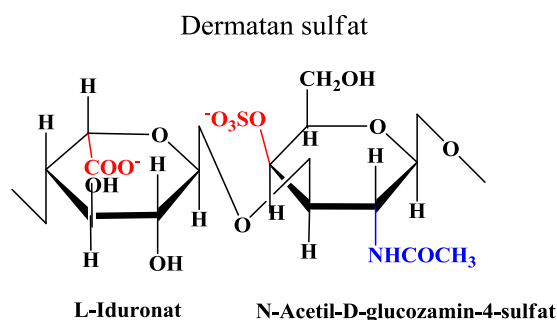
Figura 8. Structura proteoglicanilor

Fiecare unitate de dizaharide are cel puțin o grupare sulfat sau carboxilică încărcată negativ, astfel că lanțurile de glicozaminoglicani sunt încărcate negativ pe toată lungimea lor.

Glicozaminoglicanii din compoziția cartilajului articular conțin acid hialuronic, condroitin sulfat, keratan sulfat și dermatan sulfat (Figura 9). Concentrația acestor molecule variază în diferitele zone ale cartilajului articular și, de asemenea, cu vârsta sau diferite afecțiuni ale cartilajului (leziuni, boli).







**Figura 9. Structura chimică a glicozaminoglicanilor**

Cartilajul articular conține două clase majore de proteoglicani: agrecanii care sunt monomeri mari de proteoglicani agregați și proteoglicanii mici care includ decorina, biglicanul, fibromodulina și, posibil, și alți proteoglicani care nu au fost încă identificați.

Deoarece este posibil să aibă o componentă glicozaminoglicanică, colagenul de tip IX poate fi considerat un proteoglican [19].

De asemenea, integritatea structurală a cartilajului depinde de interacțiunea dintre colagen și proteoglicanii agregați. Agrecanul este proteoglicanul caracteristic cartilajului. Acesta are o masă moleculară de 250.000 daltoni și conține 90 % derivați de carbohidrați formați în principal din lanțuri de glicozaminoglicani: condroitin sulfat și keratin sulfat.

Datorită faptului că acidul hialuronic este o polizaharidă de dimensiune mare, alcătuită din acid glucuronic și N-acetilglucozamina (Figura 8), neramificată, cu o greutate moleculară de până la câteva milioane de daltoni, fiecare moleculă de acid hialuronic este capabilă de a lega un număr mare de molecule de agrecani formând agregate de până la câteva sute de milioane de daltoni. Aceste molecule mari au un schelet central de hialuronan care poate fi între câteva sute și până la zece mii de nanometri lungime.

### **Proteinele necolagene și glicoproteinele**

Rolul proteinelor necolagene și al glicoproteinelor este mai puțin cunoscut decât cel al colagenului și proteoglicanilor. Există în structura cartilajului mai multe tipuri de astfel de molecule (Figura 10). În general ele sunt alcătuite în principal din proteine și au atașate câteva mono și oligozaharide. Unele dintre aceste molecule participă la organizarea și menținerea structurii macromoleculare ale matricei. Integrina CII, o proteină de la suprafața condrocitelor ajută la ancorarea fibrelor de colagen ale matricei. Proteina oligomerică a cartilajului, o proteină cationică, este concentrată în principal în matricea pericondrocitară și pare să fie

19. Conrad J.M., Stanitski C.L., *Osteochondritis dissecans: Wilson's sign revisited*, American Journal of Sports Medicine (2003), 31:777-778.

prezentă doar în cartilaj, cu rol în ancorarea condrocitelor, putând avea valoare ca marker al turnoverului cartilajului [20].

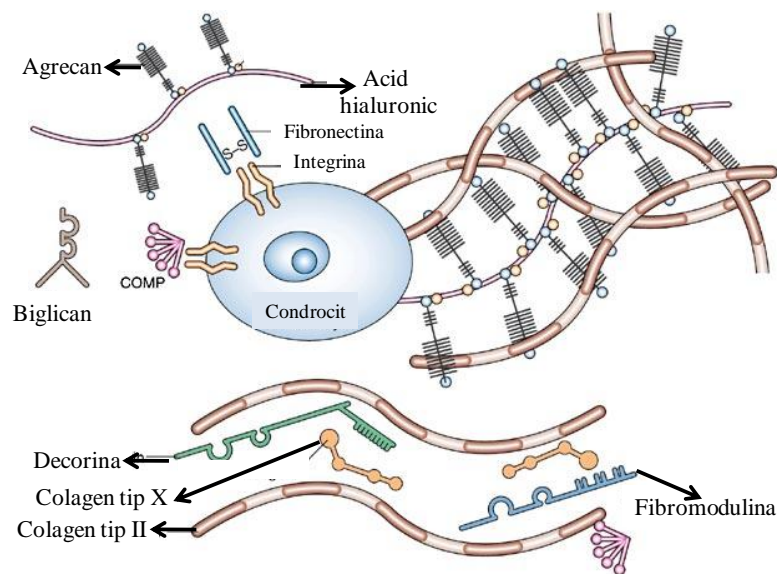


Figura 10. Organizarea proteinelor necolagenice și glicoproteinelor

Fibronectina și tenascina, proteine necolagene ale matricii, au fost identificate și în alte țesuturi. Aceste proteine par să aibă rol în organizarea matricii, interacțiunea dintre celule și matrice, și în răspunsul țesutului cartilajinos în artritele inflamatorii și osteoartroză [21]. Sinteza, cantitatea, tipul proteinelor matriciale sintetizate de către condrocite este reglată și cu ajutorul unor factori locali: citokine și factori de creștere. Citokinele pot fi definite ca molecule cu greutate moleculară mică, solubile, care afectează paracrin activitatea celulelor din vecinătate. Acest tip de molecule pot acționa asupra celulelor de origine, sau, dacă sunt eliberate în circulație, pot afecta celule la distanță, acționând ca agenți endocrini.

De asemenea, există și alte mecanisme locale de control prin care factorii de creștere produși locali sau aduși din circulație sunt incorporați în matricea mineralizată și sunt eliberați prin activitatea osteoclastelor sau a condroblastelor. O producție anormală de citokine a fost observată în poliartrita reumatoidă, osteoartrită și osteoporoză și poate fi cauza răspunsului neadecvat al condrocitelor la agresiune. Printre factorii de creștere ai cartilajului au fost identificați: factori de creștere ai insulinei (IGF): IGF-I și II; factori de creștere ai celulelor răspunzătoare de modificări fenotipice (TGF): TGFβs 1-3; factori de creștere ai fibroblastelor de tip acid sau bază (aFGF și bFGF); interleukine (IL): IL-1β; IL-6; IL-8; factori răspunzători

20. Hedbom E., Antonsson P., Hjerpe A., Aeschlimann D., Paulsson M., Rosa-Pimentel E., Sommarin Y., Wendel M., Oldberg A., and Heinegard D., *Cartilage matrix proteins. An acidic oligomeric protein (COMP) detected only in cartilage*, Journal of Biological Chemistry (1992), 267:6132-6136.

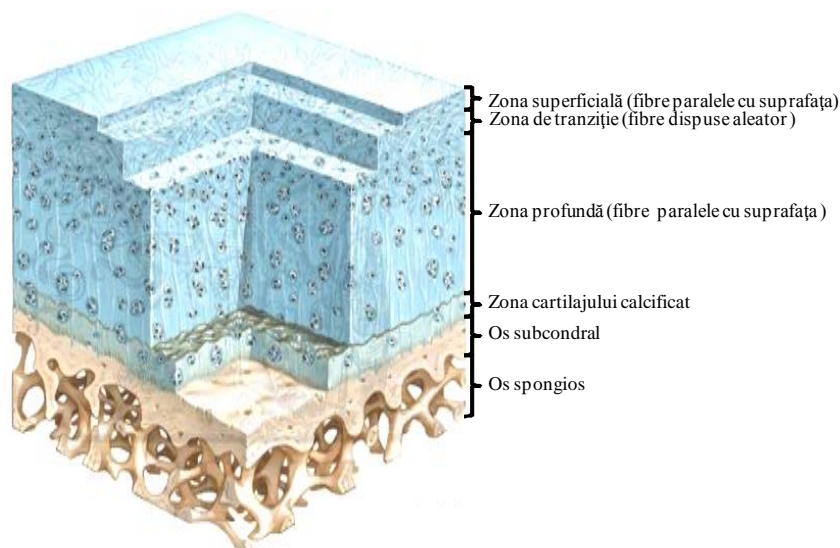
21. Hayashi T., Abe E., and Jasin H. E., *Fibronectin synthesis in superficial and deep layers of normal articular cartilage*, Arthritis and Rheumatology (1996), 39:567-573.

ai necrozei tumorale (TNF); factori de stimulare ai coloniilor (CSF): M-CSF; prostaglandine PTH-RP; etc. [22].

### I.1.3. Zonele structurale ale cartilajului articular

Condrocitele organizează colagenul, proteoglicanii și proteinele necolagene într-o structură complexă, ordonată. În structura țesutului cartilagininos morfologia condrocitelor, structura proteinelor matriceale și compoziția, contribuie la proprietățile mecanice ale matricei, care variază de la suprafață spre interior. De asemenea, compoziția și organizarea matricei variază și funcție de distanța față de condrocite.

Modificările structurale ale matricii și ale morfologiei condrocitare permit diferențierea a patru zone diferite dinspre suprafața cartilajului spre osul subcondral, zone care pe lângă modificările structurale prezintă și proprietăți mecanice diferite. Acestea sunt: zona superficială, zona de tranziție, zona radială sau profundă și zona cartilajului calcificat (Figura 11).



**Figura 11. Zonele structurale ale cartilajului articular**

Zona superficială este cea mai subțire zonă, alcătuită din două straturi. Stratul extern este alcătuit din fibrile fine de polizaharide și este acelular. Această zonă, netedă, lucioasă, identificată ca “lamina splendens”, poate fi uneori laminată de pe suprafața cartilajului. Imediat sub acest strat se găsesc condrocite de formă aplatizată, elipsoidală, aranjate cu axul mare paralel cu suprafața cartilajului [23]. Matricea are o concentrație mare de colagen și

22. Guerne P. A., Blanco F., Kaelin A., Desgeorges A., and Lotz M., *Growth factor responsiveness of human articular chondrocytes in aging and development*, *Arthritides and Rheumatology* (1995), 38:960-968.

23. Aydelotte M. B., Schumacher B.L., and Kuettner K. E., *Heterogeneity of articular chondrocytes*, *Articular Cartilage and Osteoarthritis*, Edited by K. E. Kuettner, R. Schleyerbach, J.G. Peyron, and V.C. Hascall, New York, Raven Press, (1992), 237-249.

fibronectină și o concentrație scăzută de proteoglicani comparativ cu celelalte zone ale cartilajului ; de asemenea există o cantitate mare de apă.

În zona de tranziție (intermediară) morfologia celulelor și a compoziției matricii este intermediară (de trecere) între zona superficială și cea profundă a cartilajului. De obicei această zonă are o grosime de câteva ori mai mare decât zona superficială.

Grosimea zonei profunde (radiale) este variabilă. Caracteristic acestei zone este forma și așezarea condrocitelor. Celulele au formă sferică și sunt așezate în coloane perpendiculare pe suprafața cartilajului. În această zonă se găsesc cele mai groase fibrile de colagen, cea mai mare concentrație de proteoglicani și cea mai mică cantitate de apă. Aceste particularități conferă zonei o mare rezistență la compresiune.

Zona fină de cartilaj calcificat separă zona profundă de osul subcondral. Condrocitele din această zonă sunt mai mici decât cele din zona radială, cu nucleii mari și conțin puține organite celulare. În unele regiuni aceste celule apar înconjurate complet de cartilaj calcificat ceea ce sugerează că au un metabolism foarte scăzut [24]. Această zonă este foarte accidentată, cu numeroase interdigitații, ceea ce îi conferă o considerabilă rezistență mecanică.

## I.1.4. Proprietățile cartilajului articular

Proprietățile unice mecanice și biologice ale cartilajului articular depind de structura țesutului și de interacțiunile dintre condrocite și matricea cartilaginoasă. Condrocitele formează rețeaua proteică ce asigură integritatea structurală a matricii și prin aceasta a cartilajului. Colagenul de tip II, IX și XI formează o rețea care conferă forma, rigiditatea și rezistența la solicitare mecanică a cartilajului. Agrecanii contribuie la rezistența țesutului și la asigurarea integrității structurale a acestuia alături de moleculele mici de proteoglicani prin legarea proteinelor matricii, ajutând la stabilizarea acesteia. De asemenea, aceste molecule influențează la rândul lor activitatea condrocitelor și prin legarea citokinelor.

Matricea protejează condrocitele de agresiune în timpul utilizării normale a articulației, determină tipul și concentrația moleculelor care ajung la celule și ajută la menținerea fenotipului celulelor.

Țesutul cartilaginos este supus unei remodelări continue în cursul vieții datorită condrocitelor care înlocuiesc macromoleculele matriceale degradate. Turnoverul matricii

24. Gigante A., Bevilacqua C., Ricevuto A., Mattioli-Belmonte Monica, Francesco Greco, *Membrane-seeded autologous chondrocytes: cell viability and characterization at surgery*, Knee Surgery and Sports Traumatology Arthroscopy (2007), 15:88–92.

depinde de abilitatea condrocitelor de a detecta modificări în compoziția macromoleculilor matriceale, a macromoleculilor degradate și de a răspunde la sinteza tipului și cantității adecvate de proteine.

Matricea funcționează ca un traductor pentru condrocite. Încărcarea cartilajului datorită solicitărilor mecanice ale articulației creează stimuli mecanici, electrici și chimici care influențează direct activitatea de sinteză a condrocitelor.

Creșterea solicitării funcționale a articulației produce un răspuns din partea condrocitelor în sensul creșterii anabolismului, care se manifestă prin remodelarea internă și creșterea în volum a țesutului. O suprasolicitare de durată a articulației generează alterări în compoziția matricii cu o eventuală pierdere a integrității structurale și mecanice a acesteia. De asemenea, vârsta aduce alterări în activitatea metabolică a condrocitelor și deci, și în compoziția matricii, determinând un răspuns inadecvat a țesutului la solicitare, ceea ce crește posibilitatea degenerării cartilajului [25].

### **I.1.4.1. Proprietățile biologice**

#### **I.1.4.1.1. Mecanismul de compensare al uzurii**

În cursul vieții, cartilajul articular sănătos își pierde din grosime dar își păstrează structura fibrilară. Aceasta este posibil datorită metabolismului său foarte activ care reconstruiește structura fibrilară ori de câte ori aceasta este deteriorată. Deteriorarea suprafeței cartilajului articular distruge integritatea arcelor colagenice care se află pe această suprafață. Dacă această distrucție nu este stopată (cazul cartilajului artrozic), ea se va propaga rapid în profunzimea cartilajului. În cartilajul sănătos, celulele cartilagineoase sintetizează noi fibre de colagen care sunt dirijate de efectele fizico-chimice de difuziune spre regiunile distruse unde vor reconstrui structura arcelor fibrilare de colagen (Figura 12).

---

25. Dorotka R., Bindreiter U., Macfelda K., Windberger U., Nehrer S., *Marrow Stimulation and Chondrocyte Transplantation Using a Collagen Matrix for Cartilage Repair*, Osteoarthritis and Cartilage (2005), 13:655-664.

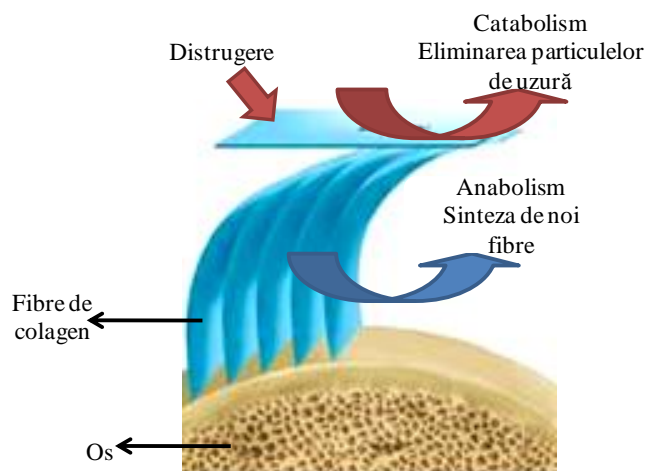


Figura 12. Metabolismul fibrelor de collagen

### I.1.4.1.2. Mecanismul remodelării osoase

Presiunea mecanică transmisă de mișcările articulare în zona de contact os, cartilaj reglează procesele de remodelare osoasă, care modifică proprietățile cartilajului articular. Aceste procese sunt caracterizate de un echilibru între formarea țesutului osos (osteogeneză este osificarea cartilajului) și distrucția țesutului osos (osteoliză). Acest proces este activ toată viața dar dezvoltarea începe în perioada embrionară când țesutul cartilagin (modelul de os embrionar) este transformat în țesut osos. Această transformare este legată de invazia capilarelor sangvine în țesutul cartilagin (proces de osificare).

Osificarea este stopată la nivel articular în zona de echilibru dintre presiunea mecanică datorată mișcărilor articulare, și presiunea de perfuzie a capilarelor sangvine. Această zonă de echilibru a presiunilor marchează zona de contact între os și cartilaj articular, și devine zona de remodelare osoasă. Ea este specifică pentru fiecare persoană în parte și evoluează în cursul vieții în funcție de intensitatea efortului mecanic transmis articulației (condiția fizică a fiecărui individ). Astfel, lipsa mișcării diminuează grosimea cartilajului articular favorizând procesele de osteogeneză care crește rigiditatea cartilajului articular și-l transformă, încet-încet în țesut osos. Dinpotrivă, eforturile fizice susținute cresc grosimea cartilajului și stimulează sinteza de PG diminuând rigiditatea cartilajului articular.

### I.1.4.2. Proprietățile fizico-chimice

Proprietățile fizico-chimice ale cartilajului sunt legate de prezența ansamblurilor glucidice (ansamblurilor PG), care, în mediul apos sunt poli-anionice: macromoleculele PG sunt încărcate negativ datorită grupelor ionice carboxilice și sulfat. Prezența acestor grupe negative generează forțe de repulsie între lanțurile moleculare de PG. Lanțurile moleculare

PG se îndepărtează, creând astfel porozități de ordinul câtorva nanometrii în diametru, și atrag în interiorul cartilajului ioni pozitivi de calciu și sodiu (efect osmotic).

Efectul fizico-chimic este datorat forțelor electrostatice care se opun diminuării diametrului porilor datorată deformării mecanice, și tind să păstreze apa și ionii pozitivi în interiorul cartilajului după descărcare.

Acest efect fizico-chimic este indispensabil vieții cartilajului; el asigură transportul nutrienților dizolvați în apă. Este caracterizat de doi parametri: presiunea osmotică ( $\pi$ ) și potențialul electrocinetic ( $\psi$ ).

Valoarea presiunii osmotice este cuprinsă între 0,1 și 0,2MPa. Potențialul electrocinetic molecular generează o diferență de potențial electric între cele două fețe ale cartilajului articular supus unei diferențe de presiune. Diferența de presiune generează o migrare a fazei fluide care antrenează un flux de sarcini electrice și perturbă echilibrul potențialului la scară moleculară. Literatura de specialitate indică o diferență de potențial de aproximativ 0,03V pentru o diferență de presiune de 0,05 MPa [26].

### I.1.4.3. Proprietățile biomecanice

#### I.1.4.3.1. Rezistența la compresiune

Într-un mediu apos, proteoglicanii se comportă ca niște polianioni, adică, au sarcini negative care provin de la grupările sale de sulfat și carboxil. În soluție, repulsia reciprocă a acestor sarcini negative face ca această moleculă să se destindă și să ocupe un volum mare.

Însă, în matricea cartilajului articular, volumul ocupat va fi limitat de către fibrele de collagen (Figura 13).

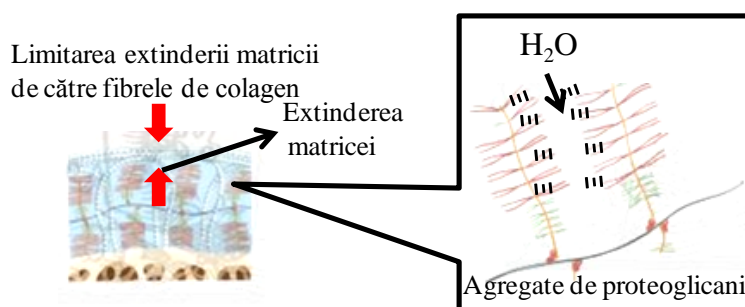


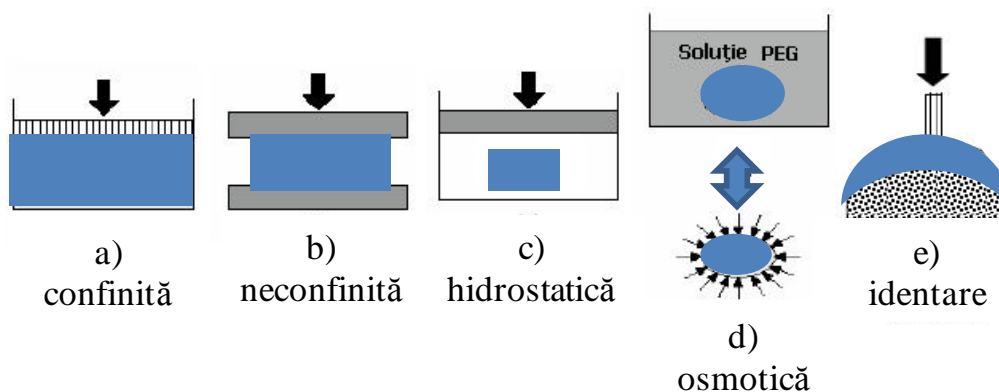
Figura 13. Schema comportării într-un mediu lichid al cartilajului articular

Proprietățile de compresiune ale cartilajului au fost examinate folosindu-se ca tehnici identarea, comprimare confinită sau neconfinită. Tehnicile de identarea au permis testarea în vivo, fără a necesita pregătiri speciale ale speciimenelor de cartilaj.

26. Mow C. Van, Rarcliffe Anthony, *Structure and Function of Articular Cartilage and Meniscus*, Ch 4. in : Basic orthopaedic biomechanics, Philadelphia : Lippincott-Raven publishers (1997), p. 113-179.

Literatura de specialitate relatează doar cinci tipuri de experimente de compresiune *in vitro* ale cartilajului (Figura 14):

- Compresiunea confinită: cartilajul nu se deformează liber, el este confinit într-un volum care lasă să filtreze doar faza lichidă prin intermediul unei plăci poroase (Figura 14a);
- Compresiunea non-confinită: cartilajul se poate deforma liber, faza lichidă poate să exudeze liber din volumul cartilajului (Figura 14b) ;
- Compresiunea hidrostatică: cartilajul articular este imersat într-un fluid prin intermediul căruia se aplică o presiune hidrostatică (Figura 14c) ;
- Compresiunea chimică, osmotică: cartilajul este imersat într-o soluție macromoleculară foarte concentrată (de obicei de natura polimerică, soluție de polietilen glicol -PEG) care generează o compresiune prin efect osmotic (Figura 14d) ;
- Compresiune prin indentare: încărcătura este aplicată pe un mic sector de cartilaj prin intermediul unui mediu poros. Avantajul acestui tip de compresiune este dat de faptul că nu mai e necesară separarea cartilajului de os (Figura 14e).



**Figura 14. Diferite tipuri de experimente de compresiune pentru cartilajul articular**

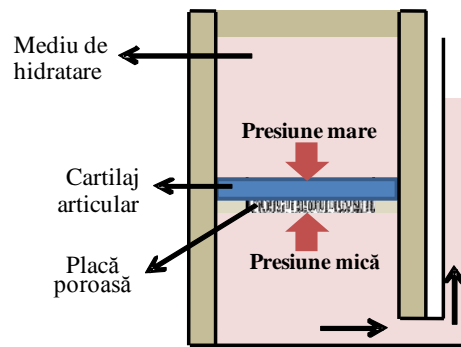
Metoda experimentală cea mai utilizată, și care constituie referința, este metoda compresiunii confinite. Un eșantion de cartilaj cilindric este susținut de o placă poroasă într-o cameră umplută cu fluid (Figura 15). O diferență de presiune este aplicată între extremitățile eșantionului. Sunt prezentate două metode de a realiza aceste experimente [27]:

- Modul fluaaj, în care o greutate constantă este aplicată cartilajului prin placa poroasă, și variația de grosime a țesutului este măsurată în funcție de timp;

27. Boschetti F., Pennati G., Gervaso F., M. Peretti G.M. and Dubini G., *Biomechanical properties of human articular cartilage under compressive loads*, *Biorheology* 41 (2004) 159–166.



- Modul relaxare, în care o deformare este impusă țesutului, și este măsurat efortul necesar pentru menținerea acesteia.



**Figura 15. Reprezentarea schematică a unui dispozitiv de compresiune confinită care măsoară permeabilitatea cartilajului**

Aceste experimente au permis punerea în evidență a două faze: una solidă și alta fluidă, care conferă cartilajului articular comportamentul în compresiune, similară celui poros. Structura poroasă permite fazei fluide să traverseze cartilajul, cu o viteză proporțională cu gradientul de presiune (constanta de proporționalitate fiind permeabilitatea cartilajului).

Figura 16 arată rezultatele unui experiment de compresiune, în mod fluaj. Remarcăm că deformarea inițială a cartilajului este analizată în funcție de timp, pentru că fluidul nu poate să iasă instantaneu din matrice. La începutul experimentului, deformarea este rapidă și liniară, cu un debit curgere a fluidului este mare, în afara cartilajului. Apoi debitul cartilajului se diminuează, și deformarea atinge o valoare de echilibru, pentru care fluxul extern este nul ( $t_0$ ).

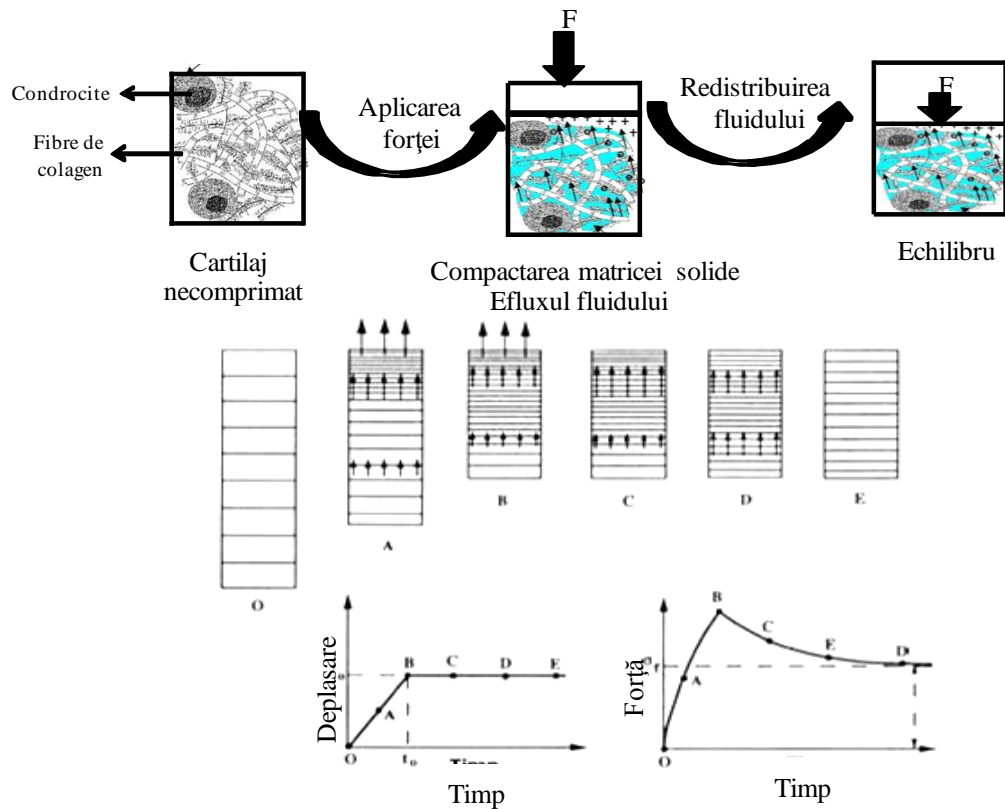


Figura 16. Comportamentul compresiv al cartilajului în cursul fluajului:

**A:** faza compresiunii lineare în timp,

**B:** începutul fazei deformării constante,

**C, D și E:** faza de relaxare

Presiunea din cartilaj supus la fluaj prezintă două faze:

- o fază de compresiune în care presiunea crește până la maxim care corespunde momentului când deformarea devine constantă (Figura 16, punctul B),
- faza de relaxare când presiunea se diminuează sub formă asimptotică spre o valoare de echilibru nenulă.

Faza de compresiune corespunde exudării fluidului la suprafața eșantionului, astfel încât relaxarea corespunde unei redistribuții a fluidului în profunzimea eșantionului. Valoarea crescută a presiunii la începutul fazei de relaxare (punctul B din Figura 16) este explicată prin acumularea presiunilor în faza fluidă, care nu a avut timp să exudeze.

Aceste încercări permit determinarea a două proprietăți globale ale cartilajului: permeabilitatea și modulul de compresiune.

Permeabilitatea reprezintă rezistența întâlnită de fluid pentru a traversa matricea cartilajului. Ea poate fi calculată prin legea Darcy (relația 1):

$$Q \text{ este } kA\Delta P/h \quad (1)$$

unde: Q, reprezintă debitul volumetric de fluid;

k, reprezintă permeabilitatea;

A, reprezintă aria eșantionului de cartilaj;

$\Delta P$ , reprezintă variația de presiune;

h, reprezintă grosimea cartilajului.

În consecință, materialul poate fi analizat din punct de vedere biomecanic ca un material poroelastic. Studiile realizate în această direcție au considerat două abordări: o abordare prin prisma analizei în element finit (FE) și o abordare analitică, cunoscută sub numele de teoria "bifazică", dezvoltată de Mow și colab. [28].

Teoria analitică s-a dovedit a fi deosebit de utilă pentru prezicerea comportării la presiuni foarte mari, în cazul cartilajului și a altor țesuturi moi. Acesta a fost ulterior extinsă la teoria "trifazică" [29], prin luarea în considerare a efectele date de ionii încărcăți, precum  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  și molecule de proteoglicani care sunt încărcate negativ. Teoria este în esență, una termodinamică ce combină ecuațiile standard de mișcare cu cerințele de compatibilitate de fază și neutralitate.

### I.1.4.3.2. Rezistența la forfecare

Studiile de torsiune făcute cu bucăți cilindrice de cartilaj articular arată un comportament vâscoelastic a țesutului. Ele dau, în funcție de profunzimea stratului testat, un modul de forfecare global între 0,3 și 3 MPa și un unghi de defazare între componentele elastice și cele vâscoase de  $9^\circ$  până la  $20^\circ$ .

Aceste experimente au pus în evidență faptul că, atunci când cartilajul este deformat datorită forfecării, nu există exudarea fazei fluide (Figura 17). Comparația între acest rezultat a proprietăților unei soluții de proteoglicani cu o concentrație echivalentă cu cea a matricei extracelulare demonstrează că proteoglicanii nu joacă un rol important în rezistența cartilajului la forfecare [30].

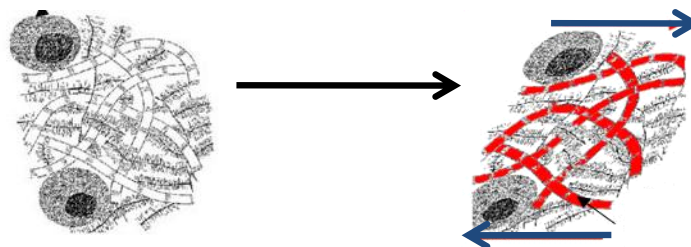


Figura 17. Comportamentul la forfecare al cartilajului articular

28. Mow V.C., Roth V., Armstrong C.G., *Biomechanics of joint cartilage*, in Basic Biomechanics of the Locomotor System, Eds. M.Nordin and V. Frankel (1980), Lea & Febiger, Philadelphia, p. 61-86.

29. Lai W.M., Hou J. S., Mow V.C., *A triphasic theory for the swelling and deformation behaviours of articular cartilage*, Journal of Biomechanical Engineering (1991), 113:245-258.

30. Laasanen M.S., Töyräs J., Korhonen R.K., Rieppo J., Saarakkala S., Nieminen M.T., Hirvonen J., J.S. Jurvelin J.S., *Biomechanical properties of knee articular cartilage*, Biorheology (2003), 40: 133-140.

### I.1.4.3. Rezistența la tracțiune

Studiile în ceea ce privește tracțiunea, prezente în literatură, arată că rezistența la tracțiune a cartilajului articular este legată de prezența fibrelor de colagen. Astfel, curbele efort/deformare prezintă inițial o porțiune care corespunde reorientărilor fibrelor după axa de tracțiune, apoi fibrele se deformează în regim elastic linear până ce se rup (Figura 18).

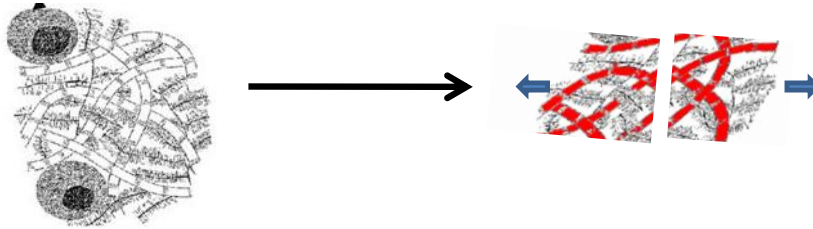


Figura 18. Comportamentul la tracțiune al cartilajului articular

Structura fibrilară a cartilajului variază în funcție de profunzimea prelevării eșantionului. În consecință, rezistența sa la tracțiune se diminuează cu profunzimea stratului cartilagos testat. Plecând de la aceste rezultate, mai mulți autori consideră cartilajul articular ca un material multistrat elastic, având modulul lui Young variind de la 5 MPa (pentru straturile situate în profunzime) până la 30 MPa (pentru straturile situate la suprafață) [31].

### I.1.4.3.4. Rezistența la fisurare

În încercările experimentale se studiază fisurarea produsă la suprafața articulară cartilaginoasă prin căderea unor bile de trei mărimi diferite: diametru de 2, 4, și 8 mm, arătând că formarea fisurilor poate fi corelată cu forța de forfecare.

Alți cercetători au studiat mai ales fisurarea la interfața cartilaj/os [32]. Sub acțiunea forțelor normale de impact, cartilajul prezintă o deplasare laterală relativ mare datorată coeficientului Poisson ridicat. Această expansiune este rezervată osului subdiacent, mai rigid, care cauzează un efort de forfecare ridicat la interfața os/cartilaj. În aceste condiții, fisurile se dezvoltă la limita cartilaj/os.

Comportamentul mecanic global al cartilajului articular rezultă deci din interacțiunile fizico-chimice și biologice impuse de structura sa „gel-fibre-celule”. Gelul conferă proprietățile fizico-chimice prin care cartilajul articular este capabil să atragă și să rețină apa și ionii pozitivi. Fibrele reglează reținerea apei în cartilajul articular și îi conferă rezistența mecanică.

31. Nordin M. and Frankel H., *Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System*, Third Edition, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins (1989), p.467.

32. Purcell C., Lewis J.L., *Fracture of articular cartilage*, Journal of Biomechanical Engineering (1996), 118: 545–556.

#### **I.1.4.4. Lubrifierea cartilajului articular**

Modul predominant de lubrifiere a cartilajului articular în timpul mișcărilor articulației este de tip elastohidrodinamic. Aceasta se realizează atunci când presiunea transmisă prin pelicula de lichid sinovial deformează suprafața cartilajului, crescând astfel mărimea suprafeței și reducând exudarea lichidului sinovial dintre suprafețele articulare în timpul alunecării acestora. Alte căi de lubrifiere sunt:

- lubrifierea marginală (de graniță) în care o glicoproteină împiedică contactul direct dintre suprafețele articulare;
- lubrifierea prin presiune, în care solventul din lubrifianț pătrunde în cartilajul articular lăsând astfel complexii de acid hialuronic să acționeze ca lubrifianț;
- lubrifierea prin umezire, care exprimă capacitatea cartilajului de a adsorbi sau exuda lichid în timpul mișcării suprafețelor articulare una față de cealaltă, realizând astfel o autolubrifiere.

Eficiența acestor procese face ca uzura cartilajului, prin încărcare în articulațiile sinoviale, să fie minimă.

#### **I.1.4.5. Nutriția condrocitelor**

Deoarece cartilajul articular este avascular, atât oxigenarea cât și nutriția condrocitelor se face din lichidul sinovial prin difuziune. Presiunea oxigenului în cartilaj este de 1-3% vol comparativ cu 21% vol în atmosfera normală. Energia necesară condrocitelor este produsă în principal prin glicoliză, proces în care glucoza este metabolizată în condiții de anabolism în lactat. Nutrienții trebuie să străbată două straturi de difuziune: dinspre sinovie spre lichidul sinovial și apoi dinspre lichidul sinovial spre matricea cartilaginoasă, pâna la nivelul condrocitului.

Datorită faptului că matricea cartilaginoasă este restrictivă, condrocitele trăiesc într-o concentrație de oxigen scăzută față de alte țesuturi, ceea ce face ca predominant să depindă de un metabolism anaerob. Nutriția condrocitelor este favorizată de mișcarea lichidului sinovial, în timpul mișcării articulației.

Este pe deplin acceptat faptul că nutriția condrocitelor este facilitată de compresia și relaxarea cartilajului în timpul solicitărilor mecanice, în strânsă legătură cu mișcarea apei la

nivelul țesutului, însă nutriția condrocitelor din straturile profunde pare a fi realizată și prin capilarele de la nivelul osului subcondral [33].

Sintetizând datele din literatura de specialitate se poate spune că proprietățile mecanice unice ale cartilajului ca suprafață portantă rezultă atât din proprietățile sale structurale cât și din compoziția chimică a matricei extracelulare (Figura 19).

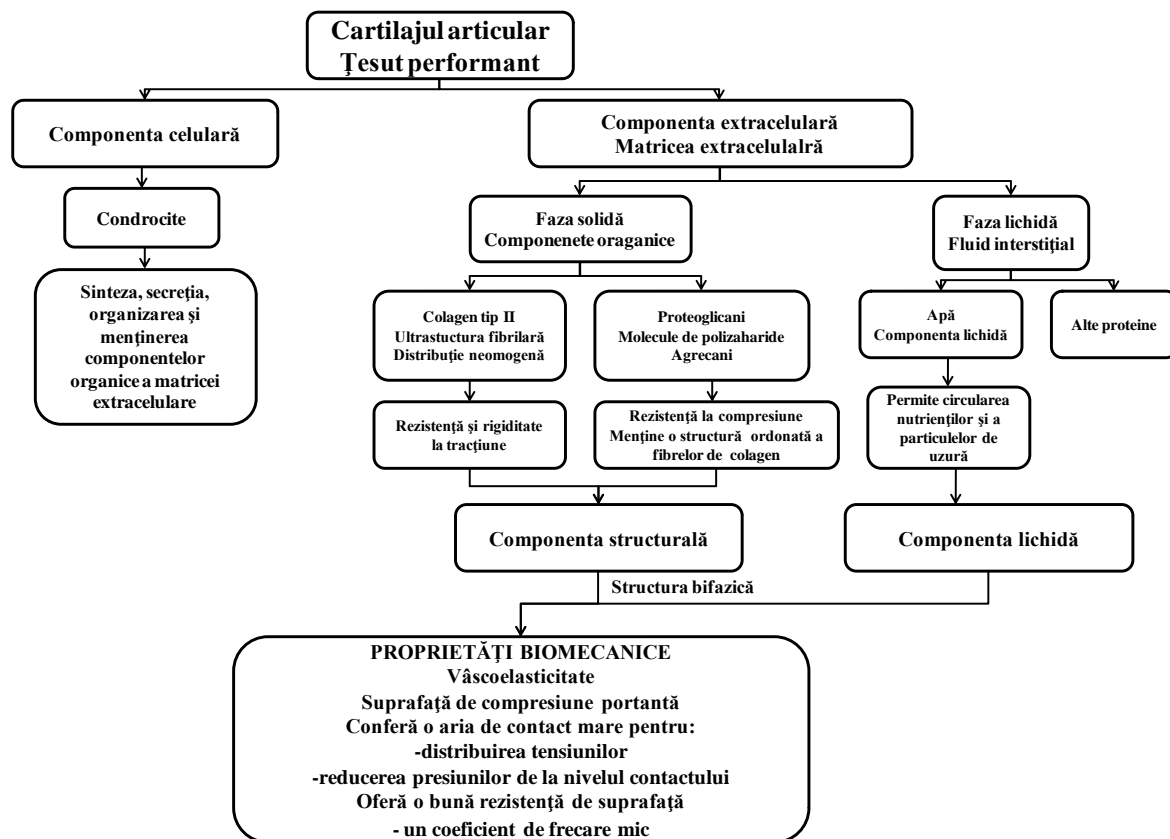


Figura 19 Relațiile dintre structura și proprietățile cartilajului articular

Aceste proprietăți au fost obiectul multor experimente [34, 35, 36, 37, 38, 39, 40] și care permit stabilirea unei plaje a valorilor acestor trei principali parametri care caracterizează comportamentul mecanic global al cartilajului articular:

33. Bachrach N.M., Valhmu W.B., Stazzone E., et al, *Changes in proteoglycan synthesis of chondrocytes in articular cartilage are associated with the time-dependent changes in their mechanical environment*, Journal of Biomechanics (1995), 28: 1561–1569.
34. Berthier Y., *Systèmes tribologiques, Chapitre 1. in Matériaux et contacts : une approche tribologique*, Paris, G. Zambelli et L. Vincent Presses Polytechniques et Universitaires Romandes (1998), p.4-12.
35. Osborne A.C., Lamb K.J., Lewthwaite J.C., et al., *Short-term rigid and fleccid paralyses diminish growth of embryonic chick limbs and abrogate joint cavity formation but differentially preserve pre-cavitated joints*, Journal of Musculoskeletal Neuron Interactions (2002), vol 2, 5: 448-456.
36. Mikic B., Johnson T.L., Chhabra A.B. et al., *Differential effects of embryonic immobilization on the development of fibrocartilaginous skeletal elements*, Journal of Rehabilitation Research and Development (2000) vol. 37, 2:30-37.
37. Hall K. B., *Cartilage*, Volume 1: Structure, Function and Biochemistry, London: Academic Press (1983), p.385.

- **Modulul de elasticitate global** (0,5-1 MPa) măsurat în urma experimentelor de compresiune după stabilizarea migrației de apă și ioni în matricea cartilaginoasă,
- **Coefficientul Poisson.** Cartilajul este un material compus dintr-o fază solidă și o fază fluidă. Cele două faze, studiate separat, sunt considerate a fi incompresibile ceea ce implică coeficienți Poisson apropiați de valoarea 0,5. În plus, migrația fazei fluide în afara cartilajului în urma solicitărilor mecanice reduc coeficientul Poisson la 0,2, dar, această valoare depinde de permeabilitatea cartilajului care poate fi modificată de către ansamblurile moleculare ale sinoviei.
- **Permeabilitatea.** Valorile permeabilității sunt cuprinse între 10-16 m<sup>4</sup>/N.s și 10-15 m<sup>4</sup>/N.s, pentru o grosime de 1mm de cartilaj supus la o diferență de presiune hidrostatică de 2MPa. Această permeabilitate pare mică pentru un material ca și cartilajul, care are 80% apă. Aceasta se poate explica prin faptul că această permeabilitate este dată de efectele fizico-chimice (osmotice și electrice) și nu efectele mecanice (poro-elasticitate).

## I.2. Patologia cartilajului articular: metode curente de tratament

Degenerarea cartilajului articular cu pierderea structurii și funcționalității acestuia precum și modificările articulației sinoviale care decurg din aceasta generează durere și pierderea funcției normale a articulației. Durerea și scăderea mobilității articulare sunt printre cauzele cele mai frecvente de morbiditate a populației adulte și vârstnice.

De foarte multe ori, degenerarea cartilajului articular se manifestă ca urmare a uzurii, aparent fără a fi precedată de vreun proces patologic (osteoartroză primară), dar poate fi și ca urmare a traumatismelor sau a bolilor reumatismale inflamatorii care distrug suprafața articulară, generând osteoartroza secundară.

Reacția de reparare și regenerare după degradarea post traumatică sau degenerarea cartilajului articular matur este minimă, țesutul cartilagos neavând capacitatea de a repara prin "restitutio ad integrum" alterările structurale odată apărute. Aceste observații au condus la considerarea cartilajului articular ca fiind un țesut inert cu rezistență la tensiune, similar cu

38. Antonescu D., Buga M., Constantinescu I., Iliescu N., *Metode de calcul și tehnici experimentale de analiza tensiunilor în biomecanică*, București : Editura Tehnică (1986), p. 256.

39. Mow C.V., Ratcliffe A., *Structure and Function of Articular Cartilage and Meniscus*, Ch 4. in: Basic orthopaedic biomechanics, Philadelphia :Lippincott-Raven publishers (1997), p. 113-179.

40. Liao J.J., Hu C.C., Cheng C.K., and all., *The influence of inserting a Fuji pressure sensitive film between the tibiofemoral joint of the knee prosthesis on the actual contact characteristics*, Clinical Biomechanics (2001), Vol. 16, 2: 160-166.

polietilena și metalele, și că degenerarea cartilajului apărută odată cu vârsta este rezultatul încărcării mecanice a acestuia cu pierderea ireversibilă a integrității structurale și a proprietăților mecanice ale acestuia.

În consecință, pentru a preveni degradarea cartilajului nu se poate face aproape nimic în afară de a limita încărcarea mecanică a acestuia, și deci, cel mai adecvat tratament pentru degradarea avansată a cartilajului este artroplastia cu înlocuirea suprafețelor articulare degradate. Un alt punct de vedere față de cel prezentat mai sus este acela că, țesutul cartilaginos nefiind inert, este capabil într-o oarecare măsură de reparare și regenerare, astfel încât încărcarea articulară nu va duce inevitabil la artroza, și deci, există posibilitatea efectuării unui tratament care să restaureze cel puțin parțial și în anumite cazuri integritatea cartilajului articular [41].

Numeroase studii au fost efectuate pentru a înțelege mai bine procesele care duc la degradarea cartilajului cu alterarea compoziției și structurii, și prin urmare cu pierderea funcției țesutului, și relația cu osteoartroza, precum și procesele care țin de repararea și regenerarea cartilajului cu restabilirea funcției acestuia [42].

## I.2.1. Răspunsul cartilajului articular la agresiune

Cartilajul articular suferă procese de degradare ca urmare a agresiunii a numeroși factori: mecanici, metabolici, vasculari, genetici. Agresiunea mecanică poate fi urmarea unui singur traumatism de intensitate mare sau a unor încărcări excesive repetate și prelungite ale articulației. Aceste traume ale cartilajului produc trei tipuri de leziuni: microleziuni ale condrocitelor și matricii fără leziuni vizibile ale suprafeței cartilajului, fracturi condrale cu lezarea pe diferite adâncimi a cartilajului până la zona de cartilaj calcificat și fracturi osteocondrale care se extind până în osul subcondral. Fiecare dintre aceste tipuri de leziuni prezintă o evoluție și un tip de reparare particular. De asemenea, alți factori importanți pentru procesul de reparare a leziunilor cartilajului articular sunt mărimea suprafeței leziunii, locul acesteia, prezența leziunilor “în oglindă”, modificarea axelor mecanice ale membrului, și factori generali ca vârsta, greutatea, nivelul de activitate.

### I.2.1.1. Microleziunea

Lezarea condrocitelor și a matricii cartilaginoase datorate unei traume puternice sau unor traumatisme repetate de intensitate mai mică nu produce inițial leziuni macroscopice.

41. **Hunziker E.B., and Rosenberg L.C.**, *Repair of Partial-Thickness Defects in Articular Cartilage*, The Journal of Bone and Joint Surgery (1996), 78: 721-33.

42. Camps C., Passuti N., Guillo S., *Reparation spontanee du cartilage*, *Annales 1999 de la SFA - Conférences d'enseignement de la Societe Francaise d'Arthroscopie*.



Leziunea caracteristică este microfractura unei regiuni a matricii. Unul dintre procesele inițiale este reprezentat de moartea programată a condrocitelor (apoptoză).

Stresul prelungit la nivelul cartilajului poate afecta zona cartilajului calcificat și osul subcondral ceea ce duce la modificarea grosimii acestor zone cu îngustarea cartilajului, modificări observate în artroză.

### **I.2.1.2. Fractura condrală**

O fractură condrală este o leziune macroscopică a cartilajului care este limitată în întregime la cartilaj și nu ajunge la nivelul osului subcondral. În consecință, nu există o lezare a sistemului vascular (capilar) ceea ce determină lipsa unei reacții inflamatorii de reparare. La fel ca alte celule bine diferențiate, și condrocitele prezintă o capacitate limitată de proliferare și regenerare. Mai mult, spre deosebire de țesutul adipos sau muscular, țesutul cartilaginos nu conține celule mezenchimale stem nediferențiate care să genereze un proces de reparare local.

La fel ca în cazul leziunii precedente, și acest tip de leziune condrală generează rapid moartea condrocitelor în regiunea lezată, atât prin apoptoză cât și prin necroză. Alte celule integre din regiune inițiază un răspuns proliferativ de reparare a țesutului.

Deși colagenul de tip II și macromoleculele de sinteză ale matricii sunt crescute la nivelul condrocitelor supraviețuitoare care proliferază și formează clustere la periferia zonei lezate, această activitate mitotică și metabolică crescută este de scurtă durată după care metabolismul tisular revine la valori bazale. Condrocitele proliferate nu migrează în defect și breșa condrală nu se închide.

### **I.2.1.3. Fractura osteocondrală**

Cea mai importantă leziune a cartilajului articular este reprezentată de fractura osteocondrală, care este caracterizată prin extinderea leziunii de la nivelul cartilajului la nivelul osului subcondral și chiar dincolo, în osul spongios subdiacent. Penetrarea osului subcondral generează o reacție inflamatorie de reparare similară cu cea observată în țesuturile vascularizate. Imediat după producerea leziunii se formează un hematom. Ulterior acesta se organizează într-o rețea de fibrină și se transformă într-un țesut fibrovascular de reparație [43]. Celulele stem mezenchimale originare din osul subcondral proliferază și se diferențiază în condrocite sub influența factorilor locali. În următoarele săptămâni țesutul nou format conține un număr mare de condrocite care sintetizează colagen de tip II și proteoglicani care vor organiza matricea țesutului. Celulele din straturile profunde ale defectului vor realiza un

---

43. Yoo J.C., Ahn J.H., Lee S.H., Kim J.H., *Suturing Complete Radial Tears of the Lateral Meniscus*, *Arthroscopy* (2007), 23: 1249.

proces de osificare endocondrală care vor repara defectul osos. Cu toate acestea, țesutul cartilaginos de reparație nu reconstituie structura cartilajului articular normal hialin, astfel încât se produce o degradare a matricii cartilaginoase care va cuprinde un procent mai mare de colagen de tip I, caracteristic fibrocartilajului, celulele având aspectul de fibroblaști.

Modificările degenerative debutează cu fibrilare superficială, urmată de pierderea proteoglicanilor matricii, pierderea de condrocite și cu apariția de fisuri la nivelul suprafeței cartilajului, care progresează, dezintegrând adesea țesutul nou format și dezvelind osul subcondral [29].

## **I.2.2. Tratamentul leziunilor cartilajului articular**

### **I.2.2.1. Tratamentul medicamentos al leziunilor cartilajului articular**

#### **I.2.2.1.1. Glucozamina și condroitin sulfatul**

Glucozamina (2-amino-2-deoxi- $\alpha$ -D-glucoza) și condroitin sulfatul (polizaharid, neramificat compus din reziduuri alterantive de acid glucuronic și *N*-acetilglucozamina), prezintă proprietăți condroprotective [44]. Ambele substanțe sunt componente ale complexelor proteoglicanice din condrocite.

#### **I.2.2.1.2. Acidul Hialuronic**

Acidul hialuronic este o polizaharidă cu proprietăți vâscoelastice care îmbunătățește lubrifierea și mecanica articulației. Deși mecanismele de acțiune ale acidului hialuronic nu sunt pe deplin înțelese, acesta modulează metabolismul celular și are efect condroprotector.

#### **I.2.2.1.3. Glucocorticoizii**

Glucocorticoizii injectabili sunt utilizați de mult timp în tratamentul osteoartritei. Deși sunt eficienți în reducerea simptomatologiei, efectul lor este limitat la câteva săptămâni [45]. Deși părea că glucocorticoizii au efect protectiv, cele mai multe date experimentale sugerează că au un efect negativ asupra biologiei cartilajului prin inhibarea proliferării condrocitare, scăderea sintezei matricii și a sintezei proteoglicanilor.

44. Brief A.A., Maurer S.G., Di Cesare P.E., *Use of glucosamine and chondroitin sulfate in the management of osteoarthritis*, Journal of American Academy of Orthopedic Surgery (2001), 9: 71-78.

45. Crawford D.C., Safran M.R., *Osteochondritis Dissecans of the Knee*, Journal of American Academy of Orthopedic Surgery (2006), 14: 90-100.

### **I.2.2.1.4. Antiinflamatoare nesteroidiene**

Acestea sunt împreună cu analgezicele mai prescrise medicamente în tratamentul leziunilor cartilajului articular. Eficacitatea antiinflamatoarelor nesteroidiene se datorează, în principal, efectului inhibitor asupra COX-2 [46]. Ciclooxygenaza-2 stimulează catabolismul tisular, scăzând totodată sinteza colagenului de tip II și a proteoglicanilor [47]. Cu toate acestea, nu există dovezi că ar întârzia evoluția spre artroză.

### **I.2.2.2. Tratamentul chirurgical al leziunilor cartilajului articular**

Mai mulți factori trebuie luați în considerare pentru a se lua o decizie în vederea tratării leziunii cartilajului articular: suprafața, profunzimea, localizarea, istoricul, leziunile asociate, stabilitatea genunchiului, leziuni meniscale, axele mecanice ale membrului, vârsta pacientului și, nu în ultimul rând, solicitările funcționale ale pacientului.

Procedurile de reparare a cartilajului pot fi împărțite în primare – proceduri simple care pot fi efectuate artroscopic, ca prima linie de tratament, și secundare – care sunt mai complexe și au ca scop refacerea durabilă a suprafeței cartilajului.

Procedurile primare sunt tehnici artroscopice (lavajul, debridarea, abraziunea) care s-au dovedit utile pentru pacienții cu solicitări mecanice mici ale articulației și cu leziuni unice și relativ reduse ca suprafață și care nu doresc să urmeze un tratament recuperator de durată. Rezultatele obținute sunt relativ reduse prin folosirea izolată a acestei metode.

O altă tehnică primară, prin stimularea măduvei osoase s-a dovedit a fi o tehnică utilă, având rezultate bune. Stimularea măduvei osoase include un grup de tehnici prin care se produce sângerarea osului subcondral la nivelul leziunii cu aducerea de blaști care vor forma fibrocartilaj. Avantajul acestor tehnici este legat de simplitatea efectuării, instrumentație comună (la îndemâna oricărui chirurg) și timpul redus necesar pentru efectuare.

Principalul dezavantaj este legat de repararea defectului cartilagos prin fibrocartilaj, ceea ce limitează în timp rezultatul obținut datorită proprietăților inferioare ale fibrocartilajului față de a cartilajului hialin.

Tehnicile secundare de reparare a cartilajului articular au în vedere două direcții bazate pe implantul:

- de cartilaj articular prelevat dintr-o zonă neportantă;
- de condrocite.

46. Cannon G.W., Breedveld F.C., *Efficacy of cyclooxygenase-2-specific inhibitors*, American Journal of Medicine (2001), 110(suppl 3A): S6-S12.

47. Abramson S.B., *The role of COX-2 produced by cartilage in arthritis*, Osteoarthritis Cartilage (1999), 7: 380-381.

### **I.2.2.2.1. Transplantul osteocondral autolog**

Transplantul osteocondral autolog este o procedură prin care se prelevă unul sau mai mulți cilindri osteocondrali dintr-o zonă donoare și se implantează în zona defectului cartilaginos. Tehnic, se recoltează mai mulți cilindri osteocondrali dintr-o zonă neimportantă a genunchiului - un număr variabil și de dimensiuni variabile în așa fel încât să se acopere suprafața defectului cât mai bine – cu un instrumentar special (Figura 20).

În următorul timp operator se prelucrează zona primitoare (a defectului condral) până la cartilajul peridiacent sănătos și, de asemenea, se prelucrează suprafața osului subcondral și se practică găuri în osul subdiacent, în care se vor introduce cilindri osteocondrali recoltați anterior [48]. Avantajele acestei tehnici constau în posibilitatea efectuării într-un singur timp operator, posibilitatea efectuării chiar dacă există leziuni ale osului subcondral (osteocondrită, leziuni degenerative), costul redus, timp mai redus de recuperare comparativ cu implantul de condrocite autologe.

Dezavantajele metodei constau, în principal, în efecte adverse legate de zona donoare și de limitarea suprafeței care poate fi acoperită datorită limitării zonei de unde se pot recolta cilindri.

Indicația actuală principală a acestei tehnici este pentru defectele condrale de la nivelul condililor femurali cu suprafața de 2-4 cm<sup>2</sup>, la pacienții activi, dar și la pacienți vârstnici activi în funcție de starea cartilajului în restul articulației.

---

48. Hangody L., Kish G., Karpati Z., Udvarhelyi I., *Arthroscopic autogenous osteochondral mosaicplasty for the treatment of femoral condylar articular defects*, Knee Surgery Sports and Traumatology Arthroscopy (1997), 3: 262–267.

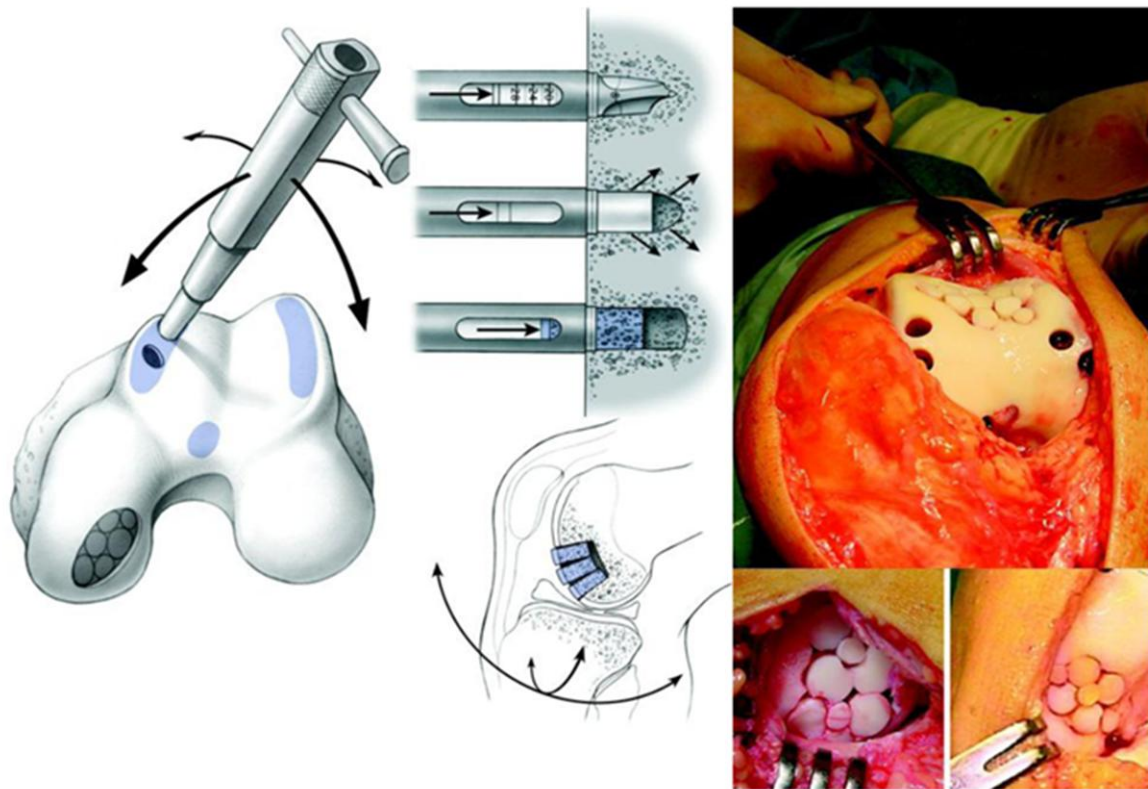


Figura 20. Transplant osteocondral efectuat artroscopic

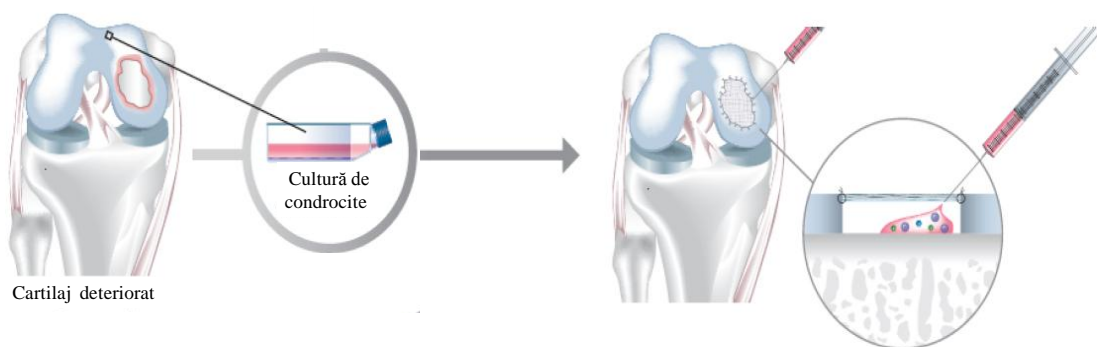
#### I.2.2.2. Implantarea de condrocite autologe

Implantarea de condrocite autologe a fost descrisă pentru prima dată în 1994 de Brittberg și colaboratorii [49]. Este o metodă prin care se realizează regenerarea cu cartilaj de tip hialin, cu ajutorul unor condrocite cultivate în *vitro*, metoda din ce în ce mai mult utilizată (Figura 21). Tehnica presupune o primă intervenție prin care se recoltează condrocite (200-300 mg) pentru culturi și după dezvoltarea acestora în *vitro* o nouă intervenție chirurgicală prin care se umple defectul cartilaginios cu aceste celule, conținția lor în defect realizându-se cu ajutorul unor membrane de periost sau collagen [50].

Rezultate pe termen lung încă nu există, însă pe termen mediu studiile arată 80-85% eficiență. Avantajul metodei constă în invazivitatea mică a tehnicii, fără efecte adverse la locul de recoltare a condrocitelor, însă necesită un os subcondral de bună calitate, ceea ce îi reduce indicațiile. Principalul dezavantaj al metodei constă în prețul ridicat: 8.000-10.000 euro pentru un pacient. De asemenea, un mare dezavantaj al acestei tehnici îl constituie faptul că presupune două intervenții chirurgicale.

49. Brittberg M., Lindahl A., Nilsson A., Ohlsson C., Isaksson O., Peterson L., *Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation*, English Journal of Medicine (1994), 331: 889-895.

50. Deryk G., Jones A., Peterson L., *Autologous Chondrocyte Implantation*, Journal of Bone Joint Surgery (2006), 88: 2501-2520.



**Figura 21. Schema implantării de condrocite autologe**

O variantă mai nouă a acestei tehnici este utilizarea unei matrice solide tridimensionale de acid hialuronic sau colagen pe care aderă condrocitele cultivate, reducându-se astfel durata intervenției chirurgicale și eliminându-se unele complicații legate de metodele de menținere a culturilor de condrocite la locul defectului, matricea nu mai necesită suturarea la nivelul defectului [51].

### **I.3. Biomateriale utilizate în ingineria tisulară a cartilajului articular**

Ingineria tisulară a fost definită, dintr-o perspectivă foarte generală, ca fiind „aplicarea principiilor și metodelor ingineriei și științelor vieții, pentru înțelegerea fundamentală a relațiilor dintre structură și funcție la țesuturile normale sau patologice, și să dezvolte substituenți biologici pentru a reintegra, menține, sau să îmbunătățească funcționalitatea lor” [52]. Langer și Vacanti [53] au subliniat rolul ingineriei tisulare în medicina regenerativă. Ei au scos în evidență faptul că ingineria tisulară este un domeniu care ne permite să avem o nouă viziune asupra medicinei regenerative. Folosind această tehnologie, devine posibil să înlocuim sau să regenerăm țesuturile lezate.

Conceptul comun reprezentativ al ingineriei tisulare este de a combina sau a folosi individual, matrici/rețele și celule vii și/sau substanțe biologice active, pentru a forma produse care vor fi implantate în vivo, și care vor contribui la repararea și regenerarea țesuturilor (Figura 22).

51. Gigante A., Bevilacqua C., Ricevuto A., Mattioli-Belmonte M., Greco F., *Membrane-seeded autologous chondrocytes: cell viability and characterization at surgery*, Knee Surgery Sports and Traumatology Arthroscopy (2007), 15: 88–92.

52. Skalak R. and Fox C. F., *Tissue Engineering*, Ed. Alan R. Liss(1988), New York, p.30.

53. Langer R. and Vacanti J. P., *Tissue engineering*, Science (1993), 260: 920–926.

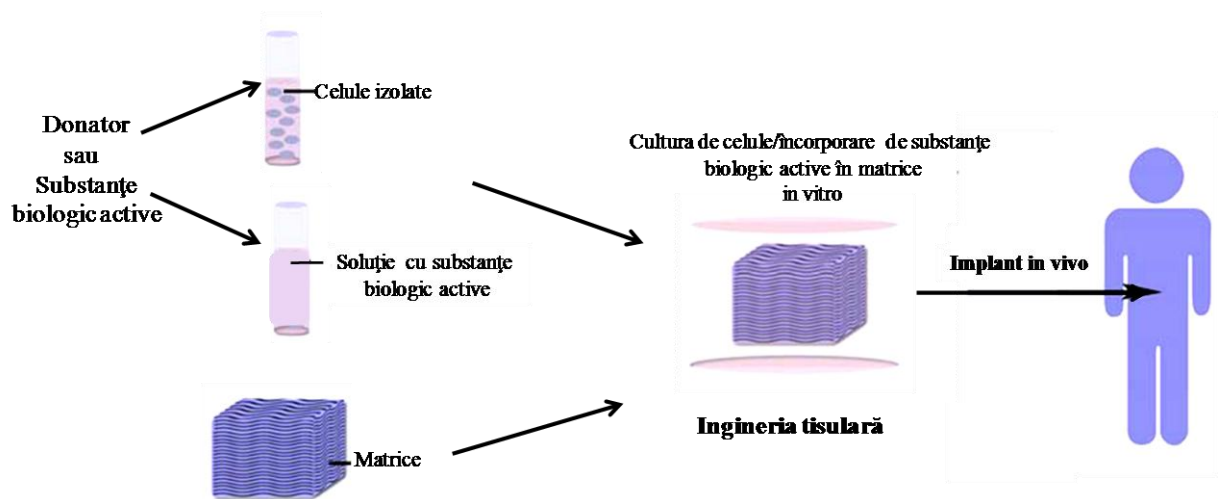


Figura 22. Schema reprezentativă a ingineriei tisulare

Matricea trebuie să permită colonizarea, migrarea, diferențierea și creșterea celulelor, și să inducă și ghideze dezvoltarea țesutului respectiv, sau să permită eliberarea controlată de medicamente. Scopul ingineriei tisulare este de a realiza o matrice dintr-un material biocompatibil, biodegradabil sau nu, în funcție dacă se dorește sau nu realizarea de culturi celulare.

În cazul matricilor pentru culturi celulare, ele trebuie să permită creșterea, proliferarea și integrarea celulelor. Pentru astfel de aplicații, alegerea unui astfel de material s-a realizat astfel încât materialul respectiv să aibă aceleași proprietăți cu cele ale matricei cartilajului articular.

Privite dintr-o viziune biologică, este clar faptul că majoritatea țesuturilor au două tipuri de componente: una structurală și una biochimică. Ingineria tisulară ia în considerare amândouă componentele, pentru realizarea implanturilor pentru regenerare tisulară și facilitarea integrării acestora.

Sinteza matricei suport determină, în mare parte, funcționalitatea sa. Deși cerințele finale depind de scopul specific al caracteristicilor matricilor, mai multe cerințe generale trebuie să fie luate în considerare pentru toate matricile [54, 55, 56, 57]. Matricile suport ar trebui să fie/aibă:

54. Hutmacher D.W., *Scaffolds în tissue engineering bone and cartilage*, Biomaterials (2000), 21(24): 2529-2543.

55. Kretlow J.D., Mikos A.G., *From material to tissue: Biomaterial development, scaffold fabrication, and tissue engineering*, AIChE Journal (2008), 54(12): 3048-3067.

56. Liu C., Xia Z., Czernuszka J.T., *Design and Development of Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering*, Chemical Engineering Research and Design (2007), 85(7): 1051-1064.

57. Moroni L., De Wijn J.R., Van Blitterswijk C.A., *Integrating novel technologies to fabricate smart scaffolds*, Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition (2008), 19(5): 543-572.

- biocompatibile; matricea trebuie să determine un răspuns biologic corespunzător aplicației și să prevină orice răspuns nefavorabil al țesutului inconjurător [58,59];
- biodegradabile; matricea trebuie să se degradeze în același timp cu regenerarea și remodelarea matricei extracelulare, în substanțe netoxice fără să intervină în funcționarea țesutului inconjurător [60];
- să faciliteze atașarea celulară, dispersarea și proliferarea [61];
- proprietăți mecanice corespunzătoare aplicației pentru care sunt destinate - rezistența matricilor trebuie să fie comparabilă cu cea a țesutului *in vivo* [62];
- proprietăți de transport al nutrienților și de eliminare a produșilor de uzură - matricea trebuie să aibă o anumită porozitate, dar în același timp, să își păstreze proprietățile mecanice specifice [63, 64, 65, 66];
- să permită vascularizația dintre substitut la țesutul gazdă [49, 67, 68];
- proprietăți de suprafață corespunzătoare aplicației; în afara proprietăților fizico-chimice, cercetările sugerează că topografia de suprafață joacă un rol important în organizarea tisulară, îmbunătățind funcția substitutului [69, 70, 71, 72];

58. Babensee J.E., Anderson J.M., McIntire L.V., Mikos A.G., *Host response to tissue engineered devices*, *Advanced Drug Delivery Reviews* (1998), 33(1-2): 111-139.

59. Williams D.F., *On the mechanisms of biocompatibility*, *Biomaterials* (2008), 29(20): 2941-2953.

60. Hutmacher D.W., *Scaffold design and fabrication technologies for engineering tissues state of the art and future perspectives*, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* (2001), 12: 107-124.

61. Ito Y., Zheng J., Imanishi Y., *Enhancement of cell growth on a porous membrane coimmobilized with cell  $\gamma$ -growth and cell adhesion factors*, *Biomaterials* (1997), 18(3): 197-202.

62. Mitragotri S., Lahann J., *Physical approaches to biomaterial design*, *Natural Materials* (2009), 8(1): 15-23.

63. Hutmacher D.W., *Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage*, *Biomaterials* (2000), 21(24): 2529-2543.

64. Agrawal C.M., Ray R.B., *Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering*, *Journal of Biomedical Materials Research* (2001), 55(2): 141-150.

65. Karageorgiou V., Kaplan D., *Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis*, *Biomaterials* (2005), 26:5474-5491.

66. Karande T.S., Ong J.L., Agrawal C.M., *Diffusion in musculoskeletal tissue engineering scaffolds: Design issues related to porosity, permeability, architecture, and nutrient mixing*, *Annals of Biomedical Engineering* (2004), 32(12): 1728-1743.

67. Kannan R.Y., Salacinski H.J., Sales K., Butler P., Seifalian A.M., *The roles of tissue engineering and vascularisation in the development of microvascular networks: a review*, *Biomaterials* (2005), 26(14): 1857-1875.

68. Agrawal C.M., Ray R.B., *Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering*, *Journal of Biomedical Materials Research* (2001), 55(2): 141-150.

69. Dunn G.A., Heath J.P., *A new hypothesis of contact guidance in tissue cells*, *Experimental Cell Research* (1976), 101(1): 1-14.

70. Falconnet D., Csucs G., Grandin M.H., Textor M., *Surface engineering approaches to micropattern surfaces for cell-based assays*, *Biomaterials* (2006), 27(16): 3044-3063.

71. Flemming R.G., Murphy C.J., Abrams G.A., Goodman S.L., Nealey P.F., *Effects of synthetic micro and nano-structured surfaces on cell behavior*, *Biomaterials* (1999), 20(6): 573-588.

72. Papenburg B.J., Vogelaar L., Bolhuis-Versteeg L.A., Lammertink R.G., Stamatialis D., Wessling M., *One-step fabrication of porous micropatterned scaffolds to control cell behavior*, *Biomaterials* (2007), 28(11): 1998-2009.



În acest context, în ingineria tisulară a cartilajului articular se aplică cultura de celule (de obicei condrocite) sau incorporarea de substanțe biologice active (principii active ale unor medicamente folosite în tratarea unor boli osteoarticulare) sunt combinate cu o matrice, astfel încât să rezulte un substitut 3D, care să fie asigurată regenerarea cartilajului articular.

Având în vedere structura cartilajului articular (Capitolul I.1) cel mai important aspect care trebuie luat în considerare sunt proprietățile mecanice. De aceea, produsele rezultate prin ingineria tisulară pentru cartilajul articular sunt proiectate pentru a putea adopta comportamentul de funcționare mecanică *in vivo* a cartilajului articular și analizate prin aplicarea unor solicitări fizice (ideal, similare celor din mediul fiziologic). Precondiționarea mecanică a construcțiilor ingineriei tisulare *in vitro* pot de asemenea să îmbunătățească viabilitatea lor și performanțele post-transplantare.

### **1.3.1. Materiale polimerice sintetice utilizate ca biomateriale în ortopedie**

Pentru aplicațiile lor, biomaterialele polimerice trebuie să îndeplinească câteva criterii printre care cele mai importante sunt performanța, stabilitatea și durabilitatea. Acest criterii pot fi obținute, în primul rând, prin selectarea cu atenție a materialului polimeric, cu proprietăți optime pentru aplicația urmărită. Latura inovatoare și concurențială a pieței de biomateriale polimerice a creat o dinamică specifică de producere a acestora, deoarece fiecare polimer ales trebuie să prezinte avantaje și caracteristici adecvate pentru a fi cel mai util unei aplicații medicale specifice.

Principalele utilizări ale biomaterialelor polimerice, în diferite domenii medicale sunt:

- *in domeniul ortopediei*: proteze interne permanente (de reconstrucție), proteze resorbabile (din polimeri bioresorbabili), diferite elemente de sutură și cimenturi pentru fixarea protezelor, înlocuirea articulațiilor cartilaginoase, drenuri chirurgicale, instrumentar chirurgical divers;
- *in domeniul medicinei recuperatorii*: membrane extracorporale, membrane bioactive (cu eliberare controlată de principii active), celule artificiale, proteze externe;
- *în domeniul oftalmologiei*: lentile de contact, lentile intraoculare, corneea artificială;
- *în domeniul cardiologiei*: valve mitrale pentru inimă, grefe vasculară artificială;
- *în domeniul dentar*: implanturi dentare, material de amprentare și cimenturi dentare, instrumentar dentar;
- *în domeniul chirurgiei estetice*: implanturi, elemente de sutură bioresorbabile;
- *alte aplicații medicale*: linii de perfuzie, dispozitive de cateterizare, dispozitive pentru căile respiratorii, căile digestive și căile urinare;

- în *domeniul farmaceutic*: excipienți pentru diferite forme de administrare medicamentoasă, sisteme cu eliberare controlată de medicament, sisteme vectoare de eliberare controlată a substanțelor active, bază pentru emulsii, paste, recipiente diverse de condiționare a medicamentelor;
- în *domeniul cosmetic*: bază pentru emulsii și creme cosmetice, sisteme complexe de peeling chimic sau mecanic.

Datorită proprietăților fizice, chimice și mecanice pe care le posedă, biomaterialele polimerice sunt materiale care pot fi folosite pentru tratarea, regenerarea sau înlocuirea oricărui țesut, organ sau funcție a organismului.

Alegerea polimerilor sintetici, se face prin prisma utilizării acestora în diferite domenii biomedicale, după cum se subliniază în cele ce urmează:

- **Polietilena** are aplicații în domeniul chirurgiei protetice cardio-vasculare, cranioplastii, ortopediei, stomatologie, se folosește ca fire de sutură, instrumente medicale.
- **Polipropilena** se utilizează în chirurgia cardio-vasculară, chirurgia reparatorie a peretelui abdominal, stomatologie, ca fire de sutură, instrumente medicale.
- **Polistirenul** se practică pentru confecționarea diferitelor dispozitive folosite în medicină, a rinichilor artificiali, pentru realizarea unor componente artificiale ale aparatului auditiv, a unor proteze stomatologice.
- **Poli(metacrilatul de metil)** se aplică în special în oftalmologie, ortopedie și în stomatologie.
- **Poli(alcool vinilic)** are aplicații în chirurgia estetică, orală și maxilofacială preprotetică, ca înlocuitor de plasmă sanguină, în farmacie (vehicule) și este folosit și pentru realizarea firelor de sutură.
- **Poli(clorura de vinil)** se întrebunțează în cadrul chirurgiei protetice maxilofaciale externe, pentru dispozitive ce vin în contact direct cu sângele, dispozitive de unică folosință, rezervoare de medicamente, instrumente și alte dispozitive medicale.
- **Poli(tetrafluoretilena)** se practică în cadrul chirurgiei cardio-vasculare, chirurgiei maxilo-faciale, în ortopedie, chirurgia plastică, chirurgia aparatului respirator și în domeniul farmaceutic, ca lubrifiant pentru comprimate.
- **Poli(vinil-pirolidona)** se folosește în domeniul farmaceutic (ca agent cu diferite roluri), excipienți, ca înlocuitor de plasmă sanguină.
- **Poliamidele** au aplicații în cadrul chirurgiei cardio-vasculare, ortopedie, pentru rinichi artificiali, membrane pentru dializă, purtători de medicamente, suturi chirurgicale.

- **Policarbonații** se utilizează ca fire de sutură chirurgicale resorbabile, transportul și eliberarea medicamentelor, în stomatologie, aparatură medicală, ambalaje sterile.
- **Poli(etilentereftalatul)** are aplicații în domeniul cardio-vascular, în chirurgia defectelor peretelui abdominal antero-lateral ca proteză de restaurare și ca fire de sutură chirurgicale.
- **Poli(etilenglicolul)** se practică în domeniul farmaceutic ca excipienți pentru diferite substanțe active, vehicule pentru diferite medicamente, agent cu roluri multiple și, totodată, este folosit în realizarea diferitelor preparate medicale.
- **Poliuretanii** se întrebuințează în stomatologie, chirurgie plastică, implanturi ortopedice, membrane pentru dializă, ca adezivi tisulari, suturi în chirurgia vasculară și în confecționarea unor componente ale inimii artificiale.
- **Siliconii** se utilizează ca substanțe auxiliare pentru preparate dermatologice, medicamente în unele forme de gastrită și ulcer, excipienți, agenți de sterilizare a instrumentelor și aparaturii medicale, proteze pentru operații plastice, oftalmologie, mamoplastii, stomatologie.

Cele mai folosite biomateriale în chirurgia ortopedică sunt:

### **I.3.1.1. Polietilenele**

Polietilenele (PE) constituie o familie de polimeri termoplastici. În funcție de condițiile de polimerizare se obțin diferite sorturi :

- polietilena cu densitate joasă, ramificată (LDPE);
- polietilena cu densitate joasă, liniară (LLDPE);
- polietilena cu densitate înaltă (HDPE);
- polietilena cu masă moleculară ridicată (UHMWPE).

Polietilenele prezintă rezistență chimică, în general foarte bună: la acizi slabi și acizi tari neoxidanți, la baze slabe și tari, la solvenți organici sub 80°C, dar sunt permeabile.

#### **Aplicații medicale ale polietilenelor**

În domeniul chirurgiei cardiovasculare, polietilena rigidă se utilizează pentru fabricarea valvelor cardiace, carcasi pompelor, elementelor de conectare cu țesuturile înconjuratoare, în pofida unor dezavantaje ca: duritate mică, dificultăți de prelucrare, fragilitate, prezența incluziunilor.

Polietilena se folosește și pentru cranioplastii. Cranioplastia este indicată în repararea defectelor craniene rezultate în urma tumorilor, deficitului osos, traumatismelor, anomaliilor

congenitale sau infectiilor, și implica o corelare a notiunilor de neurochirurgie și a tehnicilor de protezare. S-a constatat faptul că HDPE poroasă *Flexblock* este un material adecvat pentru cranioplastii datorită accesibilității, posibilității de sterilizare fără modificarea formei și rezistenței, conductibilității termice apropiate de cea a țesutului înconjurător, atașării la craniu cu materiale de sutură obișnuite, absenței acumulării de secreții sub scalp, absenței reacției de respingere, precum și nedegradării și nedeformării în timp.

Un alt domeniu de utilizare al polietilenei este ortopedia. Astfel, polietilena de masa moleculară foarte mare (UHMWPE) este folosită ca material de elecție pentru obținerea cupei acetabulare, din cadrul implantului total de șold.

Recent, în chirurgia urechii, s-a introdus și a avut succes polietilena poroasă sub denumire de *Plastipore*.

În cabinetul de stomatologie, ca materiale de protecție a plăgilor parodontale se folosesc o serie de polietilene, sub formă de pansamente. O față a acestor pansamente adezive este acoperită de un film de polietilenă, iar cealaltă de o folie de hârtie protectoare care poate fi îndepărtată în timpul utilizării. Pansamentele adezive sunt utilizate în protecția plăgilor rezultate prin aplicarea unor grefe epitelio-conjunctive sau unor grefe gingivale libere.

Copolimeri ai etenei și acetatului de vinil se utilizează în confecționarea gutierelor totale, întrebuințate pentru profilaxia traumatismelor dento-maxilare.

Adeseori, în practică, stomatologul trebuie să sutureze o serie de părți moi (endo- sau exobucale). Sutura este ultimul timp operator al unei intervenții chirurgicale care condiționează cicatrizarea și rezultatul final. Printre materialele de sutură utilizate în stomatologie se folosesc firele sintetice neresorbabile, printre care și fire de polietilenă, deoarece sunt considerate printre cele mai rezistente fire de sutură. Firele de polietilena satisfac condițiile impuse firelor de sutură: să fie suple, rezistente la tracțiune, să nu întrețină o reacție inflamatorie prin capilaritate, să fie elastice și rezistente la elongație. Polimerul prezintă proprietățile biologice impuse materialelor de sutură: să fie bine tolerate și să nu provoace stări alergice sau reacții inflamatorii, sterilizarea lor să nu le diminueze rezistența omogenitatea și suplețea. Firele de PE sunt inerte, nu suferă procese de degradare hidrolitică și se folosesc mai mult pentru suturi tegumentare.

Pe lângă utilizările amintite mai sus, polietilena se mai utilizează pentru: pungi/saci pentru condiționarea sterilă a implanturilor sau fluidelor biologice, pistoane pentru seringi, protectori pentru ace pentru seringă, tuburi pentru catetere.

**Principalele tehnologii de prelucrare:** formarea prin injecție, extrudere, termoformare, formare rotațională.

### **I.3.1. 2. Policlorura de vinil)**

Policlorura de vinil (PVC) este un material cu bună rezistență mecanică și chimică. Este puțin permeabilă la gaze și uleiuri volatile, vapori de apă, dar, în același timp, mai permeabilă decât polietilena. Din cauza rigidității este puțin utilizată pentru condiționare; prin adăos de plastifianți se obține o suplețe superioară a materialului. Din punct de vedere toxicologic, monomerul este cancerigen, dar policlorura de vinil nu prezintă nici un pericol.

#### **Aplicații medicale ale poli(clorurii de vinil)**

PVC, printre alte materiale polimerice, este folosită în chirurgia protetică maxilofacială externă, la reconstrucții complexe, în urma unor fracturi multiple, cu pierderi mari de țesut moale.

PVC plastifiată este utilizată pentru construcția diverselor dispozitive care vin în contact direct cu sângele: tuburi pentru circulația extracorporală a sângelui; catetere, pungi și tuburi pentru transfuzii. PVC-ul este polimerul cel mai folosit pentru confecționarea a majoritatea dispozitivelor de unică folosință. O mare problemă o poate ridica însă alegerea plastifiantului, care poate exuda din material, existând riscul de a fi preluat de lichide și introdus în organism.

Un alt dezavantaj al PVC constă în faptul că prezintă o complianță mecanică diferită de cea a vaselor de sânge normale, iar la contactul dintre polimer și sânge pot apărea turbulente de curgere, care vor determina activarea hemolizei și agregarea plachetară, toate acestea conducând la apariția fenomenului de coagulare.

PVC plastifiată se utilizează și în confecționarea rezervoarelor de medicamente. S-a demonstrat că infuzarea intravenoasă a unor medicamente anticancerigene (5-fluorouracil) este mai avantajoasă decât injecțiile intravenoase. Tehnologia avansată a făcut posibilă eliberarea unor cantități calculate de medicament, într-o perioadă de timp impusă. Astfel, sacii de PVC sunt foarte folosiți ca pompe de infuzie portabile, cantitatea de medicament înmagazinată în aceste rezervoare trebuind să fie stabilă și compatibilă.

Din PVC se mai confecționează: tuburi ale pompelor peristaltice, tuburi stomacale flexibile și semiflexibile, pungi pentru perfuzii, componente ale instalațiilor pentru dializă.

**Tehnologii de prelucrare:** prin injecție, prin extrudere, prin termoformare, prin formare mecanică, turnare.

### **I.3.1. 3. Politetrafluoretilena**

Politetrafluoretilena (PTFE) face parte din clasa polimerilor fluorurați. Adesea denumită teflon (care este una dintre denumirile sale comerciale), a fost descoperită în 1938 și

este un material termoplastic dur și tenace, stabil la temperaturi între  $-280^{\circ}\text{C}$  și  $300^{\circ}\text{C}$ . Se caracterizează printr-o foarte ridicată vâscozitate în stare topită. În consecință, tehnologiile de prelucrare diferă total de ale celorlalte materiale termoplastice, dar se apropie de cele ale metalelor și ale materialelor ceramice.

Politetrafluoretilena are o combinație de proprietăți de performanță unică între polimeri, fiind utilizată în multe aplicații critice. Proprietățile mecanice nu sunt afectate semnificativ la temperatura ridicată, pe un lung interval de timp. PTFE nu absoarbe radiații din spectrul vizibil și nici din cel ultraviolet. Este un material translucid până la opac, din cauza ca zonele cristaline difractă și reflectă lumina. Rezistența chimică foarte bună la atacul chimic determină aplicațiile majore. Este atacată de puține produse chimice.

### **Aplicații medicale ale politetrafluoretilena**

Datorită accesibilității, inerției chimice, proprietăților fizice adecvate (duritate, flexibilitate, permeabilitate, adeziune, rezistență la șoc, tracțiune, alungire, rupere, torsiune, modul de elasticitate), coeficientului de frecare redus dintre comprimate și matrițe (acționează ca și coeficient de lubrifiere), PTFE a fost testat pentru diferite aplicații în chirurgia cardio-vasculară, ortopedie, cât și în chirurgia plastică.

În problematica complexă a chirurgiei cardio-vasculare se detașează două domenii de aplicare promițătoare a polimerilor: protezele vasculare și componentele inimii artificiale. Chirurgia cardio-vasculară corectează o serie de defecte congenitale a inimii și contribuie la restabilirea fluxului sangvin în ischemii miocardice, prin înlocuirea vaselor de sânge sau a valvelor cardiace. Dificultățile sunt legate de inaccesibilitatea materialelor adecvate, netrombogene și cu caracteristici mecanice superioare, precum și de neștiința principiilor și tehnicilor adecvate de implantare.

În ce privește hemocompatibilitatea, o soluție ar putea fi utilizarea microfibrilor din PTFE capabile să formeze un pseudoendotelium, rezistent la acțiunea forțelor de forfecare din partea sângelui și la diferențele de presiune dintre contracția cardiacă și relaxare.

Dificultățile principale care apar la protezarea vaselor sanguine sunt determinate de procesele ce decurg la suprafața de contact cu sângele. În general, înlocuirea vaselor de sânge de diametru mare are mai multe șanse de reușită decât cea a vaselor mici. Protezele vasculare trebuie să reproducă proprietățile mecanice (elasticitate, flexibilitate, porozitate) ale vaselor sanguine, în condițiile evitării coagulării sângelui.

Se descriu protezele vasculare din PTFE expandată, constituite din tuburi care se taie, se cos și se manipulează ușor. Protezele confecționate din acest material, modificat prin

expunere la acțiunea unui câmp electric, reproduc structura pereților interiori ai vaselor sanguine, care prezintă la suprafață sarcini negative.

Perfectarea unei inimi autonome presupune alegerea unei surse de energie de volum mic, realizarea unui convertizor de energie, miniaturizarea unei pompe și construcția modulului cardiac propriu-zis. Realizarea modulului cardiac implică utilizarea unor materiale și a unor forme constructive care să elimine sau să evite riscul trombozei. Problema majoră a acestui echipament protetic este evitarea trombozei și emboliei, care depind de factori ca: tipul constructiv al pompei implantate, interfața material-sânge, viteza de curgere a sângelui, modificarea mecanismului de coagulare a sângelui. Hemodinamica, în cazul utilizării clapelor pentru inima, depinde de forma protezei și interacțiunea dintre sânge și suprafața polimerilor. Caracteristicile suprafeței depind de duritatea polimerului, de natura și sarcina electrică a grupărilor orientate la suprafață. Suprafața clapelor cardiace trebuie să fie netrombogenă, eventual heparinizată. Se utilizează clape din teflon cu polipropilenă.

PTFE se utilizează pentru fabricarea valvelor cardiace, carcasi pompelor, elementelor de conectare cu țesuturile înconjurătoare, în pofida unor dezavantaje ca: duritate mică, dificultăți de prelucrare, fragilitate, prezența incluziunilor.

PTFE poroasă, grafitată, se utilizează tot mai mult în cadrul chirurgiei maxilo-faciale și ortopediei, ca material de acoperire, pentru atașare la os sau completarea țesutului osos deficitar, precum și ca material de elecție pentru implanturile ortopedice, ligamente pentru genunchi.

PTFE mai are utilizări și în cadrul chirurgiei plastice ca grefe osoase ale urechii și, de asemenea, este folosit ca membrană poroasă, având permeabilitate mare pentru oxigen și dioxid de carbon, selectată pentru plămâni artificiali (implică transport interfazic de gaze sau lichide).

PTFE mai joacă rol de lubrifiant deoarece posedă o rezistență la frecare foarte mică, fapt ce facilitează compactarea sub presiune și reduce forțele de eiecție. Poli(tetrafluor-etilena) conduce la comprimate cu timp de dezagregare mare și rezistență la rupere corespunzătoare.

Din combinarea PTFE cu fibre de carbon a rezultat *Proplastul*, utilizat în unele situații în cadrul chirurgiei defectelor peretelui abdominal antero-lateral. Printr-un proces de expandare a Teflonului, s-a obținut un material mult mai poros PTFE expandată, fabricată actualmente în SUA sub denumirea de *GoreTex*. PTFE de bază fiind abandonat datorită capacității sale mediocre de integrare parietală.

**Tehnologii de prelucrare:** Vâscozitatea mare în stare topită face ca PTFE să nu aibă caracteristici reologice suficiente pentru a putea fi prelucrată prin injecție sau prin extrudare. De aceea, tehnologia principală de prelucrare este sinterizarea.

### **1.3.1.4. Poli(alcoolul vinilic)**

Este un polimer termoplastic cu numeroase utilizări biomedicale, în industria farmaceutică și cosmetică, ca aditiv pentru materiale celulozice, acoperiri diverse, stabilizator coloidal precum și în domeniul medical.

Proprietățile fizice și chimice ale poli(alcoolului vinilic) (PAV) depind, în cea mai mare măsură, de condițiile în care a fost sintetizat poli(acetatul de vinil) de plecare, ca și condițiile de hidroliză (procentul de grupe hidrolizate din polimerul final). Gradul de polimerizare variază de la 500 la 2500 daltoni pentru produsele comerciale. În funcție de gradul de hidroliză, conținutul de apă și masa moleculară, PAV se poate prezenta sub formă unor pulberi sau ca soluție.

#### **Aplicații medicale ale poli(alcoolul vinilic)**

PAV este folosit, în principal, pentru realizarea de suporturi pentru medicamente de uz oftalmic cu efect prelungit. Datorită particularităților anatomice ale ochilor, administrarea de substanțe medicamentoase este dificilă prin metode convenționale, una dintre metode fiind introducerea acestora în circulația sangvină. Un dezavantaj al acestei metode este cel datorat faptului că între umoarea apoasă, umoarea sticloasă și sânge există o barieră datorată selectivității membranelor epiteliale, barieră ce nu permite ajungerea în ochi a tuturor substanțelor administrate prin sânge. Multe medicamente nu sunt capabile să ajungă în camera anterioară a ochiului, în concentrații terapeutice, deoarece se leagă de proteinele plasmatice sau pentru că nu sunt suficient de liposolubile.

Eforturile cercetătorilor au fost direcționate, pe parcursul anilor, către creșterea cantității de medicament ce ajunge în camera anterioară și, în același timp, către reducerea efectelor secundare asupra sistemului cardiovascular datorate pierderilor de medicament din timpul circulației.

Una dintre metodele experimentate pentru a rezolva aceasta problemă a fost realizarea de sisteme cu vâscozitate mărită, deoarece prin creșterea vâscozității s-a scontat mărirea duratei când medicamentul rămâne în zona ochiului, împiedicându-se astfel drenarea lui prin canalele vecinate. Rezultatul nu a fost cel așteptat deoarece, deși drenat mai greu, cantitatea de medicament primită de către ochi nu a crescut. S-a cautat, în continuare, un sistem care să elibereze în cantități mai mari medicamentul.



Pentru aceasta s-a folosit PAV, pentru crearea de pelicule polimerice ce conțin medicamentul și care, introduse în vecinătatea globului ocular, se dizolvă, eliberând principiul activ. Ca rezultat s-a obținut creșterea de opt ori a cantității eliberate de medicament, comparativ cu efectul picăturilor oculare.

În domeniul farmaceutic, s-au studiat interacțiunile poli(alcoolului vinilic) cu diferite materiale active. Astfel, PAV exercită un efect de stabilizare asupra unor medicamente, printre care și tetraciclina clorhidrat, probabil datorită formării de complecși stabili.

Conform cercetărilor lui Suss și colab., PAV prezintă proprietăți de coloid de asociere, cu o concentrație critică micelară de 0,05% [73]. Huttenrauch consideră că acest polimer leagă moleculele medicamentelor în miclele, prin forțe fizice, în urma dizolvării și concentrării. Principalele tipuri de legături implicate sunt cele de hidrogen [74].

PAV formează cu substanțele tensioactive anionice complecși cu caracter de polielectrolit, neinteracționând cu substanțele tensioactive cationice.

PAV se utilizează ca agent de aglutinare asigurând aderența între particulele de pulberi, în granulate. Se utilizează în concentrații mici, sub formă de soluții sau geluri, în apă sau alcool etilic. Dependent de vâscozitate, se realizează durate de dezagregare diferite. De asemenea, fiind un aglutinant bun, se caracterizează prin: indice de friabilitate mic, rezistență mare, absența gustului și mirosului neplăcut.

Totodată, PAV, este folosit ca bază pentru unguente datorită proprietății de formare de geluri în soluții apoase concentrate și ca vehicul, ce exercită un efect prelungit al colirelor, utilizat pentru picături nazale.

PAV mai are funcția de agent de îngrosare, utilizându-se pentru mărirea vâscozității colirelor, siropurilor, unguentelor, pastelor. Ca agent de suspensie, PAV asigură distribuirea omogenă a fazei solubile în mediul de dispersie, efectul de stabilizare a suspensiilor bazându-se pe mărirea vâscozității mediului sau fiind urmarea proprietăților tensioactive și a capacității de îngrosare.

Poli(alcoolul vinilic) mai joacă rol și de agent pseudoemulgator (acționează prin mărirea vâscozității mediului de dispersie, împiedicând aglomerarea particulelor dispersate), agent de gelificare (ca substanțe utilizate în prelucrarea unguentelor hidrosolubile) și de agent de acoperire gastrosolubili, utilizați ca substanțe solubile în suc gastric, adăugate

73. D. Süß, Y. Cohen and Y. Talmon, *The microstructure of the poly(ethylene oxide)/sodium dodecyl sulfate system studied by cryogenic-temperature transmission electron microscopy and small-angle X-ray scattering*, Polymer (1995), 9 (36): 1809-1815.

74. Hüttenrauch R., Fricke S., and Köhler M., *Experimental confirmation of the change of water structure in the critical range of micelle formation: a new method of critical micelle concentration (CMC) determination*, Pharmaceutical Research (1988), 5(11): 726-7288.

comprimatelor pentru protejarea principiilor active, mascarea gustului și mirosului neplăcut, cât și pentru dirijarea cedării medicamentului.

Ca înlocuitor de plasmă sangvină, deși se pare că este contraindicat pentru aplicații clinice, specialiștii au obținut rezultate satisfăcătoare în administrarea la oameni a poli(alcoolului vinilic) cu masă moleculară de 10000, sub formă de soluție de concentrație 3%, pentru cazurile de șoc și infecții post operatorii. Totodată este folosit pentru conservarea plasmei sangvine.

Poli(alcoolul de vinil) are efect detoxifiant în tratarea insuficienței renale provocate de transfuzia de sânge incompatibil, prin influențarea microcirculației și prevenirea stazei și agregării.

Este consemnată folosirea poli(alcoolului vinilic) în chirurgia estetică și în terapia arsurilor, precum și utilizarea suturilor de PAV în chirurgia vasculară, bronchială, gastro-intestinală, cu reacție tisulară scăzută.

Stabilitatea mărită a fibrelor de PAV reticulate cu aldehidă formică implică dificultăți de resorbție, în timp ce poli(vinil butiralul) are o viteză de biodegradare comparabilă cu cea a catgutului.

O altă utilizare a PAV ar fi în chirurgia orală și maxilofacială, preprotetică, cu scopul de a mări creasta alveolară mandibulară sau maxilară folosind un implant. Această metodă se folosește la pacienții ce prezintă atrofii, unde protezele dentare clasice nu pot fi folosite.

### **I.3.1.5. Polimeri acrilici**

**Unul dintre cei mai importanți reprezentanți ai polimerilor acrilici cu aplicații biomedicale este poli(metacrilatul de metil).**

#### **I.3.1.5.1. Poli(metacrilatul de metil)**

Poli(metacrilatul de metil (PMMA) este un polimer termoplastic amorf, dur, rigid, casant. Principalele aplicații ale polimerului și copolimerilor săi sunt în oftalmologie. Dar PMMA are și următoarele proprietăți: claritate și transparență foarte bune, indice de refracție adecvat, excelentă stabilitate față de apă, excelentă stabilitate dimensională, rigiditatea, duritatea și tenacitatea foarte bune, nu se descompune în mediul biologic și nu produce iritații. Astfel, PMMA se utilizează la fabricarea lentilelor de contact dure și a lentilelor intraoculare. Dezavantajele acestui polimer: permeabilitate mică pentru oxigen, umectabilitate redusă datorită hidrofobității. Din cauza umectabilității reduse, utilizatorii de lentile de contact din

PMMA trebuie să folosească și adjuvanți de umectare, pe suprafața internă a lentilei. Poli(metacrilatul de metil) ajută și la confecționarea keratoprotezelor (pentru protezarea corneei). Se semnalează dificultăți în atașarea protezelor la țesutul corneal, biocompatibilitatea fiind cerința majoră.

Utilizarea cimenturilor acrilice (așa-numitele PMMA autopolimerizabile) în ortopedie datează din perioada anilor '60 și a permis fizarea diferitelor proteze, printre care proteza totală de șold. De remarcat ca cimenturile acrilice realizează doar o fixare mecanică atât față de os cât și față de implantul metalic/polimeric, fără a fi adezive în adevăratul sens al cuvântului. Recent, se încearcă utilizarea de cimenturi acrilice compozite, cu componente ceramice, în dorința de a obține cimenturi bioactive, care să permită refacerea structurii osoase și o mai bună interfață cu osul.

PMMA cunoaște o gamă largă de aplicații în stomatologie. După afirmarea PMMA ca material protetic, următorul pas a fost făcut prin introducerea acestuia în condițiile cavității bucale, cu posibilități variate de pigmentare.

Condițiile unui polimer dentar bun sunt următoarele: densitate apropiată de cea a dintelui, rezistență la abraziune egală cu cea a dintelui, elasticitate suficientă, fragilitate redusă, transparență, fabricare și prelucrare ușoară, stabilitate la modificările de temperatură, absorbție mică a apei și deformare redusă în contact cu aceasta, precum și absența efectelor toxice sau iritante asupra țesuturilor înconjurătoare. Dezavantajele acestui polimer: comparativ cu țesuturile dentare dure, PMMA prezintă valori diferite ale durității, rezistenței la compresiune, abrazivității și coeficientului de dilatare termică, la acestea se adaugă contracția de polimerizare și absorbția de apă.

Un dezavantaj major al protezelor confecționate din polimeri este degradarea acestora din cauza îmbătrânirii, care conduce la schimbarea culorii, opacifiere, mărirea fragilității, pierderea supleții, micșorarea rezistenței la tracțiune, a alungirii la rupere și a rezistenței la șoc. Printre cauzele îmbătrânirii pot fi menționate: modificările coloido-chimice ale polimerului, suprasolicitările piesei protetice provocate de tracțiune și de tensiunile interne, datorită repartizării neuniforme a forțelor masticatorii, precum și umflarea prin pătrunderea apei și salivei în porii compusului macromolecular. Este posibilă eliminarea sau atenuarea efectelor îmbătrânirii polimerului prin modificarea condițiilor de polimerizare și prelucrare.

Astfel, PMMA se folosește pentru baze ale protezelor sau confecționarea dinților artificiali, precum și ca materiale de restaurare.

PMMA a fost utilizat pentru amprentarea câmpurilor protetice edentate total, cu intenția de a transforma amprenta prelucrată în lingura individuală, baza de șablon sau chiar baza viitoare proteze. Tehnica a fost părăsită datorită multiplelor deficiențe observate.

PMMA (auto- sau termopolimerizabil) se mai utilizează și în confecționarea portamprentelor (lingurilor de amprentă), care constituie un suport rigid în care se aplică materialul de amprentă și cu ajutorul caruia acestea se inseră și se dezinseră de pe câmpul protetic.

PMMA se utilizează pentru obținerea materialelor compozite biodegradabile, care se caracterizează prin capacitatea de a reține proprietățile țesuturilor suport destul timp pentru a obține o vindecare bună a fracturii și, de asemenea, de a se degrada treptat în compuși biocompatibili, care pot fi eliminați din corp fără să provoace efecte secundare.

Rășinile acrilice autopolimerizabile se utilizează ca materiale pentru imobilizări dentare. Mobilizarea dentară patologică însoțește o serie de afecțiuni dento-parodontale: traumatisme, parodontopatii marginale, disfuncții mandibulare, tumori etc. Rășinile acrilice destinate reconstituirilor provizorii s-au diversificat mult în ultimele decenii. Cele mai multe restaurări provizorii se efectuează din această categorie de rășini. Spre deosebire de acrilatele autopolimerizabile, cele termopolimerizabile se indică pentru restaurări provizorii de durată mai lungă. Calitățile mecanice și cromatice sunt superioare celor autopolimerizabile.

**Principalele tehnologii de prelucrare:** formare prin turnare, injecție, extrudare, termoformare, uzinare.

### **I.3.1.6. Poliamide**

Poliamidele sunt cunoscute și sub denumirea de nylonuri, iar nomenclatura curentă a acestor produse sugerează natura și tipul substanțelor inițiale folosite în sinteză.

În general, poliamidele sunt caracterizate de următoarele proprietăți:

- rezistență mecanică bună;
- stabilitate termică;
- excelentă rezistență termică;
- proprietăți dielectrice foarte bune;
- tenacitate bună la temperaturi joase.

Folosirea poliamidelor pentru prepararea matricilor biodegradabile reprezintă un domeniu de interes pentru cercetările din ultimul timp. Microcapsulele și microsferile obținute din poli(acid glutamic), polilizină sau copolimerii acestora cu alți aminoacizi, au fost folosiți pentru administrarea controlată a medicamentelor.

Cu mulți ani în urmă, Harrison arăta că structurile de nylon pierdeau în jur de 80% din rezistența lor în timpul unei perioade de implantare de 3 ani. Unele poliamide sunt atât de hidrofiele, încât devin hidrolizabile, cu toate că gradul de absorbție al apei este variabil [75].

Poliamidele sunt considerate materiale de bază pentru membrane și tuburi folosite în dializă. Poli(hexametilen-adipamida) se degradează în mediul biologic, scăzând rezistența la rupere. Se utilizează ca membrane semipermeabile pentru rinichiul artificial. Majoritatea funcțiilor rinichiului artificial se asigură prin dializă, folosind membrane de dializă poliamidice, în absența gradientului de presiune, deși funcția normală a rinichiului presupune ultrafiltrarea.

Într-o membrană poliamidică, ce prezintă pori de dimensiuni diferite pe cele două fețe, se înregistrează coeficienți de permeabilitate diferiți pentru difuzia gazelor. Astfel, membranele poliamidice anizotropice sunt utile pentru realizarea dispozitivelor medicale de extracție diferențială a unui gaz dintr-un sistem gaz-lichid.

Anizotropia membranei variază în funcție de parametrii fizico-chimici, cum sunt: natura și masa moleculară a poliamidei, gradul de hidratare și grosimea membranei.

Din poliamida 6,6 se mai pot confecționa: ambalaje ușoare, seringi hipodermice, inhalator.

Ambalajele sterile, transparente, folosite pentru instrumente chirurgicale, sunt realizate dintr-o combinație de film termoformat și hârtie sterilă. Filmele compozite sterilizabile cu abur, confecționate din *Durethan PA* și polietilenă s-au dovedit foarte potrivite pentru aceste aplicații.

Poliamidele se folosesc și în cazul chirurgiei cardiovasculare, ca proteze arteriale constituite din tuburi care se taie, se cos și se manipulează ușor.

Poliamidele se utilizează și în construcția protezelor ortopedice. Laminele din polimeri poroși asigură evaporarea secrețiilor, fără blocarea porilor. Astfel de materiale se fabrică prin impregnarea poliamidelor cu rășini epoxidice.

Nylonul se folosește în suturi chirurgicale sub formă de fire neabsorbabile, sub formă de monofilamente impletite (*Surgilon*, *Nurolon*) sau ca monofilament simplu (*Ethilon*, *Dermalon*). Aceste tipuri de fire chirurgicale din nylon au o înaltă rezistență la tracțiune, mai mare ca mătasea naturală sau polipropilena. Datorită faptului că firele de nylon sunt rigide trebuie ca întinderea lor să se realizeze cu grijă, pentru a evita ruperea nodului și posibilitatea ruperii firului în interiorul țesutului.

---

75. Harrison S.D., Chiu P., Maickel R.P., *Polyamide thin-layer chromatographic separation of DOPA metabolites and related compounds*, Journal of Chromatography A (1973), 85(1): 151-153.

Incidența infecției în țesuturile care conțin suturi din nylon este mai mică decât în cazul altor suturi neabsorbabile.

Studiile *in vitro* au indicat că produsele de degradare ale suturilor din nylon sunt agenți antibacteriali potențiali, postulându-se ca aceștia pot distruge unele bacterii din plagă, reducând reacția țesutului la sutură.

Gradul de asociere a filamentelor în firul de a sutură este de importanță minoră în dezvoltarea infecțiilor, deși s-a remarcat o incidență mai mare a infectării la suturile multifilamentoase.

Poliamida 6 (PA 6) se mai utilizează pentru: tuburi pentru catetere intracardiace, sonde pentru aparatul urinar, pelicule pentru împachetări și componente pentru dializă, dispozitive de dozare a picăturilor, seringi dozatoare, duze (PA 6 consolidată cu fibre de sticlă).

**Tehnologii de prelucrare:** injecție , extrudere, filare.

### **I.3.1.7. Poliuretani**

Compușii macromoleculari de tip poliuretanic reprezintă o clasă de polimeri cu numeroase și interesante aplicații biomedicale.

În principal, toți poliuretanii (PU) conțin în lanțul principal grupa izocianat numai că, repetarea ei nu este regulată, homopolimerii poliuretaniei fiind mai puțin comercializați. Cei mai mulți poliuretani rezultă din reacția diizocianaților cu compuși di- sau polihidroxilici. Biomaterialele PU convenabile sunt cele secvențate, în care alternează porțiuni flexibile și rigide.

Aplicațiile medicale ale elastomerilor PU sunt variate și multiple, cerințele de PU sunt în continuă creștere, PU fiind acceptați ca biomateriale în majoritatea aplicațiilor care cer compatibilitate cu țesuturi moi sau cardiovasculare.

Pentru aplicații biomedicale, se cere ca rezultatele privitoare la proprietățile mecanice ale PU să fie corelate cu testele *in vivo* și *in vitro*, incluzând răspunsul tisular și compatibilitatea cu sângele a suprafețelor nemodificate sau heparinizate.

Studiul problemelor legate de acceptarea implantului PU de către sistemul fiziologic a fost condus prin urmărirea modificărilor în timp, *in vivo*, a biodegradării, hidrolizei și texturii suprafeței materialelor polimerice poliuretanie.

Biodegradarea PU, condiționată de configurația macromoleculară, este mai accentuată în domeniile amorfe decât în cele cristaline, care prezintă o împachetare compactă și regulată, datorită geometriei moleculare și forțelor intermoleculare.

Mediul biologic acționează asupra PU prin înmuierea și descompunerea în profunzime și, respectiv, prin micșorarea rezistenței la rupere a acestuia.

Una dintre caracteristicile PU este adeziunea bună la țesuturi. Astfel, PU se utilizează ca adezivi tisulari și în endoprotezare, bazându-se pe absența toxicității, inerției chimice și biologice, precum și pe stabilitatea fizico-mecanică.

Aplicațiile PU mai includ: tuburi endotraheale, suturi în chirurgia vasculară, componente ale inimii artificiale (valve, artere, vene), membrane pentru dializă, adezivi pentru țesutul nervos, materiale pentru reconstituire dentară, substituenți de gips (PU expandați *in situ*), substituenți de piele (pentru arsuri grave), proteze mamare, tuburi nasogastrice, peacemakere.

Elastomerii poliuretani termoplastici se folosesc, după cum am menționat mai sus, la confecționarea cateterelor. *Textin* este materialul din care se confecționează tuburile flexibile, cu pereți subțiri, folosite sub formă de catetere venoase. *Textin* nu conține plastifianți și nu produce gaze corozive la incinerare.

*Baydur* este un material poliuretanic care se folosește pentru confecționarea scaunelor de spital multifuncționale, acestea fiind durabile, ușor de manevrat și ușor de curățat. *Baydur* se folosește, de asemenea, și pentru realizarea sistemului modular de dializă, fiind un material transparent și având o rezistență mecanică bună.

Un alt domeniu de aplicare al PU este reprezentat de componentele inimii artificiale. Toate componentele sistemului cardiovascular (artere, vene, valve) sunt materiale compozite, care prezintă diferite caracteristici de deformare în direcție transversală și longitudinală. Această anizotropie este esențială pentru asigurarea funcțiilor fiziologice, cum ar fi acomodarea vaselor de sânge la modificările sistolice și diastolice ale presiunii sanguine și funcționarea valvelor inimii.

Se pare ca introducerea acestei anizotropii a țesuturilor naturale asigură succesul poli(eter-uretanilor) în aplicații de scurtă durată.

Utilizați ca materiale în construcția peacemaker-elor (stimulează inima pentru a reveni la ritmul normal), dispozitive din PU sunt implantate subcutanat și conectate la mușchii inimii cu ajutorul unor electrozi. Se preferă PU în acest scop datorită rezistenței mari la tracțiune.

Un alt produs comercial poliuretanic, se utilizează sub denumirea de *Medtronic* și este un material care permite realizarea de inserții chirurgicale facile și pentru creșterea elasticității implanturilor obținute.

În domeniul ortopedic, polimerii poroși sub forma spumei poliuretanică, sunt materiale de elecție pentru implanturi ortopedice. Astfel, spuma poliuretanică, preparată prin

interacțiunea unei rășini trihidroxilice cu exces de diizocianat, se aplică în ortopedie sub denumirea de *Ostamer*, în amestec cu catalizator adăugat în timpul intervenției chirurgicale.

Testat pe animale și clinic, în fracturi acute și patologice, *Ostamer* realizează o fixare imediată și sigură a osului, acționând ca un ax intramedular care asigură rezistență mecanică, contribuie la reabilitarea rapidă și regenerarea țesutului osos al gazdei, în condițiile unei reacții tisulare rapide.

În stomatologie, ca materiale utilizate la sigilarea șanțurilor și fosetelor (ca procedeu în cadrul profilaxiei dentare), s-au folosit materialele poliuretanic, constituenți ai lacurilor fluorurate, ele asigurând doar rolul de barieră mecanică între mediul bucal și zonele retentive. Actualmente, se utilizează mai puțin datorită retenției nesatisfăcătoare.

PU ce intră în compoziția cimenturilor dentare, se aplică în domeniul tehnicilor de colaj, și anume ca punți și imobilizări adezive și, de asemenea, ca agregări adezive în ortodonție.

**Tehnologii de prelucrare:** formarea prin injecție, extruderea, compresia, formarea prin transfer.

### I.3.2. Polimeri utilizați pentru înlocuirea cartilajului articular

Matricile suport au un rol foarte important în ingineria tisulară a cartilajului articular. Aplicarea lor variază de la substituirea părții periostale din tratamentul prin implantarea cu condrocite până la dispozitive cu eliberare controlată, care să îmbunătățească regenerarea tisulară și să reducă procesele inflamatorii, din osteoartrită.

Utilizarea matricelor în ingineria tisulară au deschis calea pentru utilizarea materialelor de substituție în tratarea patologiilor cartilajului articular. Astfel de matrici trebuie să respecte principiile de bază: să fie biocompatibile, stabile din punct de vedere structural și mecanic, să permită încorporarea de substanțe biologice active, și să permită diferențierea și maturarea celulară. Tuli și colab. [76] au împărțit aceste materiale în două tipuri principale: naturale și sintetice.

Matricile din hialuronan și colagen au fost printre primele materiale naturale folosite în substituția cartilajului articular datorită structurii asemănătoare cu cele ale cartilajului articular nativ. Studii clinice preliminarii au fost realizate cu matrici bazate pe hialuronan Hyalograft C™ [77]. S-a observat o reparare a țesutului cartilagos de aproximativ 96,7%.

76. Tuli R., Li W.J., Tuan R.S., *Current state of cartilage tissue engineering*, Arthritis Research Therapy (2003), 5: 235-238.

77. Pavesio A., Abatangelo G., Borriore A., Brocchetta D., Hollander A.P., Kon E., Torasso F., Zanasi S., Marcacci M., *Hyaluronan-based scaffolds (Hyalograft C) in the treatment of knee cartilage defects: preliminary clinical findings*, Novartis Found Symposium (2003), 249: 203-217.



Însă, în ceea ce privește celelalte matrici naturale folosite (fibrina, agaroză, alginatul, colagenul) s-au observat efecte adverse [78, 79] și în plus, au avut și alte inconveniente legate de imunogenitate, compatibilitate și nu au fost obținute aceleași caracteristici din punct de vedere mecanic (Tabelul 1).

Tabelul 1. Polimeri naturali folosiți în ingineria tisulară a cartilajului articular

Matrice naturală	Avantaje	Dezavantaje
Fibrina [80, 81,82]	Aspect histologic îmbunătățit Permite incorporarea de factori de creștere, cu bune rezultate la testele prelimarii pe șoareci	Proprietăți mecanice slabe Poate provoca un răspuns imun Nu permite atașarea celulară
Agaroză, alginatul [83, 84, 85, 86]	Injectabil Distribuire uniformă a celulelor Rezultate histologice bune la testele preliminariei pe iepure	O reacție celulară de corp străin (agaroză) Nu se resorb bine Proprietăți biochimice inferioare țesutului nativ
Colagenul [87, 88, 89, 90, 91, 92]	Intră în alcătuirea cartilajului nativ	Repararea rapidă a defectului articular poate să cedeze în

78. Frenkel S.R., Di Cesare P.E., *Scaffolds for articular cartilage repair*, Annals of Biomedical Engineering (2004), 32: 26–34.

79. Knudson W., Casey B., Nishida Y., et al., *Hyaluronan oligosaccharides perturb cartilage matrix homeostasis and induce chondrocytic chondrolysis*, Arthritis Rheumathoide (2000), 43: 1165–1174.

80. Brittberg M., Sjogren-Jansson E., Lindahl A., and Peterson L., *Influence of fibrin sealant (Tisseel) on osteochondral defect repair in the rabbit knee*, Biomaterials (1997), 18:235–242.

81. Hendrickson D.A., Nixon A.J., Grande D.A., Todhunter R.J., Minor R.M., Erb H., and Lust G., *Chondrocyte-fibrin matrix transplants for resurfacing extensive articular cartilage defects*, Journal of Orthopedic Research (1994), 12:485–496.

82. van Susante J.L., Buma P., Schuman L., Homminga G., Van den Berg W., and Veth R., *Resurfacing potential of heterologous chondrocytes suspended in fibrin glue in large full-thickness defects of femoral articular cartilage: An experimental study in the goat*, Biomaterials (1999), 20:1167–1175.

83. Dausse Y., Grossin L., Miralles G., Pelletier S., Mainard D., Hubert P., Baptiste D., Gillet P., Dellacherie E., Netter P., Payan E., *Cartilage repair using new polysaccharidic biomaterials: Macroscopic, histological and biochemical approaches in a rat model of cartilage defect*, Osteoarthritis Cartilage (2003), 11: 16–28.

84. Diduch D.R., Jordan L., Mierisch C., and Balian G., *Marrow stromal cells embedded in alginate for repair of osteochondral defects*, Arthroscopy (2000), 16: 571–577.

85. Marijnissen W. J., van Osch G., Aigner J., Verwoerd-Verhoef H., and Verhaar J., *Tissue-engineered cartilage using serially passaged articular chondrocytes. Chondrocytes in alginate, combined in vivo with a synthetic (E210) or biologic biodegradable carrier (DBM)*, Biomaterials (2000), 21: 571–580.

86. Weisser J., Rahfoth B., Timmermann A., Aigner T., Brauer R., and von der Mark K., *Role of growth factors in rabbit articular cartilage repair by chondrocytes in agarose*, Osteoarthritis Cartilage (2001), 9A:S48–S54.

87. Grande D. A., Halberstadt C., Naughton G., Schwartz R., and Manji R., *Evaluation of matrix scaffolds for tissue engineering of articular cartilage grafts*, Journal of Biomedical Materials Research (1997), 34: 211–220.

88. Lee C. R., Grodzinsky A., Hsu H., and Spector M., *Effects of a cultured autologous chondrocyte-seeded type II collagen scaffold on the healing of a chondral defect in a canine model*, Journal of Orthopedic Research (2003), 21: 272–281.

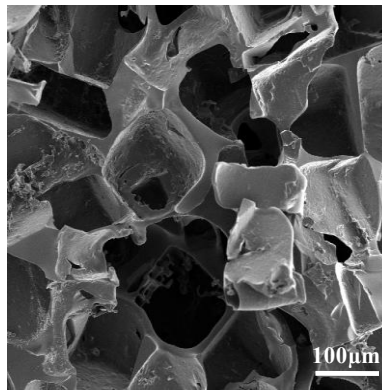
	Rezultate histologice bune	timp  Integrare incompletă în țesutul gazdă Posibila transmitere a bolilor prionice
Hialuronan [93, 94, 95, 96, 97]	Intră în alcătuirea cartilajului nativ O bună integrare în țesutul gazdă	Poate induce condroliza Cartilajul substituit este mai subțire ca cel nativ

Datorită posibilelor complicații date de reacțiile de antigenitate, resurselor insuficiente de polimeri naturali, și faptul că aproape nici un material natural nu îndeplinește aceleași proprietăți mecanice ca ale cartilajului articular, cercetătorii s-au orientat spre dezvoltarea polimerilor sintetici. În cazul folosirii materialelor sintetice avantajul major este constituit de faptul că se poate asigura un control asupra compoziției și consistenței, cu un risc scăzut de contaminare patogenică. Majoritatea polimerilor sintetici formează hidrogeluri, ca poli(alcool vinilic) (PVA), poli(etilen glicol) (PEO), și copolimerii de poli(etilen oxid) (PEO) și poli(propilen oxid) (PPO).

- 
89. Noguchi T., Oak M., Fujino M., Neo M., and Yamamuro T., *Repair of osteochondral defects with grafts of cultured chondrocytes: Comparison of allografts and isografts*, *Clinical Orthopedic Research* (1994), 302: 251-258.
90. Sams A.E., Minor R., Wootton J., Mohammed H., and Nixon A., *Local and remote matrix responses to chondrocyte-laden collagen scaffold implantation in extensive articular cartilage defects*, *Osteoarthritis Cartilage* (1995), 3: 61-70.
91. Samuel R. E., Lee C., Ghivizzani S., Evans C., Yannas I., Olsen B., and Spector M., *Delivery of plasmid DNA to articular chondrocytes via novel collagen-glycosaminoglycan matrices*, *Human Gene Therapy* (2002), 13: 791-802.
92. Sellers R. S., Zhang R., Glasson S., Kim H., Peluso D., D'Augusta D., Beckwith K., and Morris E., *Repair of articular cartilage defects one year after treatment with recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2)*, *Journal of Bone Joint Surgery* (2000), 82: 151-160.
93. Gao J., Dennis J., Solchaga L., Goldberg V., Caplan A., *Repair of osteochondral defect with tissue-engineered two-phase composite material of injectable calcium phosphate and hyaluronan sponge*, *Tissue Engineering* (2002), 8:827-837.
94. Grigolo B., Roseti L., Fiorini M., Fini M., Giavaresi G., Aldini N., Giardino R., and Facchini A., *Transplantation of chondrocytes seeded on a hyaluronan derivative (hyaff-11) into cartilage defects in rabbits*, *Biomaterials* (2001), 22: 2417-2424.
95. Knudson W., Casey B., Nishida Y., Eger W., Kuettner K., and Knudson C., *Hyaluronan oligosaccharides perturb cartilage matrix homeostasis and induce chondrocytic chondrolysis*, *Arthritis Rheumatism* (2000), 43: 1165-1174.
96. Marcacci M., Zaffagnini S., Kon E., Visani A., Iacono F., and Loreti I., *Arthroscopic autologous chondrocyte transplantation: Technical note*, *Knee Surgery Sports and Traumatology Arthroscopy* (2002), 10:154-159.
97. Solchaga L. A., Gao J., Dennis J., Awadallah A., Lundberg M., Caplan A., and Goldberg V., *Treatment of osteochondral defects with autologous bone marrow in a hyaluronan-based delivery vehicle*, *Tissue Engineering* (2002), 8: 333-347.

Cele mai utilizate matrici suport pentru substituția de cartilaj articular sunt polimerii hidrofilii în formă de bureți, rețelele fibroase și hidrogeluri. Acestea includ: poli( $\alpha$ -hidroxi esterii) (exemplu: poli(acid lactic), poli(acid glicolic)), poli(caprolactona) (PCL), poli(etilen glicol) (PEG) și copolimerii lor ca: poli(acid lactic-co-acid glicolic), poli(PEG-co-tereftalat) și poli(PEG-co-acid fumaric), poli(alcool vinilic), poli(2-hidroxietil metacrilat) [98,99].

În cazul bureților poroși (Figura 23), proprietățile lor depind de mărimea porilor, porozitate și interconectivitatea lor. Porozitatea influențează aria suprafeței pentru adeziunea celulară [100], în timp ce mărimea porilor și interconectivitatea lor influențează infiltrarea și migrarea celulară, și transportul nutrienților și a particulelor de uzură. Ca metode de sintetizare a acestor matrici se enumeră: uscarea, expandarea și liofilizarea. Însă aceste proceduri au un efect dăunător arhitecturii buretelui, care împiedică astfel formarea țesutului.



**Figura 23. Micrografie SEM specifică bureților poroși**

Rețelele fibroase (Figura 24) pot fi întreșute sau nu, în care volumul de goluri, diametrul fibrelor și direcția acestora afectează comportamentul celulelor. Pentru a obține anumite modele cu structură controlată se folosește tehnica depunerii 3D a fibrelor [101], iar electrofilarea este o tehnică folosită pentru a obține fibre la scară micro și nano, care să fie asemănătoare fibrelor de colagen din matricea extracelulară [102]. Fibrele sunt generate atunci când încărcarea de suprafață a picăturii de polimer depășește tensiunea sa de suprafață în condițiile aplicării unui câmp electric, ducând astfel la instabilitate, se va forma polimerul care va fi recuperat odată cu evaporarea solventului. Matricile astfel formate au o suprafețe

98. Frenkel S.R., Di Cesare P.E., *Scaffolds for articular cartilage repair*, Annals of Biomedical Engineering (2004), 32: 26–34.

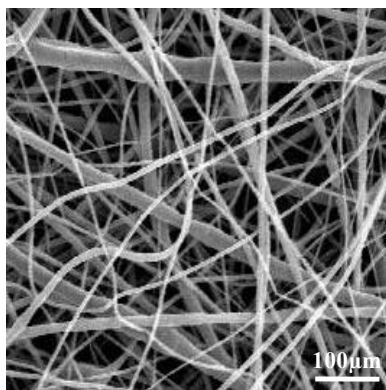
99. Temenoff J.S., Athanasiou K.A., LeBaron R.G., et al., *Effect of poly(ethylene glycol) molecular weight on tensile and swelling properties of oligo(poly(ethylene glycol) fumarate) hydrogels for cartilage tissue engineering*, Journal of Biomedical Materials Research (2002), 59:429–37.

100. Sontjens S.H.M., Nettles D.L., Carnahan M.A., Setton L.A., Grinstaff M.W., *Biodendrimer-based hydrogel scaffolds for cartilage tissue repair*, Biomacromolecules (2006), 7(1): 310-316.

101. Woodfield T.B., Malda J., de Wijn J., Peters F., Riesle J., van Blitterswijk C.A., *Design of porous scaffolds for cartilage tissue engineering using a three-dimensional fiber-deposition technique*, Biomaterials (2004), 25(18): 4149-61.

102. Li W.J., Danielson K.G., Alexander P.G., Tuan R.S., *Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds*, Journal of Biomedical Materials Research Part A (2003), 67A(4): 1105-1114.

mari în comparație cu volumul lor, și pori total interconectați, iar pentru a obține proprietăți heterogene, pot fi aliniați.



**Figura 24. Micrografie SEM specifică rețelelor fibroase**

Hidrogelurile sunt matrici care se umflă în mediu apos, care acceptă culturi de condrocite dar și încărcarea cu agenți bioactivi. Hidrogelurile injectabile pot acoperi orice formă și mărime a defectului de cartilaj, și pot fi implantate folosind o metodă minim invazivă.

Din punct de vedere al compoziției chimice materialele sub formă de hidrogeluri sunt constituite din: material polimeric (2%-80%), apă (20%-98%), auxiliari (0,1%-5%).

În calitate de auxiliari, hidrogelurile pot conține:

- acizi sau baze solubile în apă;
- săruri solubile sau insolubile în apă;
- agenți activi de suprafață;
- compuși biologic activ: medicamente, proteine, enzime;
- coloranți.

Din punct de vedere fizico-chimic, hidrogelurile sunt sisteme macromoleculare umflate cu solvent specific (apa sau soluții apoase). Pentru un sistem constituit din biopolimer reticulat și apă cantitate de solvent conținută este alcătuită din două componente: solventul fixat de polimer prin legături de solvatare și solventul liber nelegat, înglobat în ochiurile rețelei tridimensionale.

Hidrogelurile sunt sisteme destul de subtile care se echilibrează în mediu, suferind astfel multe modificări. Proprietățile unor asemenea geluri sunt puternic dependente de densitatea de reticulare și de conținutul de impurități, iar în cazul celor din polimeri sintetici de urmele de monomer, catalizator și stereospecificitatea polimerului.

Individualizarea hidrogelurilor de alte biomateriale se face pe baza următoarelor aspecte :

- sunt în general medii transparente – incolore sau colorate ;

- au volum și formă proprie ;
- sub acțiunea căldurii (uscarea) are loc o pierdere accentuată de masă însoțită de o puternică contracție de volum;
- la eforturi de comprimare de volum are loc contracția volumului și creșterea densității;
- la solicitări mecanice reduse au un comportament elastic pronunțat.

Pentru a menține structurile tridimensionale ale hidrogelului, literatura de specialitate indică reticularea fizică sau chimică a lanțurilor polimerice.

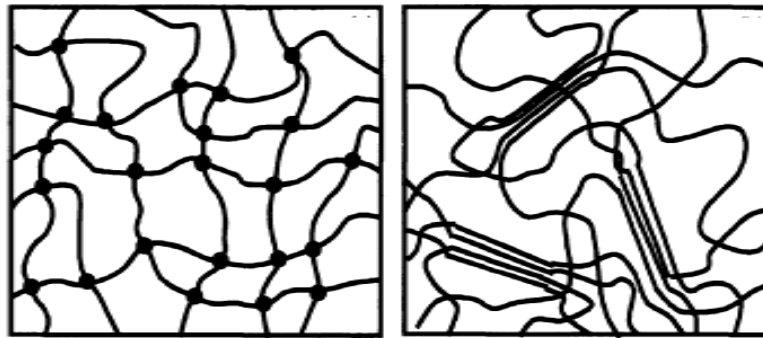
Prin natura lor hidratată, hidrogelurile au o structură asemănătoare cartilajului articular. Unele materiale de acest tip au o hidrofilie mare datorită grupărilor moleculare încărcate [103].

De asemenea, au un coeficient de frecare mic și un comportament vâscoelastic, deși rigiditatea este mică. De asemenea, acestea susțin fenotipul condrocitar mult mai bine decât rețelele 2D.

Pentru a preveni dizolvarea lanțului polimeric hidrofilic în mediu apos, hidrogelurile trebuie să fie reticulate. Reticularea lor poate să fie (Figura 25):

- chimică, prin legături covalente, rezultând așa-numitele hidrogeluri permanente. *Hidrogelurile fizice* se obțin atunci când se formează o rețea intermoleculară, prin intermediul forțelor ionice, de hidrogen sau hidrofobe. Hidrogelurile fizice nu sunt omogene, deoarece asociatele de tip cluster sau cele ionice creează discontinuități. Lanțurile polimerice sunt conectate prin legături covalente și astfel este dificilă schimbarea formei acestor geluri
- fizică, prin intermediul a diverse tipuri de legături moleculare și/sau forțe secundare, ca cele ionice sau legături de hidrogen sau interacțiuni hidrofobe. *Hidrogelurile chimice* sau permanente, sunt rețele reticulate prin legături covalente. Acestea pot fi obținute prin reticularea polimerilor solubili în apă, sau prin coversia polimerilor hidrofobi în polimeri hidrofilii, care apoi sunt reticulați. În stare reticuată, hidrogelurile ating o hidratare (umflare) de echilibru, în soluții apoase, care depind în principal de densitatea reticulărilor, estimată prin masa moleculară. Lanțurile polimerice formează legături necovalente (Van der Waals, legături ionice, legături de hidrogen sau interacțiuni hidrofobe).

103. Vinatier C., Guicheux J., Daculsi G., et al., *Cartilage and bone tissue engineering using hydrogels*, Biomedical Materials Engineering (2006), 16: S107–S113.



a)

b)

**Figura 25. Reprezentarea schematic a hidrogelurilor:**

a) reticulate chimic

b) reticulate fizic

Ca și hidrogelurile fizice, cele chimice nu sunt omogene, mai conțin regiuni cu grad de hidratare mai redus și cu densități mari de reticulare, denumite *clusteri*. Aceste domenii sunt dispersate în porțiunile structurale puternic hidratate și cu densitate scăzută de reticulare. Astfel, în timpul formării pot apărea separări de faze sau pot apărea goluri sau macropori care depind de compoziția hidrogelului, de solventul folosit și de temperatură.

În gelurile chimice, lanțurile terminale libere reprezintă defecte ale rețelei semisolide din care se formează, deoarece ele nu contribuie la proprietățile elastice ale hidrogelului. În același sens acționează și alte defecte reprezentate de noduri și ghemuri ale lanțurilor terminale.

Din punct de vedere structural hidrogelurile fizice sau chimice pot avea configurații macromoleculare foarte variate, cum ar fi:

- rețele reticulate din nanopolimeri liniari, copolimeri liniari, copolimeri bloc și grefați;
- copolimeri legați prin legături de hidrogen etc.

Hidrogelurile pot avea și forme fizice diferite:

- solide matrițate (lentile de contact);
- matrici din pulberi presate (tablete sau capsule pentru administrare orală);
- microparticule (bioadezivi, transporturi de medicamente);
- membrane sau filme (depozite pentru eliberarea transdermică a medicamentelor) sau geluri pentru electroforeză 2D;
- solide încapsulate (pompe osmotice);
- lichide ce formează geluri prin încălzire sau răcire.

Pentru obținerea hidrogelurilor reticulate fizic, reticularea se poate realiza prin mai multe metode:

- prin interacții ionice, în cazul polimerilor ionici;
- prin inducerea formării de cristalite, ce joacă rolul nodurilor de rețea în polimerul hidrosolubil;
- prin formarea de stereocomplecși;
- prin asocierea lanțurilor hidrofobe în copolimerii bloc și grefați amfifilici;
- prin intermediul legăturilor de hidrogen;
- prin interacțiunea cu proteinele;
- prin interacții antigen - anticorp.

În cazul hidrogelurile reticulate chimic, concentrația de monomer, metoda de reticulare și densitatea reticulantului influențează proprietățile fizice și chimice ale hidrogelurilor.

Hidrogelurile reticulate chimic se obțin prin:

- homo sau copolimerizarea, în marea majoritate a cazurilor prin mecanism radicalic, a unor (macro)monomeri ce formează polimeri solubili în apă. Evident, pentru obținerea rețelei, este necesară prezența unui (co)monomer cu două sau mai multe grupări polimerizabile. În multe cazuri, pentru evitarea utilizării inițiatorilor sau activatorilor potențial toxici, polimerizarea este inițiată prin iradiere cu radiații de energie mare (cel mai adesea radiații  $\gamma$  sau  $\beta$ ).
- reacția de policondensare sau poliadiție ale unor compuși cu grupe funcționale antagoniste la capete, între care există și compuși cu funcționalitate mai mare de 2.
- reacții polimer analoge, la grupele funcționale ale unui polimer preformat, solubil în apă (de exemplu reticularea alcoolului polivinilic cu aldehide).
- reticularea polimerilor preformați prin iradiere cu radiații de energie ridicată, când au loc ruperi de catene și recombinații ale macro radicalilor formați.

Hidrogelurile sunt flexibile/maleabile atât timp cât lanțul polimeric are o mare mobilitate datorată prezenței apei. Proprietățile mecanice ale hidrogelurilor sunt dependente de conținutul de apă. Modulul de elasticitate și limita de curgere descrește cu conținutul de apă, în timp ce elongația tinde să crească. Hidrogelurile sunt lubrifiante datorită caracterului lor hidrofil. Hidrogelurile rezistă absorbției proteinelor și atacului microbial datorită caracterului hidrofil și structurii dinamice.

Hidrogelurile joacă un rol important în eliberarea controlată a medicamentelor: pot elibera controlat agenți bioactivi, ca peptidele și proteinele. De asemenea hidrogelurile au fost menționate că promovează repararea tisulară precum și regenerarea.

Au fost folosite mai multe metode de fabricare și modificare a suprafeței astfel încât să se obțină produși în diverse formulări, cu scopul de a îmbunătăți comportamentul celular, de a permite un mediu favorabil pentru integrarea țesutului.

De asemenea, matricile 3D au devenit din ce în ce mai folosite în acest scop, datorită faptului că au rezultate favorabile atașării celulare și au stabilitate în ceea ce privește proprietățile mecanice.

Exemple de utilizări relativ curente ale hidrogelurilor pe baza de p(HEMA) în medicina și farmacie sunt lentilele de contact, pansamentele pentru vindecarea arsurilor sau a altor răni greu de vindecat, plasturi aplicabili pe piele pentru eliberarea controlată a diverse medicamente, etc. Alte potențiale aplicații sunt: materiale pentru tendoane artificiale, membrane pentru rinichi artificiali, cartilaje articulare, piele artificială, materiale pentru înlocuirea corzilor vocale.

Proprietățile hidrogelurilor sunt destul de apropiate de ale gelurilor biologice naturale și ale țesuturilor. Adaugând și proprietățile de volum, acestea sunt foarte convenabile pentru aplicații medicale și farmaceutice. Astfel există multe similitudini între interfața gel/apă și celule vii/soluții fizilogice.

### **I.3.3. Hidrogeluri pe bază de p(HEMA)**

Hidrogelurile sunt rețele polimerice, alcătuite din polimeri hidrofilii, ce absorb și rețin o mare cantitate de apă [104]. De la lucrarea de pionierat a lui Wichterle și Lim [105] din 1960 asupra hidrogelurilor pe bază de p(HEMA), domeniul s-a dezvoltat continuu și se dezvoltă în continuare exploziv, datorită aplicațiilor multiple și importante pe care hidrogelurile le au, în special în medicina și farmacie [106, 107, 108].

104. Peppas N. A., *Hydrogels*, in *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*, 2-nd edition, ED: Ratner B. D., Hoffman A. S., Schoen F. J., Lemons J. E., Academic Press, New York (2004), p. 100.

105. Wichterle O., Lim D., *Hydrophilic gels in biologic use*, Nature (1960), 185: 117.

106. Hoffman A. S., *Hydrogels for biomedical applications*, Advance in Drug Delivery Research (2002), 43: 3.

107. Langer R., Peppas N. A., *Advances in biomaterials, drug delivery and bionanotechnology*, AIChE Journal (2003), 49: 2990.

108. Kashyap N., Kumar N., Ravi Kumar M.N.V., *Hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications*, Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems (2005), 22: 107.



În medicina și farmacie, principalele utilizări ale hidrogelurilor în domeniul biosenzorilor, eliberării controlate a medicamentelor și regenerării țesuturilor se datorează proprietăților remarcabile pe care acestea le au printre care: [109]:

- conținutul lor de apă și elasticitatea le face similare cu țesutul natural din punct de vedere al interacțiunilor biologice la nivel molecular;
- furnizează suprafețe inerte (pentru diversele dispozitive implantabile) care previn adsorbția nespecifică a proteinelor (antifouling);
- moleculele biologice pot fi legate covalent de hidrogeluri prin intermediul unor reacții chimice bine controlate;
- proprietățile mecanice și gradul de umflare în apă ale hidrogelurilor pot fi reglate relativ ușor, de exemplu prin modificarea densității de reticulare;
- hidrogelurile pot fi proiectate să-și modifice proprietățile sub acțiunea unor stimuli externi, cum ar fi temperatura, pH etc.

### I.3.3.1 Structura p(HEMA)

Polimerii de p(HEMA) (Figura 26) și copolimerii săi sunt materiale hidrofile care, după imbițiția cu apă până la o stare de echilibru, se comportă ca un gel elastic. În această formă sunt cunoscute sub numele de hidrogel [110].

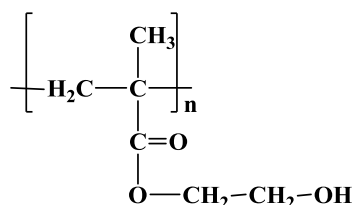


Figura 26. Structura chimică a p(HEMA)

Atât monomerul HEMA cât și polimerii săi p(HEMA) au fost descoperiți și patentați în 1934, însă proprietățile acestora de absorbție a apei au fost descoperite abia în 1951, când p(HEMA) a fost recunoscut ca un biomaterial polimeric promițător.

Prima și cea mai de succes aplicație a hidrogelurilor pe bază de HEMA au fost în domeniul oftalmologic, pentru lentilele de contact hidrofile, cu rezultate clinice excelente. Astăzi hidrogelurile din polimeri de HEMA au multiple aplicații biomedicale.

109. Ulijin R.V., Bibi N., Jayawarna V., Thornton P.D., Todd S. J., Mart R.J., Smith A. M., Gough J.E., *Bioresponsive hydrogels*, *Materials Today* (2007), 10: 40.

110. Peppas N.A., Moynihan H.J., Lucht L.M., *The structure of highly crosslinked poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels*, *Journal of Biomedical Materials Research, Part A* (1985), 19(4): 397–411.

Hidrogelurile transparente de p(HEMA) permit difuziunea lichidelor, ceea ce sugerează existența unei structuri poroase. Se impun însă câteva precizări, și anume: în cazul gelurilor produse prin polimerizare în absența unui solvent - polimerizarea în masă - difuziunea lichidelor este posibilă doar prin spațiile dintre lanțurile macromoleculare, de aceea dimensiunea porilor este de fapt de ordin molecular. Trecerea lichidelor prin gelurile de p(HEMA) astfel polimerizate se face prin mecanisme pur difuzionale, de aceea, de fapt, acest tip de polimeri nu sunt considerați materiale poroase.

Când p(HEMA) este produsă prin polimerizarea în prezența unui diluant, neatingându-se însă capacitatea maximă de îmbibare a polimerilor rezultați, spațiile dintre lanțuri vor crește semnificativ pe măsură ce cantitatea de dilueant crește. Astfel, dimensiunea spațiilor intermoleculare crește și acestea pot să fie considerate cu adevărat pori.

Convențional, gelurile din p(HEMA) sunt clasificate în:

- microporoase, cu pori între 10 - 50 nm;
- macroporoase, cu pori între 100 nm - 1 micron.

Pe măsură ce dimensiunea porilor crește, mecanismul predominant de trecere a lichidelor prin polimer devine convecția.

Hidrogelurile p(HEMA) neporoase și microporoase sunt întotdeauna transparente și sunt denumite geluri omogene. Hidrogelurile macroporoase pot fi transparente sau opalescente, în funcție de dimensiunea și distribuția porilor. Cele macroporoase opalescente au fost denumite materiale heterogene.

Există și o altă posibilitate de polimerizare, și anume în prezența unui diluant care depășește capacitatea maximă de îmbibare a polimerului.

S-a studiat situația în care apa a fost atât diluantul în timpul polimerizării cât și agentul de îmbibare folosit după polimerizare. Deoarece apa nu este solvent pentru polimer, atunci când concentrația în amestecul polimeric depășește o valoare critică, datorită interacțiunilor termodinamice dintre apă și rețeaua polimerică, se va produce separarea fazelor într-un anumit moment în timpul polimerizării și, ca urmare, hidrogelurile vor fi opace. Concentrația critică a apei pentru aceasta este în jur de 45%.

Caracteristicile porilor hidrogelurilor pe bază de p(HEMA) - mărimea, morfologia și contiguitatea - pot fi controlate prin cantitatea de apă din amestecul monomeric inițial. Hidrogelurile astfel obținute, deși pot avea pori adecvați pentru a permite invazia și creșterea tisulară, au o rezistență mecanică scăzută [111]. S-a încercat îmbunătățirea proprietăților

---

111. Barnes A., Corkhill P.H., Tighe B.J., *Synthetic hydrogels: 3. Hydroxyalkyl acrylate and methacrylate copolymers: surface and mechanical properties*, Polymer (1988), 29(12): 2191-2202.

mecanice ale hidrogelurilor, și astfel s-a ajuns la necesitatea copolimerizării sau a folosirii de agenți specifici de polimerizare.

Modificarea proprietăților mecanice s-a dovedit a fi dificilă deoarece crescând rezistența mecanică se pot influența negativ și caracteristicile porilor. Studiarea caracteristicilor mecanice ale hidrogelurilor de p(HEMA) a dus la concluzia că separarea fazelor și gelația chimică sunt cele care dictează mărimea particulelor polimerice care constituie hidrogelurile. Cei doi parametri, debutul separării fazelor și punctul de gelifiere, sunt influențate de condițiile de polimerizare: temperatura, concentrația și natura inițiatorilor polimerizării și a agenților de polimerizare mixtă. În cazuri extreme, când debutul separării fazelor este mult diferit de punctul de gelifiere într-un sistem de polimerizare dat, poate avea loc un efect secundar care duce la obținerea de hidrogeluri neuniforme.

### **1.3.3.2. Caracteristici fizico-chimice și mecanice**

Hidrogelurile pe bază de p(HEMA) sunt termosensibile și nu se degradează sub acțiunea enzimelor sau a soluțiilor acide sau bazice datorită legăturilor -C-C- din lanțurile macromoleculare. Sunt neutre din punct de vedere ionic până la o concentrație în apă de 40%.

Hidrogelul p(HEMA) prezintă lanțuri polimerice metacrilate reticulate cu lanțuri mici de hidroxietil, care sunt hidrofile datorită sarcinilor lor negative -O-. Această structură comparabilă cu cea a cartilajului care are fibre colagenice reticulate de ansamblurile de PG, care sunt hidrofile datorită sarcinilor negative SO<sub>3</sub><sup>-</sup> și COO<sup>-</sup>.

Hidrogelurile pe bază de p(HEMA), în forma simplă, nu prezintă proprietăți mecanice adecvate solicitărilor la care sunt supuse. Din acest motiv, s-a introdus un element hidrofil în rețeaua polimerică, ceea ce a dus la obținerea proprietăților biomecanice necesare. Au fost studiate materiale ca polimetacriilați, acriilați, celuloză modificată sau poliuretani pentru incorporarea în rețeaua de polimer, în scopul obținerii de hidrogeluri cu proprietăți biomecanice îmbunătățite.

În stare uscată, p(HEMA) este un material dur și friabil. În urma umflării, acesta devine moale și flexibil, putând fi tăiat ușor cu bisturiul sau cu foarfecele.

Umflarea p(HEMA) este strict dependentă de temperatură și de mediul de umflare. Gradul de umflare este determinat și de procentul grupărilor hidrofile și a celor hidrofobe, distanța dintre legături, precum și de dimensiunea și distribuția matricei. După cum sugerează și denumirea de „hidrogel”, conținutul de apă joacă un rol important în determinarea proprietăților p(HEMA). Conținutul de apă poate fi mărit prin copolimerizarea cu un monomer ce are hidrofilie mai accentuată și poate fi diminuat prin copolimerizare cu un monomer hidrofob.

Coeficientul de permeabilitate pentru oxigen are o creștere exponențială, pe măsură ce crește conținutul de apă.

Conținutul mare de apă al p(HEMA) determină rezistență mecanică scăzută, de aceea se urmărește obținerea unui hidrogel cu un conținut optim de apă, astfel încât să aibă proprietăți mecanice adecvate scopului în care va fi utilizat.

Datorită stabilității mecanice, indicelui de refracție ridicat și permeabilității pentru oxigen, p(HEMA) a fost folosit cu succes în oftalmologie, pentru fabricarea de lentile de contact moi, cristalin artificial sau cornee artificiale.

### **I.3.4. Proprietățile de volum ale hidrogelurilor**

Proprietățile de volum, ca gradul de umflare fac posibilă elucidarea mecanismelor de umflare și osmotice din țesuturile biologice, precum și aplicarea hidrogelurilor p(HEMA) ca implanturi care se umflă, pe când permeabilitatea la substanțe cu masă moleculară mică, solubile în apă, fac gelurile convenabile pentru eliberarea controlată a medicamentelor sau pentru transportul unor substanțe dizolvate immobilizate în gel, cum sunt enzimele.

Gradul de reticulare este unul dintre cei mai importanți factori care afectează umflarea hidrogelurilor. Este definit ca raportul dintre numărul de moli de agent de reticulare și numărul de moli de unități ce se repetă în structura polimerului. Gradul de reticulare este cu atât mai mare cu cât cantitatea de agent de reticulare în structura hidrogelului este mai mare.

Hidrogelurile mai reticulate au o structură mai densă și se umflă mai puțin, comparativ cu aceleași hidrogeluri cu grad mai mic de reticulare. Reticularea împiedică mobilitatea lanțului polimeric, micșorând gradul de umflare.

De asemenea, structura chimică a polimerului poate afecta gradul de umflare al hidrogelului. Hidrogelurile cu conținut mare de grupări hidrofile au un grad mare de umflare, comparativ cu cele care conțin grupări hidrofobe. Grupările hidrofobe se rup în prezența apei, împiedicând accesul moleculelor de apă. Aceste hidrogeluri se vor umfla mai puțin decât cele care conțin grupări hidrofile.

Cinetica de umflare a hidrogelurilor poate fi clasificată ca și umflarea prin difuzie controlată conform legii lui Fick și relaxare controlată care nu respectă această lege. Când difuzia apei în hidrogel are loc mai repede decât relaxarea lanțului polimeric, cinetica de umflare este controlată prin difuzie.

Umflarea hidrogelurilor sensibile la temperatură poate fi afectată de schimbări ale temperaturilor mediului de umflare. Tăria ionică și pH-ul afectează umflarea hidrogelurilor.

### I.3.5. Proprietățile mecanice ale hidrogelurilor

Proprietățile mecanice ale hidrogelurilor p(HEMA) sunt foarte importante pentru aplicațiile medicale. Un sistem de cedare a medicamentelor destinat să protejeze un agent terapeutic sensibil, trebuie să-și mențină integritatea, pentru a fi capabil să protejeze medicamentul până aceasta este eliberat în afara sistemului.

Schimbarea gradului de reticulare a dus la obținerea proprietăților mecanice dorite ale hidrogelurilor. Creșterea gradului de reticulare al sistemului va avea ca rezultat un gel mai tare. Totuși, un grad mai mare de reticulare creează o structură mai fragilă. Există un grad optim de reticulare care realizează un hidrogel elastic și relativ rezistent. De asemenea, a fost utilizată copolimerizarea pentru a realiza proprietățile mecanice dorite ale hidrogelurilor. Incorporarea unui co-monomer care va contribui la formarea legăturilor de hidrogen, va mări rezistența hidrogelului.

Pentru a determina proprietățile mecanice ale hidrogelurilor sunt folosite mai multe metode ca: extensiometria, teste de comprimare, teste de forfecare și indentarea.

#### I.3.5.1. Extensiometria

În prezent cea mai utilizată metodă pentru determinarea proprietăților mecanice ale hidrogelurilor sunt testele de tracțiune sau extensiometria în bandă. Aceste metode au fost foarte mult folosite pentru determinarea proprietăților mecanice ale hidrogelurilor [112]. Tehnica implică aplicarea unei forțe de tracțiune asupra unui material fixat în două cleme (Figura 27a). De asemenea, forța de tracțiune mai poate fi aplicată unui hidrogel cu formă de inel, în locul unei benzi (Figura 27b).

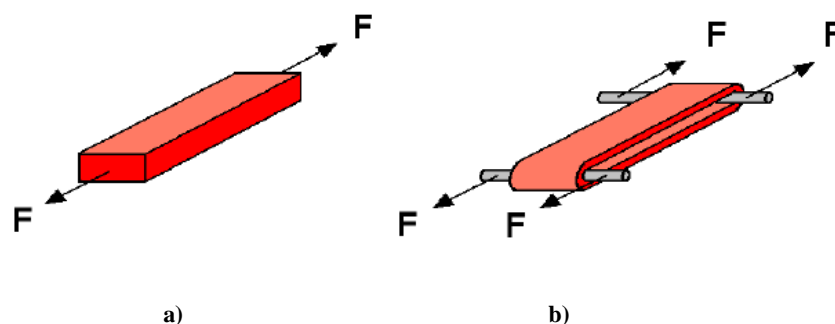


Figura 27. Tehnici de caracterizare mecanică a hidrogelurilor:

- a) extensiometria în bandă;
- b) extensiometria în inel.

112. Jeffrey L., Hinkley A., Morgret L.D., Gehrke S.H., *Tensile properties of two responsive hydrogels*, Polymer (2004), 45: 8837-8843.

Forța aplicată și alungirea sunt folosite pentru a obține curbe de tensiune-deformare. Metoda are câteva neajunsuri, printre care faptul că se pot utiliza numai benzi și inele de hidrogel, măsurătorile se pot face doar o singură dată pe fiecare hidrogel de testat, neparalelismul clemelor, iar alungirea se face doar uniaxial. Prin natura distructivă a acestei metode, este foarte dificil să se urmărească evoluția în timp a proprietăților mecanice, care este un parametru foarte important în ingineria tisulară.

### I.3.5.2. Rezistența la compresiune

Testele de compresiune sunt realizate pentru determinarea proprietăților mecanice ale hidrogelurilor în compresiune [113, 114]. Această tehnică presupune comprimarea hidrogelului între două platane (Figura 28).

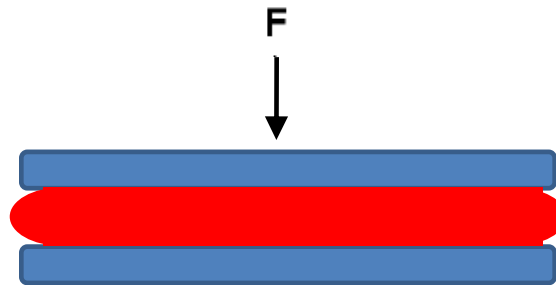


Figura 28. Tehnici de caracterizare mecanică a hidrogelurilor: test de compresiune

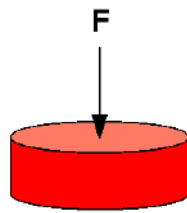
Forța aplicată la suprafața hidrogelului și deformația hidrogelului sunt folosite pentru a calcula o caracteristică importantă a hidrogelurilor folosite în ingineria tisulară a cartilajului articular: modulul de elasticitate. Unul din avantajele acestei metode față de extensiometrie este că nu limitează hidrogelul la o anumită geometrie (bandă, inel), însă suprafața hidrogelului trebuie să fie plană. Un alt avantaj al acestei metode îl constituie faptul că nu este distructivă și se poate urmări evoluția în timp a proprietăților mecanice.

### I.3.5.3. Testul de indentare

Testul de indentare a devenit o metodă foarte importantă pentru caracterizarea proprietăților mecanice ale hidrogelurilor. Această tehnică constă în indentarea într-un singur punct cu o anumită deformație și măsurarea forței care cauzează indentarea (Figura 29).

113. Svensson A., Nicklasson E., Harrah T., Panilaitis B., Kaplan D.L., Brittberg M., Gatenholm P., *Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage*, Biomaterials (2005), 26: 419-431.

114. Awad H.A., Wickham Q.M., Leddy H.A., Gimble J.M., Guilak F., *Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells în agarose, alginate and gelatin scaffolds*, Biomaterials (2004), 25: 3211-3222.



**Figura 29. Tehnici de caracterizare mecanică a hidrogelurilor: test de indentare**

Cel mai des se folosește un identor conectat la un traductor de forțe care înregistrează forța necesară indentării. Pentru a calcula modulul elastic al materialului se va trasa o curbă forță-deplasare. În acest tip de test geometria vârfului identorului joacă un rol important în determinarea rezistenței mecanice ale hidrogelurilor [115]. Recent, progresele tehnologice au făcut posibil indentarea la scară nano [116]. Identarea are o serie de avantaje în comparație cu celelalte metode convenționale de caracterizare mecanică [117]. Identarea permite un timp de măsurare mic, poate fi folosit pentru a măsura proprietățile mecanice în diferite zone ale suprafeței materialului. Folosește eșantioane de dimensiuni mici, și este o metodă nedistructivă.

## I.4. Concluzii

1. Proprietățile mecanice unice ale cartilajului ca suprafață portantă rezultă atât din proprietățile sale structurale cât și compoziția chimică a matricei extracelulare. Țesutul cartilagos este considerat în general ca un sistem bifazic. Prima fază este solidă: sunt componentele macromoleculare ale matricei care formează un material poros și permeabil. Acesta este compus din fibre de colagen, legate împreună de proteine ne-colagenice și proteoglicani legați necovalent. A doua fază este lichidă: este compusă din lichid interstitial și ioni. Se consideră că componentele solide rezistă forțelor de întindere, forfecare și deformare, în timp ce lichidul rezistă presiunilor hidrostatice ridicate. Principali parametri care caracterizează comportamentul mecanic global al cartilajului articular sunt:

115. Mirshams R.A., Pothapragada R.M., *Correlation of nanoindentation measurements of nickel made using geometrically different indenter tips*, Acta Materials (2006), 54: 1123-1134.

116. Whitehead A.J., Page T.F., *Nanoindentation studies of thin film coated systems*, Thin Solid Films (1992), 220: 277-283.

117. Merino J.C., Martin B., Pastor J.M., *Mechanical indentation tester designed to control and measure in real-time the microhardness process*, Measurement Science Technology (1991), 2: 740-743.

- **Modulul de elasticitate global** (0,5-1 MPa) măsurat în urma experimentelor de compresiune după stabilizarea migrației de apă și ioni în matricea cartilaginoasă,
- **Coefficientul de frecare.** Cartilajul este un material compus dintr-o fază solidă și o fază fluidă. Cele două faze, studiate separat, sunt considerate a fi incompresibile ceea ce implică coeficienți Poisson apropiați de valoarea 0,5. În plus, migrația fazei fluide în afara cartilajului în urma solicitărilor mecanice reduce coeficientul Poisson la 0,2, dar, această valoare depinde de permeabilitatea cartilajului care poate fi modificată de către ansamblurile moleculare ale sinoviei.
- **Permeabilitatea.** Valorile permeabilității sunt cuprinse între 10-16 m<sup>4</sup>/N.s și 10-15 m<sup>4</sup>/N.s, pentru o grosime de 1mm de cartilaj supus la o diferență de presiune hidrostatică de 2MPa și este dată de efectele fizico-chimice (osmotice și electrice) și nu efectele mecanice (poro-elasticitate). Atâta timp cât metodele de tratament actuale nu pot asigura reparația cartilajului articular pe termen lung, cercetătorii au găsit ca soluție ingineria tisulară. Scopul ingineriei tisulare a cartilajului articular este să se folosească celule, matrici, factori de semnal, singure sau în combinație unele cu altele, pentru a sintetiza *in vitro* un material care să fie echivalent cu cartilajul articular sănătos, atât din punct de vedere structural cât și funcțional.

2. Până în prezent, o varietate de materiale (naturale sau sintetice) au fost studiate ca potențiale produse ale ingineriei tisulare a cartilajului articular. Materialele naturale pot adesea interacționa cu celulele, dar, au, în același timp o serie de dezavantaje legate de răspunsul imun și proprietățile mecanice necorespunzătoare cu cele ale cartilajului articular. Astfel că, materialele sintetice au fost propuse ca și candidate pentru ingineria tisulară a cartilajului articular, pentru că structura lor poate fi controlată astfel încât să putem anticipa anumite proprietăți chimice și fizice specifice, pentru a putea obține anumite caracteristici mecanice. Aceste biomateriale pot fi sintetizate într-o varietate de matrici (bureți, rețele și hidrogeluri). Rețelele și bureții sintetici sunt matrici 2D care au o porozitate foarte mare (>90%), și nu pot asigura funcțiile mecanice, însă pot servi ca o modalitate de transport ai celulelor sau diferiților factori [118].

3. Din punct de vedere istoric, implanturile de biomateriale au fost desemnate să înlocuiască o funcție specifică, de obicei mecanică, și a fost considerat ca fiind ideal dacă se reușește să se obțină un răspuns favorabil *in vivo*. Din toate biomaterialele polimerice, hidrogelurile au un interes special datorită favorabilei lor biocompatibilități precum o mulțime de alte avantaje. Hidrogelurile sunt materiale care se umflă atunci când sunt într-un mediu

118. Li W.J., Jiang Y.J., Tuan R.S., *Chondrocyte phenotype in engineered fibrous matrix is regulated by fiber size*, Tissue Engineering (2006), 12:1775–1785.



apos, dar își mențin forma totală. Hidrogelurile pot fi sintetizate prin reticularea oricărui polimer solubil în apă.

4. Structura complexă a cartilajului articular a dus la căutarea printre materialele artificiale a unui substituent, care să respecte cât mai mult posibil proprietățile sale mecanice cât și fizico-chimice. Atenția a fost îndreptată spre materialele polimerice foarte hidrofile de tip hidrogel datorită volumului mare de apă a cartilajului articular. Aceste materiale sunt cele care permit repararea leziunilor cartilajului articular. Cele mai des folosite sunt PAV și p(HEMA).

5. PVA este un material nonimunogenic și nontoxic. Grupările hidroxil din PVA îi conferă caracterul hidrofil cu o structură semicristalină dată de legăturile de hidrogen. Cu toate acestea, PVA nu are rezistența și reziliența necesară pentru un material de substituție a cartilajului articular.

6. În cazul cartilajului articular, cea mai importantă aspect constă în abilitatea de a rezista forțelor de forfecare și compresiune de la nivelul articulației. Din punct de vedere a proprietăților mecanice, cei mai indicați sunt copolimerii metacriilați care se pretează la astfel de cerințe. Dintre aceștia, un loc important ca și component al hidrogelurilor de uz biomedical îl ocupă p(HEMA) datorită proprietăților sale remarcabile: lipsa de toxicitate și biocompatibilitate fiind folosit ca produs comercial (lentile de contact). În plus, sinteza acestor hidrogelurile pe bază de p(HEMA) se face într-un timp scurt, fără a necesita o aparatură complicată, precum și un cost redus. Hidrofilia lor poate fi ușor modificată utilizând diferiți co-monomeri.

7. Hidrogelurile pe bază p(HEMA) au fost folosite pentru protezarea țesuturilor moi, datorită caracteristicilor de biocompatibilitate, permeabilitate mare față de moleculele mici, hidrofilicitate mare și consistență moale. În plus, p(HEMA) are un conținut de apă similar cartilajului articular, prezintă rezistență la degradare, nu este absorbit de organism, suportă sterilizarea prin încălzire fără afectarea structurii și se poate obține într-o varietate mare de forme.

8. În cadrul tezei de doctorat alegerea s-a făcut pentru hidrogelurile pe bază de p(HEMA), a căror hidrofilie a fost modificată cu diferiți co-monomeri pentru a obține un comportament fizico-chimic și mecanic asemănător cu cel al cartilajului articular. Pentru a evita necroza celulară după implantare, așa cum se întâmplă în cazul grefelor autologe și alogrefelor, precum și în cazul unor polimeri naturali [119], în cadrul acestei teze de doctorat alegerea s-a făcut pentru hidrogelurile fără culturi de celule.

---

119. Ingram J.H., Korossis S., Howling G., Fisher J., Ingham E., *The use of ultrasonication to aid recellularization of acellular natural tissue scaffolds for use in anterior cruciate ligament reconstruction*, Tissue Engineering (2007), 13(7): 1561–1572.

# CAPITOLUL II

## STRATEGIA EXPERIMENTALĂ

*”Există trei principale mijloace de obținere a cunoștințelor:  
observarea, meditația, și experimentarea. Observarea colectează  
fapte; meditația le combină; experimentarea verifică  
rezultatul acestei combinații”*

*Claude Bernard (1813 - 1878)*

### II.1. CONCEPT EXPERIMENTAL

O mare varietate de biomateriale sunt utilizate astăzi în chirurgia plastică și reconstructivă, stomatologie și refacerea mușchilor, oaselor și cartilajului articular.

Polimerii candidați pentru utilizări biomedicale trebuie să prezinte o serie de caracteristici legate de structura lor fizico-chimică și mecanică (proprietăți chimice și mecanice) și de interacțiunea cu mediului fiziologic unde vor fi utilizați (condiții fiziologice). Deși se află la dispoziție un număr mare de materiale polimerice, biocompatibilitatea și proprietățile mecanice au restrâns sever numărul actual de polimeri ce pot fi folosiți în domeniul medical. Evaluarea performanțelor acestor polimeri este imperios necesar a se realiza în condiții de testare care să imite condițiile fiziologice, astfel încât rezultatele evaluării să descrie cât mai fidel comportarea *in vivo* a materialului.

Biomaterialele trebuie să fie aiba un grad mare de puritate și de aceea precursorii și materiile prime folosite trebuie să aibă un grad mare de puritate, și, de asemenea, folosirea unor aditivi nu este recomandată. Pentru o perioadă mai scurtă sau mai lungă de timp, migrarea acestor componente la țesuturile adiacente și fluidele biologice este nedorită, de aceea compușii nereacționați trebuie eliminați înainte de utilizare.

O serie de proprietăți favorabile ale polimerilor pot fi obținute nu prin utilizarea de aditivi ci prin varierea structurii chimice, de exemplu prin alegerea utilizării de de copolimeri și polimeri reticulați adecvați, în locul homopolimerilor.

Odată sintetizate, biomaterialele trebuie să îndeplinească numeroase cerințe, descrise ca fiind proprietățile chimice și mecanice ale polimerilor. Parametrii de interes includ: geometria dispozitivului implantului, gradul de umflare la echilibru, proprietățile elastice,

răspunsul la solicitări de forfecare, comportarea vâsco-elastică în timp, posibilitatea de a îngloba și transporta principii active.

Analizând rezultatele științifice din domeniul dispozitivelor medicale utilizate pentru substituția cartilajului s-a optat pentru lucrarea de față la o strategie de cercetare care a avut ca obiectiv central:

## STUDIUL MODIFICĂRII HIDROFILIEI HIDROGELURILOR PE BAZĂ DE P(HEMA) ASUPRA PROPRIETĂȚILOR FIZICO-CHIMICE, MECANICE ȘI DE UTILIZARE CA SUBSTITUENT DE CARTILAJ ARTICULAR

Mergând după aceste principii, s-a ales ca îmbunătățirea proprietăților hidrogelurilor pe bază de p(HEMA) să se realizeze prin introducerea în matricea tridimensională atât a unor comonomeri cu caracter puternic hidrofil (acid acrilic-AA, acrilamidă-AAm) sau hidrofob (acrilat de etil - AE, acrilat de butil - AB). Atât monomerii hidrofilii cât și cei hidrofobi au o rezistență mare la agenți de oxidare și reducere. De asemenea acești monomeri au o rezistență mare la degradare sub acțiunea radiației laser și UV, precum și la degradarea termică.

Având în vedere caracterul foarte hidratat al cartilajului articular, s-a optat pentru realizarea de rețele tridimensionale prin copolimerizarea monomerilor HEMA cu unul dintre monomerii AA, AAm, AE sau AB cu un monomer bifuncțional cu rol de reticulant, tetraetilenglicol diacrilat (TEGDA). Ca sistem de inițiere pentru reacția de copolimerizare s-a utilizat un sistem redox format din persulfat de amoniu (APS) și N,N,N',N'-tetraemtililen diamină (TEMED).

Caracterul hidrofil-hidrofob a fost controlat prin modificarea cantității de comonomer luată în experimentare, în timp ce cantitatea de agent de reticulare (TEGDA) s-a păstrat constantă. Sistemul de inițiere s-a utilizat la o concentrație de 1 moli% față de amestecul total de monomer.

Caracterizarea hidrogelurilor a avut drept scop analiza compozițională și structurală a materialelor sintetizate (pectroscopie în infraroșu, degradare termică, precum și determinarea de tensiunii superficiale), analiza morfologică (microscopie electronică de baleiaj-SEM), evaluarea proprietăților de interacțiune cu apa și fluide de interes biologic.

Pentru selecția hidrogelurilor cu caracteristici mecanice similare cu a cartilajului articular au fost realizate teste la solicitare de compresiune și forfecare. Însă pentru verificarea omogenității hidrogelurilor obținute, testele mecanice realizate la scară macro s-au verificat și la scară nano, astfel încât să se selecteze hidrogeluri cu o structură omogenă și cu aceleași proprietăți mecanice și în volum precum și la suprafață.

Una dintre cele mai importante caracteristici mecanice ale cartilajului articular o reprezintă coeficientul de frecare foarte mic dar și uzura mică, ceea ce îl face un material

performant din punct de vedere tribologic. În biomecanica articulară, tribologia se ocupă cu studiul forțelor care permit ca două corpuri solide alăturate să se deplaseze unul pe celălalt, deplasare ce se realizează prin intermediul forțelor tangențiale.

Prin urmare, hidrogelurile sintetizate au fost evaluate din punct de vedere al proprietăților tribologice, s-a analizat coeficientul de frecare obținut și s-au comparat valorile obținute cu cele specifice cartilajului articular. Studiile au fost realizate prin metode de evaluare la scară macro, cât și prin teste nanotribologice.

În hidrogelurile sintetizate s-au încorporat principii active utilizate în tratarea inflamațiilor cartilajului articular, mecanismul de încorporare a fost unul prin difuzie, pentru a nu modifica proprietățile mecanice ale hidrogelurilor. Astfel, hidrogelurile s-au încărcat cu ibuprofen și ketoprofen, gradul de încărcare fiind dependent de hidrofilia hidrogelului, morfologia materialului și solubilitatea medicamentului în mediu de încărcare. Ulterior s-a analizat posibilitatea eliberării principiilor active din hidrogelurile sintetizate și s-a analizat mecanismul de difuzie a compusului terapeutic pentru materialele cu proprietăți mecanice apropiate de cele ale cartilajului articular.

Toate testele s-au efectuat în condiții care simulează pe cele fiziologice sau patologice ale cartilajului articular. Astfel testele au fost realizate în soluție tampon 7 sau, datorită faptului că hidrogelurile sunt pH-senzitive, s-a urmărit și comportamentul lor la diferite valori de pH (pH 3 și 9).

## II.1.1. Materiale folosite

### II.1.1.1. Reactivi

#### Monomeri acrilici

2-Hidroxietyl metacrilat (HEMA) ( $M = 130,14 \text{ g/mol}$ ,  $\rho = 1,071 \text{ g/cm}^3$ ) – monomer purificat prin trecere pe coloană cu agent de dezinhibare (HQ, Sigma Aldrich, CAS. NO. 868-77-9) (Figura 30).

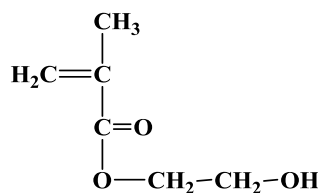


Figura 30. Structura chimică a monomerului HEMA

Acidul acrilic (AA) ( $M=2,06$  g/mol,  $\rho=1,051$  g/cm<sup>3</sup>) - monomer purificat prin trecere pe coloană cu dezinhibitor (Sigma Aldrich, CAS. NO. 79-10-7) (Figura 31).

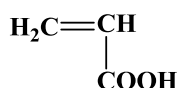


Figura 31. Structura chimică a monomerului AA

Acrilamida (AAM) ( $M= 71,08$  g/mol,  $\rho=1,3$  g/cm<sup>3</sup>) - monomer purificat prin recristalizare în amestec metanol-apă (1:1, vol:vol) (Sigma Aldrich, CAS. NO.79-06-1) (Figura 32).

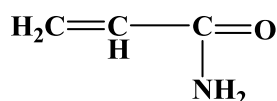


Figura 32. Structura chimică a monomerului AAM

Acrilatul de etil (AE) ( $M=100,12$ ,  $\rho=0,918$  g/cm<sup>3</sup>) - monomer purificat prin trecere pe coloană cu dezinhibitor (Sigma Aldrich, CAS. NO.79-06-1) (Figura 33).

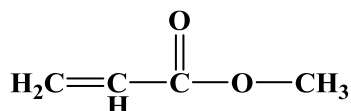


Figura 33. Structura chimică a monomerului AE

Acrilatul de butil (AB) ( $M=128,17$ ,  $\rho=0,894$ ) - monomer purificat prin trecere pe coloană cu dezinhibitor (Sigma Aldrich, CAS. NO. 141-32-2) (Figura 34).

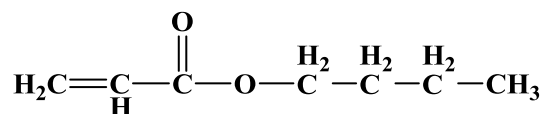


Figura 34. Structura chimică a monomerului AB

### Agentul de reticulare

Tetraetilenglicol diacrilat TEGDA ( $M=286,32$  g/mol,  $\rho=1,075 - 1,085$  g/cm<sup>3</sup>) - monomer bifuncțional, agent de reticulare (Sigma Aldrich, CAS. NO. 109-16-0) (Figura 35).



**Soluții tampon pe bază de TRIS**

S-a preparat o soluție TRIS (TRIZMA® base Primary Standard and Buffer ( $\geq 99,9\%$  Sigma-Aldrich, T1503-100g)) 0,2M (24,2g TRIS în 1000ml apă ultrapură (pH ~5,5, rezistivitatea 18,2 M $\Omega$ )).

Soluția tampon TRIS 0,5M pH 7,2

	50ml soluție TRIS 0,2M
	44,2 ml soluție Hcl 0,2M
	105,8 ml apă ultrapură
Volum total TRIS 0,5M pH7,2	200 ml

Soluție tampon TRIS 0,15M pH7,2

Soluție	Cantitate
TRIS 0,5M pH7,2	300
Apă ultrapură	700ml
Volum total TRIS 0,15M pH7,2	1000 ml

Soluția tampon TRIS 0,5M pH 9

	50ml soluție TRIS 0,2M
	5 ml soluție Hcl 0,2M
	145 ml apă ultrapură
Volum total TRIS 0,5M pH 9	200 ml

Soluție tampon TRIS 0,15M pH 9

Soluție	Cantitate
TRIS 0,5M pH 9	300
Apă ultrapură	700ml
Volum total TRIS 0,15M pH 9	1000 ml

Soluții tampon TRIS cu săruri (NaCl 0,15M)

Soluție	Cantitate
TRIS 0,15 M pH7,2/9	1000 ml
Apă ultrapură	8,775 g
Volum total TRIS 0,15M pH7,2/9+0,15 M NaCl	1000 ml

Masa molară pentru TRIS: 121,14 g/mol

### Soluția tampon pH 3 pe bază de acid acetic

Se va prepara întâi o soluție 0,2 M de acid acetic (11,55 ml în 1000ml apă ultrapură) și 0,2 soluție acetat de sodiu (16,4 g în 1000ml apă ultrapură).

Soluție	Cantitate (ml)
Soluție acid acetic 0,2M	46,3
Soluție acetat de sodiu 0,2M	3,7
Apă ultrapură	100
Volum total de soluție tampon pH 3	150 ml

### Substanțe folosite la măsurarea unghiului de contact

Substanța	Masa (g/mol)	Densitatea (g/cm <sup>3</sup> )	CAS
Etilen glicol 99% (Acros Organics)	62,06	1,11	CAS 127-21-1
Diiodometan (Acros Organics)	267,84	3,32	CAS 75-11-6

### Prelevarea de cartilaj articular

Pentru testele făcute pe cartilaj articular s-a folosit cartilaj de pui, proaspăt. Din datele bibliografice s-a raportat că structura cartilajului de pui este asemănătoare cu cea a cartilajului articular uman sănătos, și în plus, grosimea acestuia este de 3-4 cm, grosime asemănătoare cu cea a cartilajului articular la un adult sănătos (20-30 ani).

Condilii mediani ai cartilajul de pui au fost prelevați în aceeași zi a experimentului, și de asemenea au fost proaspeți, pentru a evita procesele de conservare prin congelare, demonstrat fiind faptul că dacă cartilajul este înghețat, celule mor, iar grosimea lui se micșorează la jumătate din cea inițială [120].

120. Sfarghiu-Tunfio A.-M., Thèse Modèle bio-tribologique des articulations. Rôle mécanique et physicochimique des assemblages moléculaires du fluide synovial., Lyon, 2007.



## II.2. Metode de analiză

### II.2.1. Analiza prin spectroscopie în infraroșu cu transformată Fourier (FTIR)

Spectroscopia în infraroșu cu transformată Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) este o tehnică analitică (și cantitativă, în cazul în care aparatul este dotat cu un soft specializat) folosită pentru a identifica materialele organice (în unele cazuri și pe cele anorganice). Tehnica constă în măsurarea absorbției radiației în infraroșu de către eșantionul testat în funcție de lungimea de undă. Termenul de transformată Fourier provine de la faptul că se folosește o transformată Fourier (un algoritm matematic) pentru a converti datele brute în spectrul real.

Aproape toți compușii care prezintă legături covalente, fie ele organice sau anorganice, absorb diferitele frecvențe ale radiației electromagnetice în regiunea infraroșu a spectrului electromagnetic. Această regiune se găsește între domeniul vizibil și cel al microundelor. El se întinde între 0,8 și 200  $\mu\text{m}$ , fiind subdivizat în trei zone: IR apropiat, IR și IR îndepărtat. Importanța deosebită pentru chimia organică o prezintă domeniul cuprins între 2,5  $\mu\text{m}$  și 25  $\mu\text{m}$ , considerat ca domeniu infraroșu propriu-zis. În figura 39 este ilustrată relația dintre regiunea IR și alte regiuni ale spectrului electromagnetic.

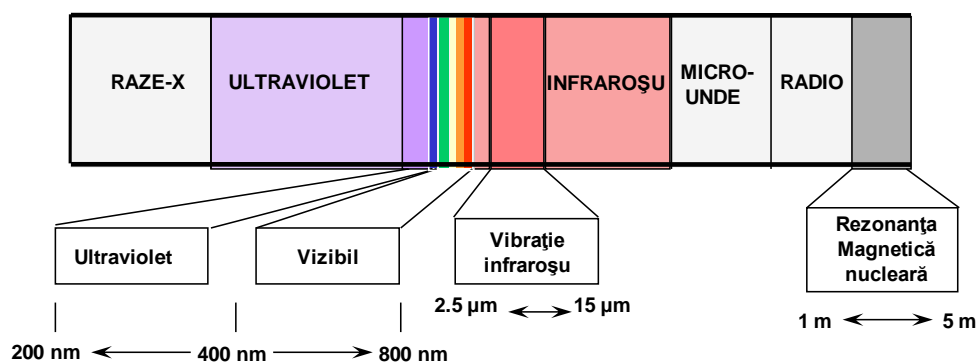
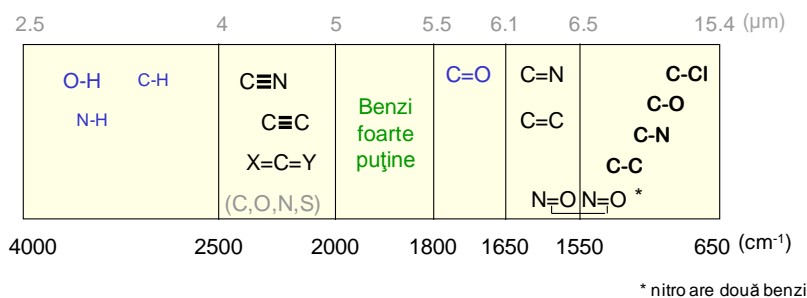


Figura 39. Spectrul electromagnetic

Când un material este iradiat cu radiații infraroșii, moleculele pot suferi o tranziție de la starea inițială, la o stare excitată. Pentru realizarea acestei tranziții este necesară o anumită cantitate de energie, ce depinde de tăria legăturii dintre atomi. Molecula va absorbi din fluxul luminos numai radiațiile ce posedă o anumită energie (deci o anumită lungime de undă) și care sunt capabile să producă tranziții la stări excitate. Consecința acestor absorbții este apariția benzilor spectrale ce pot oferi informații despre aranjamentul atomilor în moleculă. Chiar și cele mai simple molecule vor da un spectru extrem de complex. Lungimile de undă la

care sunt absorbite de către eșantioane sunt caracteristice structurii lor moleculare (Figura 40).



**Figura 40. Regiuni tipice de absorbție în IR a diferitelor legături moleculare**

În zonele în care nu se absoarbe energie, aparatul va înregistra „linia de zero” a spectrului. Faptul că fiecare modificare energetică vibrațională este însoțită de modificări energetice rotaționale conduce aspectul de bandă (și nu de linie) a spectrului. Din acest motiv, spectrele IR se mai numesc spectre de rotație-vibrație ale moleculelor.

### **Pregătirea probelor**

Spectrele IR pot fi înregistrate în fază solidă, lichidă sau gazoasă. Utilizarea spectrelor în fază gazoasă se utilizează relativ rar. Spectrele substanțelor lichide pot fi înregistrate fie ca atare, fie sub forma unor soluții. Spectrele substanțelor solide pot fi obținute în soluție sau în stare solidă, sub formă de suspensii sau pastile de bromură de potasiu (KBr). În cazul hidrogelurilor, analiza realizându-se în starea lor uscată (substanțe solide), cea mai frecvent folosită metodă este cea prin pastilarea cu KBr.

### **Înregistrarea spectrelor în pastila de KBr**

Spectrele substanțelor solide se pot înregistra sub forma unor „pastile” de KBr, pentru că aceasta este complet transparentă pe întreg domeniul IR, deci nu va influența spectrul IR. Această tehnică poate fi folosită atunci când proba poate fi mojarată. Pentru obținerea pastilelor, se mojarază un amestec de probă (1÷5 mg) cu aproximativ 200-300 mg KBr pentru spectroscopie. Amestecul se mojarază într-un vibrator electromagnetic și se presează sub forma unui disc foarte subțire cu ajutorul unei prese hidraulice (~ 109 N/m<sup>2</sup>). Ca etalon se folosește o pastilă identică de KBr pură.

Deoarece KBr este higroscopică, spectrele înregistrate în pastilă pot prezenta absorbțiile tipice grupării –OH.

În stare solidă, forțele intermoleculare sunt mult mai puternice și afectează semnificativ proprietățile vibraționale ale moleculei. Asemenea forțe se manifestă deosebit de intens în cazul compușilor ce formează legături de hidrogen.

### Interpretarea spectrelor IR

Interpretarea spectrelor IR se face în funcție de scopul pentru care a fost înregistrat spectrul. Dacă structura compusului investigat este cunoscută, interpretarea constă în confirmarea prezenței picurilor caracteristice anumitor grupări funcționale sau a absenței altor funcțiuni. Întrucât fiecare compus organic prezintă un spectru unic, interpretarea poate însemna compararea pic cu pic a spectrului înregistrat cu spectrul de catalog al compusului respectiv.

În cazul în care structura nu este cunoscută, spectrul trebuie investigat cu multă atenție în scopul obținerii maximului de informații posibil. În general, numai examinarea spectrului IR nu permite atribuirea structurală completă. Informațiile ce se pot obține din spectru se referă la identificarea anumitor tipuri de legături și grupări funcționale, identificări care, corelate cu datele furnizate de alte tehnici spectrale permite atribuirea structurală finală.

La analiza spectrelor IR este preferabil să se aibă în vedere următoarele aspecte:

- examinarea spectrului să înceapă de la domeniul frecvențelor înalte (4000  $\text{cm}^{-1}$ ) spre cel al frecvențelor joase, deoarece multe grupări funcționale absorb în jumătatea frecvențelor înalte ale domeniului IR;
- nu trebuie încercată identificarea fiecărui pic; picurile puțin intense reprezintă adesea armonice ale frecvențelor fundamentale sau sunt determinate de „zgomotul aparatului”;
- o atenție deosebită trebuie acordată picurilor intense, deoarece, de obicei, sunt cele mai relevante;
- absența anumitor picuri din zonele cheie ale spectrului poate fi uneori la fel de importantă pentru atribuirea structurală ca și prezența lor (de exemplu, absența picului caracteristic grupării C=O din spectrul unui produs, obținut în urma unei reacții de reducere, este o dovadă suplimentară a obținerii produsului dorit);

Interpretarea spectrelor IR este facilitată de existența unei imense biblioteci de date spectrale. Datele acumulate au fost sistematizate în tabele de corelație ce prezintă domeniile în care apar absorbțiile caracteristice diverselor grupări funcționale organice.

Pentru analiza spectrelor IR cu ajutorul tabelelor de corelație este indicată divizarea domeniului spectral (4000-600  $\text{cm}^{-1}$ ) în două zone: 4000-1500  $\text{cm}^{-1}$  și 1500-600  $\text{cm}^{-1}$ .

Domeniul 1500-600  $\text{cm}^{-1}$  este de obicei foarte complex și în consecință, greu de interpretat. Deși unele grupări funcționale prezintă absorbții caracteristice în acest domeniu, majoritatea picurilor sunt determinate de vibrațiile de schelet ale moleculei, privită ca un tot unitar.

Deoarece în această zonă aspectul spectrului este diferit pentru fiecare compus organic, domeniul a primit numele de „zona amprentei digitale” a compusului.

Domeniul 4000-1500  $\text{cm}^{-1}$  conține semnele caracteristice majorității grupărilor funcțiunilor organice. Datorită acestui fapt se preferă divizarea sa formală în trei subdomenii: 4000-2500; 2500-1900; 1900-1500  $\text{cm}^{-1}$ , în funcție de tipul grupărilor funcționale ce determină absorbțiile.

Atunci când se analizează spectrul unui compus necunoscut, în primul rând trebuie determinată prezența sau absența grupărilor funcționale. Astfel, picurile C=O, O-H, N-H, C-O, C este C, C $\equiv$ C, C $\equiv$ C și NO<sub>2</sub> se evidențiază cel mai ușor și oferă informații structurale importante. Nu este recomandată detalierea analizei absorbțiilor C-H la aproximativ 3000  $\text{cm}^{-1}$ ; aproape toți compușii prezintă aceste absorbții.

În cadrul tezei de doctorat analizele FTIR au fost realizate pentru a verifica reacția de sinteză a hidrogelurilor. S-a folosit un aparat de tipul FTIR-BOMEM MB 104.

## **II.2.2 Metode de analiză termică (Termogravimetria-TG, Calorimetria cu scanare diferențială -DSC)**

Analiza termică reprezintă o sumă de metode de investigare termoanalitică, la care proprietățile fizice sau chimice ale unei substanțe, ale unui amestec de substanțe sau/și a unor produse de reacție sau amestecuri de produse de reacție sunt măsurate ca o funcție de temperatură și/sau de timp. Pentru a realiza tehnic aceste determinări temperatura produsului analizat este modificată după un program bine stabilit și bine controlat. Pe tot parcursul modificării temperaturii este măsurată continuu proprietatea fizică urmărită, rezultatul fiind de obicei un grafic obținut automat (termogramă) ce conține pe ordonată modificarea proprietății fizice iar pe abscisă modificarea de temperatură. Substanțele chimice și materialele prezintă o serie de puncte caracteristice de temperatură la care au loc transformări specifice prin care pot fi caracterizate aceste substanțe (puncte de fierbere, de topire, de solidificare, schimbări optice, etc.). Obiectul analizei termice instrumentale îl reprezintă punerea în evidență prin mijloace tehnice a acestor transformări în funcție de temperatură.

În cazul hidrogelurilor cele mai utile metode de analiză termică sunt termogravimetria (Thermogravimetric Analysis, TGA) pentru analiza stabilității termice și a degradării, și

calorimetria cu scanare diferențială (Differential Scanning Calorimetry, DSC) pentru studiul tranzițiilor termice.

### **Termogravimetria**

Majoritatea fenomenelor fizice, chimice și fizico-chimice se caracterizează prin variația masei eșantioanelor în timp ce acestea sunt supuse unor condiții de mediu diferite, cum ar fi, de exemplu, modificarea temperaturii. Termogravimetria măsoară deci variația masei unei probe când aceasta este expusă unui regim de temperatură. Aceasta variație se realizează experimental cu termobalanțe. Aceste termobalanțe sunt formate dintr-o balanță, un minicuptor de încălzire, un sistem de inundare și spălare cu gaz și un sistem microprocesor.

### **Calorimetria cu scanare diferențială**

Calorimetria de scanare diferențială este tehnica termoanalitică în care diferența cantității de căldură necesară pentru a crește temperatura unei probe și unei referințe este măsurată în funcție de temperatură. Atât proba cât și referința sunt menținute la aproape aceeași temperatură pe parcursul experimentului. În general, programul de temperatură pentru analiza DSC este proiectat astfel încât temperatura inițială a probei crește liniar ca o funcție de timp. Proba de referință ar trebui să aibă o capacitate calorică bine definită pe intervalul de temperatură în care urmează să fie scanate.

Aplicația principală a DSC este cea de a studia tranzițiile de fază, cum ar fi cele de topire, tranzițiile vitroase sau descompunerile exotermice. Aceste tranziții implică modificări ale energiei sau ale capacității calorice care pot fi detectate de către DSC cu o sensibilitate mare.

Proba, încapsulată într-o capsulă de aluminiu, este plasată alături de referință (o capsulă goală) într-un „cuptor”, care se încălzește după un program de temperatură bine stabilit. În urma unui experiment DSC se obține o curbă a fluxului de căldură în funcție de temperatură sau de timp. Reacțiile exotermice din probă sunt reprezentate ca un vârf pozitiv ceea ce implică o diminuare a căldurii furnizate probei, în timp ce un fenomen endoterm, este reprezentat ca un vârf negativ, deci, necesită o cantitate de căldură crescută (Figura 41).

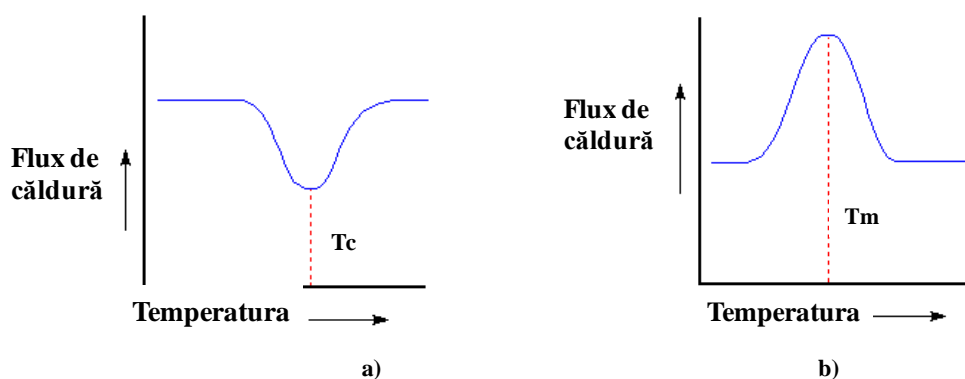


Figura 41. Exemplu de termogramă DSC pentru o transformare:

a) endotermă

b) exotermă

Analiza termică s-a efectuat la un derivatograf de tip Mettler Toledo TGA-SDTA851e, în atmosferă de N<sub>2</sub> cu un debit de 20ml/min, cu o viteză de încălzire de 10°C/min în intervalul de temperatură 25-900°C și greutatea probei între 2-5 mg. S-au păstrat parametrii operaționali constanți pentru toate probele în vederea obținerii unor date comparabile.

Celula de analiză termică oferită de Mettler Toledo, TGA-SDTA851e se caracterizează prin performanțe tehnice foarte bune și anume o precizie de cântărire mai mică de 1 microgram. Această precizie deosebită permite utilizarea unor cantități foarte mici de probă (1-5 mg), aspect de importanță majoră în sinteza de noi materiale. Cuptorul funcționează în intervalul 20-1100 oC, având o precizie de reglare a temperaturii de 0,01oC, la o viteză de încălzire mare, de până la 200 oC/min. Celula de analiză termică este controlată prin intermediul calculatorului, fiind posibilă generarea unor programe de analiză de mare complexitate. Softul (STAR) aferent celulei de analiză termică permite și prelucrarea matematică a curbelor de pierdere în greutate.

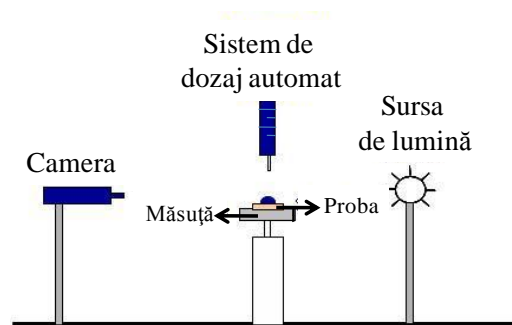
### II.2.3. Determinarea tensiunii superficiale

Tensiunea superficială este proprietatea generală a lichidelor sau soluțiilor de a lua o formă geometrică, de arie minimă, în lipsa forțelor exterioare, la contactul cu o suprafață solidă, datorită acțiunii forțelor de coeziune dintre moleculele lichidului.

Tensiunea superficială a polimerilor este dată de mai multe componente. Acestea sunt reprezentate de :

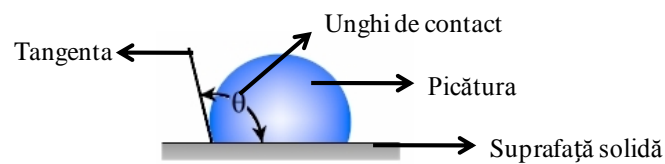
- interacțiunile de tip Liftshitz - Van der Waals,
- interacțiunile de tip acid Lewis - acceptor de electroni,
- interacțiunile de tip bază Lewis - donator de electroni.

Cel mai frecvent pentru determinarea tensiunii superficiale a polimerilor se utilizează metoda determinării unghiului de contact. Această metodă se bazează pe determinarea gradului de udare a suprafeței. Determinarea unghiului de contact se realizează prin metoda picăturii așezate pe o suprafață orizontală, prin utilizarea unui microscop orizontal cu camera video, aparat numit și goniometru (Figura 42). În cazul hidrogelurilor, ele sunt poziționate pe o măsuță, iar o picătură de lichid este depusă pe suprafață prin intermediul unei microseringi, care poate fi acționată automat sau manual. Imaginii profilului picăturii este captat cu ajutorul camerei video.



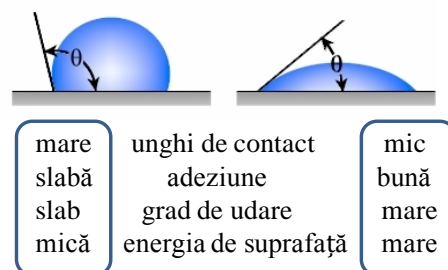
**Figura 42. Schema unui goniometru**

Unghiul de contact este apoi măsurat în urma interacțiunii cu suprafața solidă a picăturii și este dat de panta tangentei de la interfața lichid-solid (Figura 43).



**Figura 43. Măsurarea unghiului de contact ( $\theta$ )**

În urma măsurării unghiului de contact, se pot studia proprietățile fizice ale interacțiunilor dintre un solid și un lichid, precum: gradul de udare a suprafeței, afinitatea, adeziunea, hidrofilia (Figura 44).



**Figura 44. Situații tipice ale evaluării unghiului de contact**

### II.2.3.1. Teoriile tensiunii superficiale

#### II.2.3. 1.1. Teoria lui Young

Young a considerat contactul dintre un lichid și o suprafață solidă, omogenă, nedeformabilă și izotropă. La interfața de separare apar trei componente ale tensiunii superficiale (Figura 45):  $\gamma_S$ ,  $\gamma_L$ ,  $\gamma_{SL}$ , care reprezintă tensiunea superficială solid/aer, lichid/aer respectiv solid/lichid. Lucrul mecanic de adeziune ( $W_a$ ) efectuat pentru a separa o suprafață de arie unitară a două faze în contact este definit conform relației 2:

$$W_a = \gamma_S + \gamma_L - \gamma_{SL} \quad (2)$$

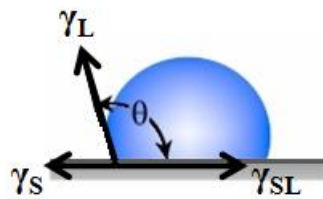


Figura 45. Modelul lui Young

Din această ecuație numai  $\gamma_L$  poate fi măsurat, în timp ce tensiunea superficială solidului poate fi determinată experimental folosind diferite lichide cunoscute.

Young [121] a descris cantitativ relația dintre tensiuni, care poate fi exprimată algebric cu (ecuația 3):

$$\gamma_L \cos \theta = \gamma_S - \gamma_{SL} \quad (3)$$

Această ecuație poartă numele de ecuația lui Young. În 1869, Dupré [122] definește lucrul mecanic de adeziune ( $W_a$ ) conform ecuației 4:

$$W_a = \gamma_L(1 + \cos \theta) \quad (4)$$

Această ecuație derivă din substituția ecuațiilor 1 și 2.

Adamson scoate în evidență originea și relația dintre aceste ecuații și stabilește că ecuațiile 2 și 3 se referă la ecuația Young-Dupré [123]. Ecuația 3 este o simplă formulă a  $W_a$  în ceea ce privește unghiul de contact măsurat și tensiunea superficială a lichidului care este cunoscută.

121. Young T., *Miscellaneous works of the late, Thomas Young*, London: John Murray (1855).

122. Dupré A., *Théorie mécanique de la chaleur*, Paris: Gauthier-Villars (1869).

123. Adamson A.W., *Physical chemistry of surfaces*, 3rd ed. John Wiley & Sons (1976).



### II.2.3.1.2. Teoria lui Fowkes

Această teorie a fost introdusă în 1962 de către Fowkes, foarte mult discutată în literatură [124, 125, 126, 127, 128, 129, 130]. Fowkes a divizat tensiunea liberă superficială în două componente, una dispersivă conținând toate forțele London ca dispersia (London-van der Waals), orientare (Keesom-van der Waals), inducție (Debye-van der Waals) și forțele Lifshitz-van der Waals (LW), și o componentă polară alcătuită din legăturile de hidrogen (acid/bază). Astfel, tensiunea superficială este definită ca (5):

$$\gamma_{\text{total}} = \gamma_{\text{di}} + \gamma_{\text{p}}$$

(5)

unde  $\gamma_{\text{di}}$  este componenta dispersă,

$\gamma_{\text{p}}$  este componenta polară.

Fowkes consideră la interfața solid/lichid numai forțele dispersive astfel încât ecuația 4 devine (6):

$$\gamma_{\text{SL}} = \gamma_{\text{S}} + \gamma_{\text{L}} - 2\sqrt{\gamma_{\text{S}}^{\text{d}}\gamma_{\text{L}}^{\text{d}}} \quad (6)$$

Făcând înlocuirile în ecuația Young, ecuația Fowkes devine (7):

$$\gamma_{\text{L}}(1 + \cos \theta) = 2\sqrt{\gamma_{\text{S}}^{\text{d}}\gamma_{\text{L}}^{\text{d}}} \quad (7)$$

Limitările acestei ecuații constau în faptul că la calcularea tensiunii superficiale se iau în considerare doar interacțiunile dispersive. Totuși, poate fi folosită pentru sisteme simple.

Astfel această ecuație a fost extinsă, prin includerea componentei polare (legăturile de hidrogen). Această teorie se numește teoria OWRK după numele celor care au enunțat-o (Owens, Wendt, Rabel și Kaelble). Ei folosesc funcția radicalică pentru a combina amândouă componentele: dispersivă și polară (8):

$$\gamma_{\text{SL}} = \gamma_{\text{S}} + \gamma_{\text{L}} - 2\sqrt{\gamma_{\text{S}}^{\text{d}}\gamma_{\text{L}}^{\text{d}}} - 2\sqrt{\gamma_{\text{S}}^{\text{p}}\gamma_{\text{L}}^{\text{p}}} \quad (8)$$

Combinând această ecuație cu cea a lui Young rezultă ecuația 9:

124. Zhao Q, Liu Y., Abel E.W., *Effect of temperature on the surface free energy of amorphous carbon films*, Journal of Colloidal Interface Science (2004), 280(1):174-183.

125. Georges F., *An overview of the basic aspects of polymer adhesion. Part I: Fundamentals*, Polymer Engineering & Science (1995), 35(12): 957-67.

126. Della Volpe C., Maniglio D., Brugnara M., Siboni S., Morra M., *The solid surface free energy calculation. I. In defense of the multicomponent approach*, Journal of Colloid and Interface Science (2004), 271(2): 434-453.

127. Vasconcellos A.S., Oliveira J.A.P., Baumhardt-Neto R., *Adhesion of polypropylene treated with nitric and sulfuric acid*, European Polymer Journal (1997), 33(10-12):1731-1734.

128. Bhowmik S., Jana P., Chaki T.K., Ray S., *Surface modification of PP under different electrodes of DC glow discharge and its physicochemical characteristics*, Surface and Coatings Technology (2004), 185(1): 81-91.

129. Oss C.J., Ju L., Chaudhury M.K., Good R.J., *Estimation of the polar parameters of the surface tension of liquids by contact angle measurements on gels*, Journal of Colloid and Interface Science (1989), 128(2): 313-319.

130. Blum F., Metin B., Vohra R., Sitton O., *Surface Segmental Mobility and Adhesion - Effects of Filler and Molecular Mass*, The Journal of Adhesion (2006), 82(9): 903-917.

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2\sqrt{\gamma_S^d \gamma_L^d} + 2\sqrt{\gamma_S^p \gamma_L^p} \quad (9)$$

Datorită prezenței termenului polar, este necesar un număr minim de două lichide care trebuie folosite pentru a putea calcula tensiunea superficială [131].

### II.2.3.13. Teoria acid-bază

Mai mulți cercetători (Oss, Chaudhury și Good) au explicat tensiunea superficială făcând referire la natura chimică. În locul energiei polare (componenta legăturii de hidrogen) descrisă de termenul  $\gamma^p$  a fost introdus un alt termen  $\gamma^{AB}$ , în care AB se referă la interacțiunile de tip acid-bază. Termenul non polar (dispersiv) descris de termenul  $\gamma^d$  a fost înlocuit cu  $\gamma^{LW}$ , în care termenul LW înglobează toate forțele London-van der Waals (ecuația 10).

$$\gamma = \gamma^{LW} + \gamma^{AB} \quad (10)$$

Termenul polar  $\gamma^{AB}$  este o combinație între electronii donori  $\gamma^-$  și cei acceptori  $\gamma^+$ . Suma componentelor acid-bază este definită ca (11):

$$\gamma^{AB} = 2\sqrt{\gamma^+ \gamma^-} \quad (11)$$

Astfel, energia de la interfața dintre un lichid și un solid poate fi definită prin ecuația 12:

$$\gamma_{SL} = \gamma_S + \gamma_L - 2\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} - 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} - 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \quad (12)$$

Combinând această ecuație cu cea a lui Young (ecuația 13):

$$\gamma_L(1 + \cos \theta) = 2\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + 2\sqrt{\gamma_S^- \gamma_L^+} \quad (13)$$

În această ecuație finală, sunt trei termeni legați de suprafața solidului, de aceea trebuie folosite trei solvenți diferiți pentru măsurarea unghiului de contact, dintre care doi dintre solvenți trebuie fie polari [132, 133, 134].

Cel mai uzual se utilizează apă, diiodometan și etilenglicol pentru determinarea unghiurilor de contact (Tabelul 2).

**Tabelul 2** Valorile din literatura ale componentelor tensiunii superficiale pentru solvenții uzuali

131. Clint J.H., *Adhesion and components of solid surface energies*, Current Opinion in Colloids and Interface Science (2001), 6(1): 28–33.

132. Delrio F.W., Boer M.P., Knapp J.A., Clews P.J., Dunn M.L., *The role of van der Waals forces in adhesion of micromachined surfaces*, Nature Materials (2005), 4(8): 629–634.

133. Nie H.Y., Walzak M.J., Berno B., McIntyre N.S., *Atomic force microscopy study of polypropylene surfaces treated by UV and ozone exposure: modification of morphology and adhesion force*, Applied Surface Science (1999), 144–145:627–632.

134. Johnson K.L., Kendall K., Roberts A. D., *Surface energy and the contact of elastic solids*, Proceedings of the Royal Society of London, Series A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences (1971), 324: 301–313.

Solvent	$\gamma$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_{LLW}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_{LAB}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_{L+}$ (mJ/m <sup>2</sup> )	$\gamma_{L-}$ (mJ/m <sup>2</sup> )
Apă	72,80	21,80	51,00	25,50	25,50
Di-iodometan	50,80	50,80	0,00	0,00	0,00
Etilenglicol	48,00	29,00	48,92	1,92	47,00
Glicerină	64,00	34,00	30,00	3,92	57,40
Formamidă	58,00	39,00	19,00	2,28	39,60
Dimetil sulfoxid	44,00	19,00	8,00	0,50	32,00

Pentru a evalua rugozitatea suprafeței respective, se mai poate măsura un unghi de contact avansat și unul de recesie. Diferența dintre cele două este histerezisul unghiului de contact. Sunt trei metode prin care se poate măsura unghiul de contact dinamic și de recesie: prin înclinarea măsuței ce ține proba (Figura 46a), prin observarea evaporării în timp a lichidului (Figura 46b) sau prin adăugarea/înlăturarea de lichid (Figura 46c).

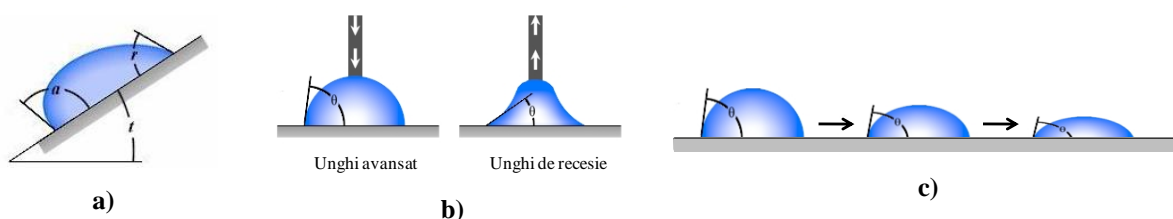


Figura 46. Metode de măsurare a unghiului de contact avansat și de recesie

a) prin înclinare

b) prin evaporare

c) prin adăugare/înlăturare de lichid

În lucrarea de față determinarea unghiului de contact s-a realizat cu ajutorul unui goniometru OCA (Optical Contact Angle-Instrument de Măsurare a Unghiului de contact) S20 (Data Physics). Unghiurile de contact au fost exprimate prin **valoarea medie** obținută în urma a 3 **măsurători** diferite. Histerezisul a fost obținut prin metoda de adăugare/înlăturarea de lichid.

## II.2.4. Studii de umflare

Atunci când un hidrogel uscat este introdus într-o soluție apoasă, moleculele de apă vor pătrunde în rețeaua hidrogelului. Aceste molecule de apă vor ocupa un anumit spațiu, și ca rezultat, lanțurile polimerice se vor extinde, permițând pătrunderea altor molecule de apă.

Însă, umflarea nu este un proces continuu, elasticitatea rețelei de hidrogel fie covalentă sau fizică va contrabalansa extinderea la nesfârșit a rețelei, pentru a preveni descompunerea hidrogelului. Comportamentul apei în hidrogeluri poate determina permeația globală a nutrienților în gel și a produșilor celulari din gel. Atunci când un hidrogel uscat începe să absoarbă apa, primele molecule de apă ce intră în matricea polimerică vor hidrata cele mai polare grupări hidrofilice, realizând „legăturile primare de apă”. Odată ce grupele polare au fost hidratate, rețeaua polimerică începe să se umfle și expune grupările hidrofobice care vor începe și ele să interacționeze cu apa, rezultând „legăturile secundare de apă”. Legăturile primare și secundare sunt adesea combinate și de aceea se numesc „legături totale de apă” [135].

Pentru evaluarea interacțiunii materialelor cu apa și fluidele de interes biologic se pot folosi metode gravimetrice și volumetrice, optându-se pentru una sau cealaltă metodă în funcție de forma de prezentare a materialelor, astfel încât să se elimine erorile experimentale.

În cazul hidrogelurilor sintetizate în cadrul lucrării s-a ales ca mod de lucru pentru studiul umflării, procedeul gravimetric. Principiul metodei constă în cântărirea la balanța analitică, aproximativ 0,5g probă, care se imersează în soluția de studiat. La diferite intervale de timp stabilite, probele se vor scoate din soluție și se vor cântări.

Umflarea polimerilor într-un solvent se caracterizează prin gradul de umflare  $Q_m$ , ecuația de calcul fiind următoarea (ecuația 14):

$$Q_m = \frac{m - m_0}{m_0} 100 = \frac{m_1}{m_0} 100 (\%) \quad (14)$$

în care :  $Q_m$  este gradul de umflare masic,

$m_0$  este masa probei înainte de umflare,

$m$  este masa probei după umflare,

$m_1$  este masa solventului absorbit de probă.

Gradul de umflare masic se definește, deci, ca fiind cantitatea de lichid, exprimată în grame, absorbită de 100 g de polimer.

Determinând gradul de umflare al probei la diferite intervale de timp se pot trasa curbele care caracterizează cinetica umflării unui polimer (Figura 47).

135. Beruto D. T., Botter R., *Role of the water matric potential ( $\Psi_M$ ) and of equilibrium water content (EWC) on the water self-diffusion coefficient and on the oxygen permeability in hydrogel contact lenses*, Biomaterials (2004), 25(14): 2877-2883.

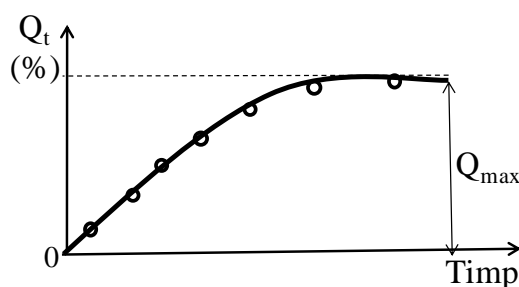


Figura 47. Curba cinetică a umflării limitate ( $Q_{\max}$  este gradul de umflare maxim)

### II.2.4.1. Cinetica umflării

Studiile bibliografice arată că procesele de sorbție polimer-solvent, nu se supun teoriei clasice a difuziei [136]. Orientarea lentă a lanțurilor polimerice produce o difuzie anormală. Sunt trei cazuri principale de transport.

Cazul I sau de transport Fickian, caracterizat de coeficientul de difuzie. Această difuzie se întâlnește în cazul polimerilor cu o consistență asemănătoare cauciucului și a celor vitroși, relaxarea moleculară are loc mai repede decât difuzia (peste temperatura de tranziție,  $T_g$ ), ori mai lent astfel încât nu este observată în timp (în jurul valorii de  $T_g$ ). Cazul I de difuzie se caracterizează printr-o creștere lineară a masei polimerului cu rădăcina pătrată a timpului de sorbție.

Cazul II de difuzie, este caracterizat de viteza de umflare. Difuzia se face mult mai rapid decât relaxarea. În acest caz, absorbția este direct proporțională cu timpul.

Comportamentul de difuzie, intermediar cazului I și II de difuzie, se numește difuzia non-Fickiană. În acest tip de transport, viteza de difuzie și relaxare sunt comparabile.

În cadrul acestei teze, gradul maxim de umflare a hidrogelurilor a fost determinat prin metoda gravimetrică. Pentru fiecare hidrogel s-a efectuat trei experimente în paralel, valoarea finală fiind reprezentată de media acestora.

### II.2.5. Microscopie electronică de baleiaj (SEM, ESEM)

Cele mai folosite tehnici pentru investigarea, cu o rezoluție foarte bună, a morfologiei în suprafață și în secțiune a materialelor sunt microscopia electronică de baleiaj (Scanning Electron Microscopy, SEM) și varianta de testare în condiții de hidratare (Environmental Scanning Electron Microscopy, ESEM). Particularitatea caracteristică a imaginilor obținute cu ajutorul SEM-ului, în comparație cu cele optice, este marea adâncime a clarității: aproximativ cu două ordine de mărime mai mare decât într-un microscop optic obișnuit. Acest efect

136. Park G.S., *The glassy state and slow process anomalies*, In: Diffusion Polymers, Crank J, Park GS, (Eds) Academic, London (1968).

"pozitiv" este condiționat de cel "negativ", reprezentat de marea aberație sferică a lentilelor electromagnetice, care micșorează apertura unghiulară a fasciculului electronic. Suprafața materialelor se analizează cu o rezoluție avansată prin microscopia electronică de baleiaj și microscopia de forță atomică (Atomic Force Microscopy, AFM).

Deși SEM-ul și AFM-ul au rezoluții laterale similare, există situații în care una din aceste tehnici poate oferi o reprezentare mai detaliată a suprafeței probei. Această diferențiere este dată de felul în care cele două tehnici analizează modificările verticale în topografia probei. De aceea, un avantaj cheie al SEM-ului este adâncimea de pătrundere a câmpului relativ mare. Această caracteristică face posibilă obținerea unor imagini clare, cu milimetrii de informație verticală a unor suprafețe foarte rugoase. Scanner-ul AFM poate măsura înălțimi de până la 6 μm însă, pentru suprafețe cu variații de înălțime mai mari decât 5-10 μm metoda de investigație cea mai potrivită este SEM.

Pentru analizele de microscopie electronică de scanare în mediu ambiant (Environmental Scanning Electron Microscopy, ESEM) probele au fost imersate în apă până la atingerea gradului maxim de umflare după care au fost secționare și observate direct la microscop. Această metodă este interesantă din punct de vedere al preparării eșantioanelor: nu necesită metalizarea suprafeței de analizat, nu necesită liofilizarea sau congelarea probei, conducând la o diminuare a timpului de pregătire și analiză a hidrogelurilor. Probele pot fi deci vizualizate în stare umflată și proprietățile lor originale pot fi păstrate în timpul și după terminarea analizelor.

Ca și principiu de funcționare, fluxul electronilor secundari ating proba ceea ce face ca proba să emită electroni secundari. Electronii sunt atrași de electrodul detector încărcat electric pozitiv. În drumul lor prin mediul gazos, au loc ciocniri între electroni și particulele de gaz, având ca rezultat emisia de mai mulți electroni și ionizarea moleculelor de gaz.

Aceasta crește cantitatea de electroni efectivi amplificând semnalul inițial dat de electronii secundari. Ionii pozitivi de gaz sunt atrași de electrodul negativ diminuând efectul de încărcare electrică.

Pentru obținerea unor imagini corecte este foarte important să se găsească combinația perfectă între voltajul de accelerare, intensitatea spotului, presiunea vaporilor, distanța de lucru cât și de a lucra cu probe care nu prezintă suprafețe neconductoare mari.

În lucrarea de față SEM-ul și ESEM-ul au fost utilizate pentru studiul morfologiei hidrogelurilor sintetizate. Aparatele folosite au fost:

- SEM : Quanta Scanning Electron Microscope, SEM QUANTA 600 FEI;
- ESEM: XL30 FEI, cu ajutorul unui detector GSED, la o presiune de ~3 și 6 Torr.

## II.2.6. Teste mecanice și tribologice la scară macro și nano (reometrie, microscopie de forță atomică)

### II.2.6.1. Teste de reometrie

Reologia este o ramură a fizicii, a cărei caracter fundamental este studiul fenomenelor de deformare și curgere ( rheos (gr.)=curgere, logos(gr.)=știința corpurilor), sub acțiunea unor forțe exterioare sau interioare. Este o știință care relevă proprietățile fizico-mecanice ale corpurilor, supuse unor forțe izotrope sau anizotrope de deformare, sub forma unor tensiuni de forfecare, a căror influență este în strânsă corelație cu particularitățile de microstructură și conformație moleculară.

Însă definiția reologiei s-a extins în timp, a fost dată cea mai recentă și mai cuprinzătoare definiție:

"Reologia este știința ce studiază interdependența între solicitările mecanice, răspunsul corpurilor și proprietățile acestora". Această știință stabilește modelele matematice care formează funcția răspuns a unui corp supus la solicitări. O forță sau un sistem de forțe aplicat unui corp conduce la mișcarea acestuia. Mișcarea corpului poate consta în deplasări sau/și deformări. În general, deplasarea nu modifică poziția relativă a elementelor ce formează corpul, dar modifică poziția acestuia, în raport cu un sistem de referință exterior. Ea constă în translația și/sau rotația corpului.

În alte condiții, prin aplicarea unei forțe sau a unui sistem de forțe, corpul poate fi deformat, ceea ce determină modificarea poziției relative a elementelor constituente. Un corp este deformat atunci când sub acțiunea solicitărilor se modifică forma și/sau volumul.

Deformarea, în cazul solidelor, are loc până la atingerea echilibrului între forțele interne și externe, în timp ce fluidele, prin aplicarea unei forțe anizotrope și neomogene, nu ajung la o deformație de echilibru. Gradul de deformare se schimbă continuu în timp.

Deformația a cărei valoare crește continuu și nu se mai recuperează după îndepărtarea forței se numește curgere.

Mărimile de bază care dau informații cantitative asupra efectelor provocate de forțe sunt deformația specifică și viteza de deformare.

Sub acțiunea unei tensiuni un corp se deformează. Deformația poate modifica volumul sau forma corpului. De asemenea, deformația poate fi elastică și se recuperează la descărcarea corpului, sau poate fi curgere și rămâne nerecuperată.

În cazul studierii proprietăților reologice ale hidrogelurilor, ca și instrumente se folosesc reometrele cu platane paralele (Figura 48).

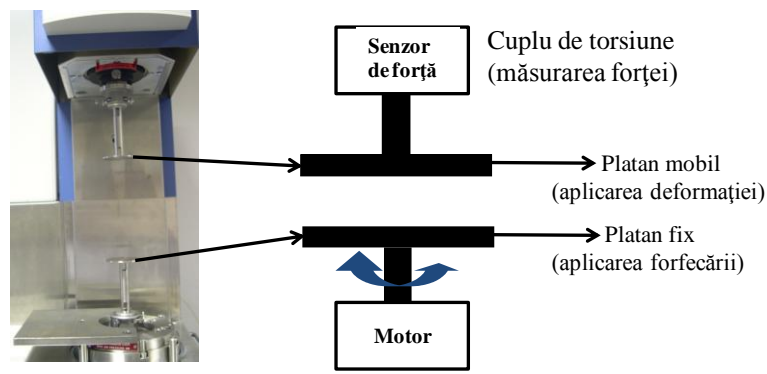


Figura 48. Schema unui reometru cu geometrie plan/plan

### II.2.6.1.1. Teste de compresiune

Avantajul major al realizării de teste de compresiune cu ajutorul unui reometru este că asigură aplicare unei viteze de deformare constante, astfel putând controla parametrii de compresiune. În urma unui test de compresiune se pot trasa grafice tensiune-deformare. Aplicând legea lui Hooke, conform căreia, în regiunea liniară deformarea este proporțională cu presiunea aplicată, putem calcula astfel modulul de elasticitate (Figura 49).

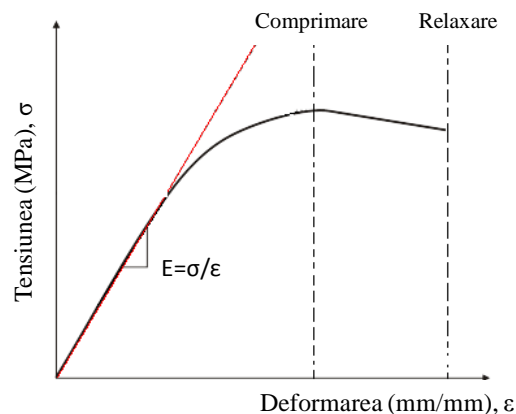


Figura 49. Curbă tip tensiune-deformare

### II.2.6.1.2. Teste de forfecare

Reometrul permite realizarea de teste dinamice, cum sunt testele de forfecare. Astfel, se poate determina natura elastică, plastică sau vâscoelastică a hidrogelurilor. Principiul de bază a acestor tipuri de teste constă în faptul că platanul inferior este fix, iar platanul superior, este antrenat în mișcare oscilatorie cu forța de forfecare (Figura 50).

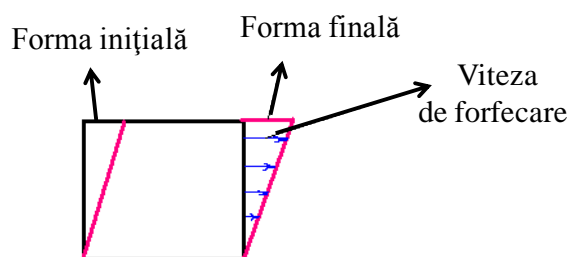


Figura 50. Schema principală a unui test de forfecare



Mărimile caracteristice determinate în urma testelor reologice oscilatorii sunt:

- Modulul de acumulări ( $G'$ ) care este o măsură a energiei de deformație acumulată în probă în cursul procesului de forfecare. După îndepărtarea solicitării această energie este disponibilă, acționând ca forță motoare a procesului de reformare. Deci,  $G'$  caracterizează comportarea elastică a materialului analizat.
- Modulul de pierderi ( $G''$ ) este o măsură a energiei de deformație utilizată de probă în cursul procesului de forfecare și, de aceea, este complet pierdută la îndepărtarea solicitării.  $G''$  caracterizează comportarea vâscoasă a materialului.
- Factorul de pierderi,  $\tan(\delta)$  este  $G''/G'$  caracterizează contribuțiile porțiunilor elastice și vâscoase în comportarea globală a probei analizate. În general, pentru starea de gel (solidă)  $\tan(\delta) < 1$  ( $G' > G''$ ).

Astfel, se poate determina modulul de elasticitate complex ( $G^*$ ), care este modulul de elasticitate la forfecare (ecuația 15):

$$|G^*| = \sqrt{G'^2 + G''^2} \quad (15)$$

### II.2.6.2. Microscopia de forță atomică

Microscopia de scanare (Scanning Probe Microscopy, SPM) este o familie de tehnici de măsură ce implică scanarea unei suprafețe cu un vârf foarte ascuțit și monitorizarea interacției vârf-suprafață pentru a crea o imagine de înaltă rezoluție a materialului studiat.

Multe alte tehnici SPM au fost dezvoltate pentru a da informații despre forța de frecare, aderența, elasticitate, duritate, câmp electric, câmp magnetic, concentrația de purtători, distribuția de temperatură, rezistența și conductivitate. Astfel, accesul la caracteristicile fizice ale suprafețelor este unul rapid.

Microscopia de forță atomică (Atomic Force Microscopy, AFM) a devenit cea mai folosită tehnică a SPM-ului. Un mare avantaj al AFM-ului este că poate opera în aer, vid și solvent la diferite temperaturi. Acest aparat este utilizat atât în cercetarea fundamentală cât și la scară mai mare, în industrie AFM-ul având un rol deosebit de important în dezvoltarea nanotehnologiei.

### Mod de lucru AFM

Nivelul ridicat de localizare spațială în măsurarea proprietăților fizice este datorat dimensiunii foarte mici a senzorului și de apropierea acestuia de suprafața studiată. În cazul AFM-ului, senzorul este constituit dintr-un cantilever echipat cu un vârf ce interacționează cu

suprafața. Un fascicul laser este reflectat de cantilever, modificările fizice ale suprafeței fiind asociate cu schimbarea semnalului din fotodetector (Figura 51).

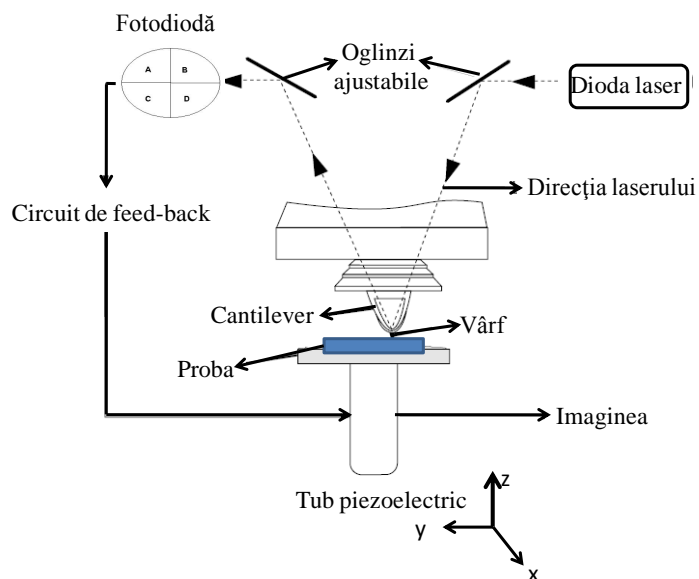


Figura 51. Schema funcțională a AFM-ului

Semnalului laser ce ajunge la un fotodetector este divizat în patru cadrane, fiecare indicând deflexia și/sau torsiunea cantilever-ului (Figura 52).

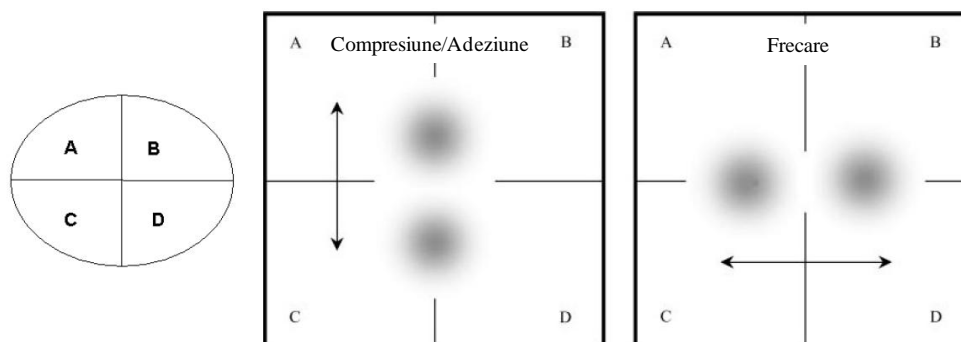
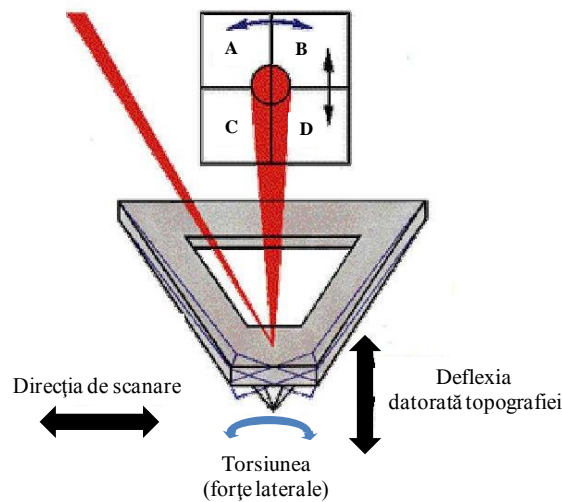


Figura 52. Schema de bază a fotodiodei

Semnalul de deflecție este  $(A+C)-(B+D)$ , este numit și semnal de înălțime. Semnalul de torsiune este  $(A+B)-(C+D)$ , semnalul de torsiune este asociat forței de frecare dintre vârful și suprafață (Figura 53).



**Figura 53. Reprezentarea schematică a celor două tipuri de semnale**

Modificările de semnal sunt preluate apoi, prin feedback, de un tub piezoelectric cu ajutorul căruia proba studiată este deplasată pe direcțiile X, Y și Z, senzorul rămânând mereu în poziție fixă.

Senzorul (vârful) are în general  $\sim 2\mu\text{m}$  lungime și o rază între  $10\text{nm}$ - $20\mu\text{m}$  iar cantilever-ul are  $100$ - $200\mu\text{m}$  lungime, și se caracterizează printr-o constantă elastică.

Rezoluția spațială de scanare este puternic influențată de dimensiunile vârfului. Procesele de microfabricare dezvoltate pentru microelectronică sunt folosite pentru producere acestor vârfuri cu dimensiuni nano. Senzorii ce sunt folosiți în aplicații a căror scop este analiza morfologiei suprafețelor sunt, în general, fabricați din siliciu sau nitrat de siliciu. Sunt folosite diverse tipuri de cantilevare (triunghiulare sau în formă de punte) în funcție de modul de operare AFM. Acestea pot fi acoperite cu filme subțiri conductive, magnetice, etc.

Toate sistemele SPM folosesc traductori piezoelectrice. Dilatarea sau compresia acestor materiale poate fi generată prin aplicarea unui câmp electric asupra unui material piezoelectric.

Prin circuitul de feedback se menține forța de interacțiune dintre vârf și probă la o anumită valoare (setpoint) pentru a evita distrugerea vârfului pe suprafață. Microscopul poate opera în două moduri: la înălțime constantă (fără feedback) și la curent constant (cu feedback). În modul curent constant, circuitul de feedback variază înălțimea pentru a menține curentul la o valoare constantă. Scopul feedback-ului este de a aduce valoarea măsurată cât mai aproape de valoarea de referință.

Modul de funcționare se rezumă la trei pași principali (Figura 54):

- Pasul 1: contactul cu suprafața (Figura 54a);
- Pasul 2: deplasarea în lateral a scaner-ului; deflexia cantilever-ului (Figura 54b);

- Pasul 3: mișcarea pe verticală a scanner-ului pentru a aduce cantilever-ul în starea inițială (Figura 54c).

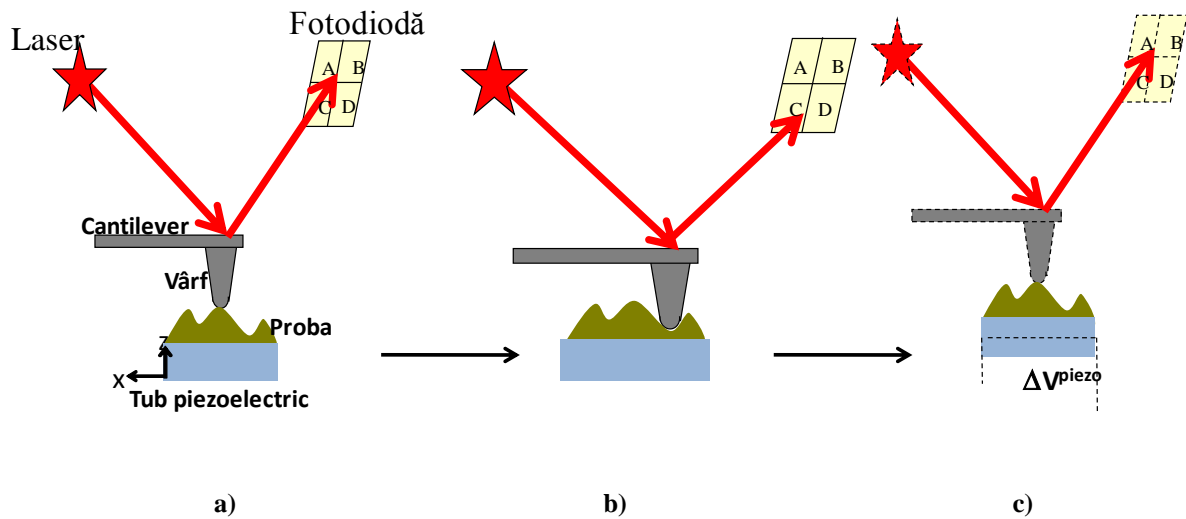


Figura 54. Pașii principali ai modului de funcționare a AFM-ului:

- contactul cu suprafața
- deflexia cantilevărului
- mișcarea pe verticală a scanner-ului

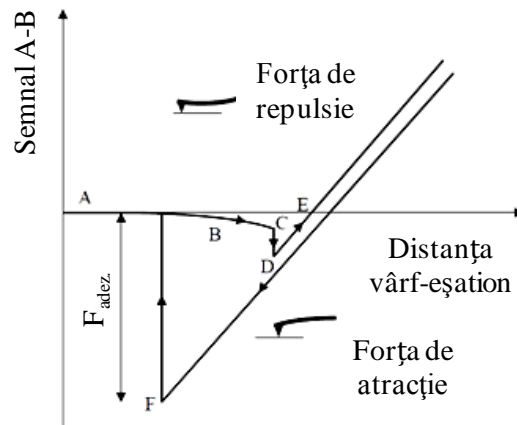
### II.6.2.2.1 Tipuri de măsurători AFM

#### Microscopia de forță laterală

AFM-ul măsoară topografia probelor prin trecerea vârfului nanometric pe o suprafață atât în aer cât și în lichid. Microscopia de forță laterală (Lateral Force Microscopy, LFM) măsoară forțele de frecare dintre vârf și suprafața studiată. Imaginile sunt generate cu ajutorul unui semnal ce vine de la fotodetector, acesta fiind asociată cu deflecțiile cantilever-ului în urma interacției acestuia cu suprafața.

#### Nanoidentarea

Identarea presupune apăsarea unui vârf în probă. Adâncimea și suprafața indentării sunt corelate cu duritatea suprafeței. Alte proprietăți precum elasticitatea, vâscozitatea și aderența pot fi de asemenea calculate din datele de indentare. Curbele corespunzătoare apăsării și ridicării vârfului în timpul nanoindentării sunt prezentate în figura 55. Rigiditatea probei este calculată făcând raportul dintre forța aplicată și suprafața reziduală a indentării. Modulul de elasticitate (modulul lui Young) se calculează din panta curbei corespunzătoare ridicării (retragerii) vârfului.



**Figura 55. Reprezentarea unei curbe tip de apropiere-retragere a vârfului față de o probă**

Departat de suprafață, nici o forță nu acționează asupra cantilever-ului care va rămâne imobil (A). Atunci când vârful se apropie de suprafață, forțele van der Waals vor duce la deflexia cantilever-ului (B) la punctul C, unde se produce o instabilitate a sa. În acest moment, gradientul de forță de atracție devine mai mare decât constanta elastică a cantilever-ului și acesta din urmă este atras brusc la suprafața probei. Punctul D corespunde forței maxime de atracție.

În cazul în care vârful continuă să penetreze proba, forțele de respingere vor crește până la punctul E, caz în care va avea loc compensarea forțelor de atracție, iar cantileverul va fi în repaus ca în punctul A. În plus, interacțiunea repulsivă domină și cantileverul își va schimba curbura. În sensul invers, forța aplicată scade până la întoarcerea în regim de atracție și în punctul F va apărea o instabilitate care va readuce cantileverul la starea de repaus: înălțimea este forța de adeziune maximă.

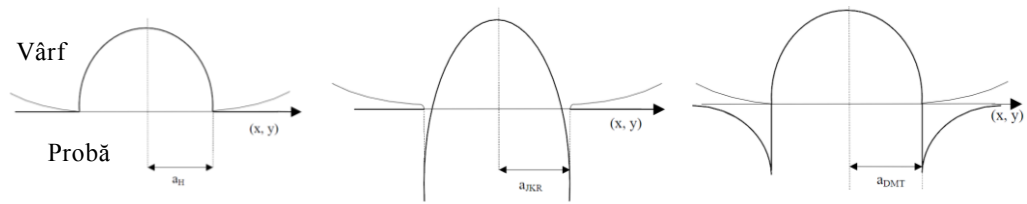
Curbele dus și întors nu se suprapun din cauza fenomenului de deformare plastică, care poate provoca o variație în răspunsul cantileverului.

Pentru interpretarea acestor curbe de forță, în funcție de caz, se folosește una din cele trei teorii de contact propuse: teoria lui Hertz [137], teoria lui JKR [138] și teoria lui DMT [139]. Selecția teoriei se face în funcție de sarcina aplicată și proprietățile de suprafață, caracteristici cum ar fi zona de contact, distribuția forței sau valoarea de indentare (Tabelul 3).

137 Hertz H., *On the contact of elastic solids*, *Journal für die reine und angewandte, Mathematik* (1881), 92: 156.

138. Johnson K.L., Kendall K., Roberts A.D., *Surface energy and the contact of elastic solid*, *Proceedings of the Royal Society A* (1971), 301-313.

139. Derjaguin B.V., Muller V.M., Toporov Z.P., *Effect of contact deformation on the adhesion of particles*, *Journal of Colloidal Interface Science* (1975), 53: 314-326.

**Tabelul 3 Teorii folosite la interpretarea curbelor de forță**


	<b>Hertz</b>	<b>JKR</b>	<b>DMT</b>
<b>Raza de contact</b>	$a = \left( \frac{R}{K} F_n \right)^{1/3}$	$a = \left( \frac{R}{K} \left( \sqrt{F_n + F_{ad}} + \sqrt{F_{ad}} \right)^2 \right)^{1/3}$	$a = \left( \frac{R}{K} (F_n + F_{ad}) \right)^{1/3}$
<b>Forța de adeziune</b>	$F_{ad} = 0$	$F_{ad} = \frac{3}{2} \pi w R$	$F_{ad} = 2 \pi w R$
<b>Raza de contact sub acțiunea unei forțe nule</b>	$a_0 = 0$	$a_0 = \left( \frac{6 \pi w R^2}{K} \right)^{1/3}$	$a_0 = \left( \frac{2 \pi w R^2}{K} \right)^{1/3}$
<b>Raza de contact după îndepărtarea vârfului</b>	$a_s = 0$	$a_s = \left( \frac{3 \pi w R^2}{2K} \right)^{1/3}$	$a_s = 0$
<b>Identarea elastică</b>	$\delta = \frac{a^2}{R}$	$\delta = \frac{a^2}{R} - \frac{4}{3} \sqrt{\frac{a F_{ad}}{R K}}$	$\delta = \frac{a^2}{R}$
<b>Rigiditatea contactului</b>	$k_N = \frac{3}{2} K a$	$k_N = \frac{3}{2} K a \frac{1 - \frac{1}{2} \left( \frac{a_0}{a} \right)^{3/2}}{1 - \frac{1}{6} \left( \frac{a_0}{a} \right)^{3/2}}$	$k_N = \frac{3}{2} K a$

În funcție de materialul testat se va opta pentru una din aceste teorii (Tabelul 4).

**Tabelul 4. Condiții pentru alegerea teoriilor de interpretare a curbelor de forță**

<b>Teoria lui Hertz</b>	<b>Teoria lui JKR</b>	<b>Teoria lui DMT</b>
Nu se poate folosi în cazul în care forțele sunt mici, sau dacă există forțe de adeziune	-Forțe de atracție pe distanțe mici -Forțele de suprafață acționează în interiorul zonei de contact	- Forțele de atracție sunt pe distanțe lungi -I-a în considerare și forțele de atracție în afara zonei de contact
Se aplică pentru :	Se aplică la:	Se aplică la:
-materiale rigide pentru care deformările elastice sunt foarte mici	-forțe de adeziune puternice	- forțe de aderență mici
-lipsa adeziunii	-materiale flexibile	-raze de contact mici
-deformarea vârfului	-pentru raze de curbură mari	
Acestă teorie	-vârfuri de formă parabolică parabolice	

reprezintă modelul de contact dintre o sferă de rază $R$ și un plan (proba)	Dezavantaje: -subestimarea forței în suprafață  -prezența unor deformări infinite	Dezavantaje: - subestimarea razei de contact
Pentru materialele vâscoelastice există o extindere a teoriei lui Hertz, metoda Sheddon	Între extremitățile celor două teorii (JKR și DMT) se mai poate aplica o altă teorie, numită teoria Maugis-Dugdale.	

Testele mecanice la scară macro au fost realizate cu ajutorul unui reometru tip ARES (Advanced Rheometric Expansion System- Sistem Avansat de Reometrie Expansională, ARES), cu viteză de deformare și viteza de forfecare controlate. Celula de încărcare este de maxim 20N și este alcătuită din două platane de metal cu diametrul de 50mm, în configurația plan/paralelă. Aparatul este dotat de asemenea cu un program de lansare și prelucrare a datelor (TA Orchestrator).

AFM-ul utilizat la testele mecanice la scară nano a fost de tipul Veeco Nanoscope III, (Digital Instruments, Santa Barbara, CA). Au fost folosite trei tipuri de vârfuri nanometrice:

- vârf conic, din nitruură de siliciu ( $\text{Si}_3\text{Ni}_4$ ) (Micromasch NSC21) cu raza de 10nm și constanta elastică de 0,12 N/m (Veeco, DNP-S10),
- vârf ascuțit, din nitruură de siliciu ( $\text{Si}_3\text{Ni}_4$ ) cu raza de 10nm și constanta elastică de 1N/m,
- vârf de formă sferică din borosilicat cu raza de 20 $\mu\text{m}$  și constanta elastică de 2,8 N/m (NanoandMore, CP-FM-BSG).

## II.2.7. Teste *in vitro* de încărcare și eliberare de principii active în/din hidrogeluri

Tehnica de spectroscopie în ultraviolet-vizibil (UV-VIS) este una dintre cele mai frecvent utilizate în analiza principiilor active. Aceasta implică măsurarea cantității de radiații ultraviolete și vizibile (190-600 nm), radiații absorbite de o substanță în soluție.

Instrumentele care măsoară raportul, sau o funcție a raportului intensității a două fascicule de radiații în regiunea UV-VIS sunt numite spectrofotometre UV-VIS. Absorbția radiațiilor atât în domeniul ultraviolet cât și vizibil ale spectrului electromagnetic are loc atunci când energia radiației se potrivește cu cea necesară pentru a induce în moleculă o tranziție electronică, tranziții vibraționale și de rotație. Prin urmare, este convenabil să se ia în considerare tehnicile de spectrofotometrie cu raze ultraviolete și vizibile.

### **Principiile spectroscopiei de absorbție UV-VIS**

Când un fascicul de radiație este trecut printr-o cuvă transparentă care conține o soluție a unei substanței absorbite, poate să apară o reducere a intensității radiației. Reducerea se datorează în parte datorită reflecțiilor suprafețelor și oricărei particule suspendate în lichid, dar în lichidele clare (cazul soluțiilor de medicament în soluții tampon), este în primul rând reprezentată de absorbția radiației de către lichid [140].

Adesea experimentele sunt limitate la un tip de solvent special sau o clasa de solvenți în care substanța cercetată este solubilă. O alta restricție o constituie atunci când se lucrează în gama de ultraviolete, în care absorb majoritatea solvenților.

### **Curba de etalonare**

Liniaritatea curbei de etalonare este determinată în funcție de concentrația soluției într-o regiune prevăzută, în care liniaritatea este acceptabilă ca precizie și acuratețe [141].

Liniaritatea este, în general, raportată la variația pantei liniei de regresie. Gama este reprezentată de intervalul dintre concentrațiile superioare și inferioare de soluții care au fost inițial stabilite folosindu-se metoda liniarității (Figura 56).

---

140. Davidson A.G., *Ultraviolet-visible absorption spectrophotometry*, In Practical Pharmaceutical Chemistry 4th Edition Part Two, A. H. Beckett, J. B. Stenlake (eds.), The Atlone Press, London, UK (1988), p. 275-337.  
141. McGonigle E., *Assay validation and inter-laboratory transfer*. In Development and Validation of Analytical Methods, C. M. Riley, T. W. Rosanske (eds.), Elsevier Science Ltd., Oxford, UK (1996), p. 3 – 13.



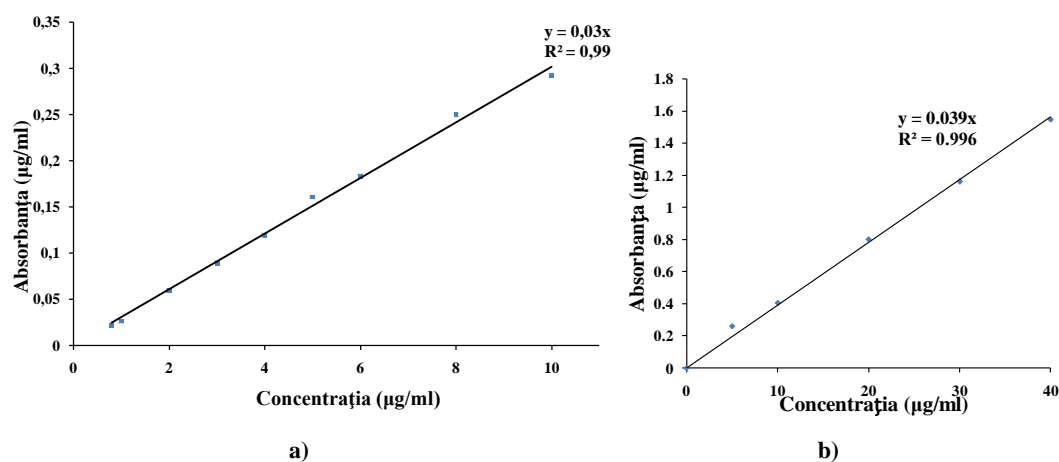


Figura 56. Reprezentarea unei curbe etalon:

a) pentru ketoprofen

b) pentru ibuprofen

### Aparatura folosită

Pentru obținerea unor rezultate fezabile cel mai indicat pentru realizarea analizelor spectrofotometrice este utilizarea unei băi de testare a dizolvării. Pentru a controla cât mai bine parametrii, este de preferat ca acesta să fie echipat cu un încărcător automat de probe, pompă peristaltică de prelevare a probelor, spectrofotometru, un calculator și un software adecvat.

#### II.2.7.1. Modele matematice care descriu eliberarea controlată de principii biologic active

Eliberarea controlată de agenți biologic activi poate fi realizată prin încorporarea acestora în stare dizolvată sau dispersă în polimeri. Comportamentul de eliberare, poate fi interpretat și cu ajutorul unor metode matematice, pentru a descrie eliberarea. Cu toate că aceste modele matematice sunt bazate pe ecuațiile de transport (difuzie), ele sunt cunoscute în industria farmaceutică ca expresii cinetice sau modele, pentru că descriu un comportament în funcție de timp, al medicamentului eliberat. Din punct de vedere al unui model matematic, sistemele de eliberare controlată pot fi clasificate în funcție de mecanismul fizic de eliberare al medicamentului încorporat. Ele pot fi clasificate în funcție de mecanismul de transport în: difuzie controlată, umflare controlată, control osmotic, și control chimic.

Aceste modele matematice pot fi utile în:

- precizarea vitezei de eliberare și comportamentul de difuzie al medicamentului din polimeri, pentru a evita repetarea succesivă a experimentelor,
- pentru a clarifica mecanismul fizic de transport al medicamentului prin compararea cu modele matematice de eliberare.

Modelul care se potrivește cineticii de eliberare va fi ales în funcție de coeficientul de corelare. Modelul cu coeficientul de corelare cel mai mare este considerat ca fiind cel mai potrivit pentru datele de eliberare.

Modelele matematice sunt:

- cinetica de ordin zero - model de difuzie;
- cinetica de ordin 1 - model de difuzie;
- modelul Hixson-Crowel;
- modelul Higuchi;
- modelul Korsmeyer-Peppas - model de umflare controlată.

### Cinetica de ordin zero

Describe sistemele în care viteza de eliberare a medicamentului este dependentă de concentrația substanței eliberate.

Ecuția pentru eliberarea de ordin zero este descrisă de relația (16):

$$Q_t = Q_0 + K_0 t$$

(16)

unde:  $Q_0$  este cantitatea inițială a medicamentului,

$Q_t$  este cantitatea de medicament eliberată la timpul 't',

t este timpul,

$K_0$  este constanta vitezei reacției de eliberare de ordin zero.

Se va trasa graficul procentului de medicament eliberat în funcție de timp (Figura 57), rezultând o linie dreaptă.

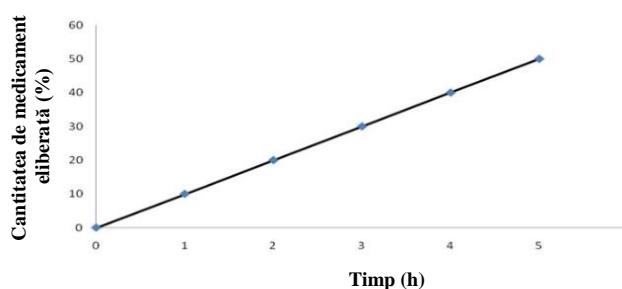


Figura 57. Cinetica de ordin zero

### Cinetica de ordin unu

Ecuția cineticii de ordin unu este descrisă de relația 17:

$$\text{Log } Q_t = \text{Log } Q_0 + K t / 2,303 \quad (17)$$

Unde:  $Q_0$  este cantitatea inițială a medicamentului,

$Q_t$  este cantitatea de medicament eliberată la timpul 't',

t este timpul,

$K_0$  este constanta vitezei reacției de eliberare de ordin unu.

Viteza de eliberare a medicamentului depinde de concentrația sa.

Se va trasa graficul care are pe abscisă timpul iar pe ordonată logaritmul procentului masei de medicament care a rămas neeliberată (Figura 58), rezultând o linie dreaptă.

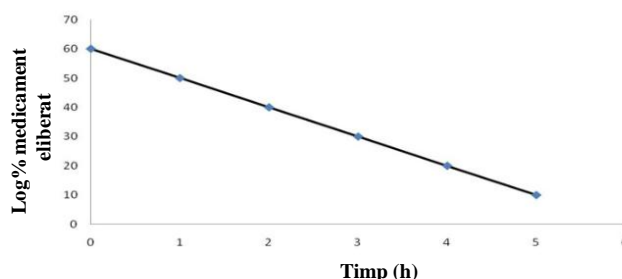


Figura 58. Cinetica de ordin unu

### Modelul Higuchi

Modelul matematic de eliberare controlată Higuchi [142] descrie eliberarea de medicamente ca fiind un proces de difuzie pe baza legii lui Fick, dependente de rădăcină pătrată a timpului. Această relație poate fi folosită pentru a descrie dizolvarea medicamentelor din mai multe forme de dozare, ca în cazul unor sisteme de eliberare transdermice și matrici înglobate cu principii active solubile în apă [143]. Pentru eliberarea de medicamente, în care principiul activ este inițial uniform dizolvat este descris de ecuația (18) și (19):

$$Q = 2C_0 \left( \frac{Dt}{\pi} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (18)$$

$$R = 200 \left( \frac{Dt}{\pi h^2} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (19)$$

unde: Q este cantitatea de medicament eliberată,

h este grosimea comprimatului respectiv,

$C_0$  este concentrația inițială de medicament,

D este coeficientul de difuzie a medicamentului,

t este timpul,

R este procentul de medicament eliberat.

142. Higuchi W.I., *Analysis of data on the medicament release from ointments*, Journal of Pharmaceutical Sciences (1962), 51: 802 – 804.

143. Costa P., Lobo J.M.S., *Modelling and comparison of dissolution profiles*, European Journal of Pharmaceutical Sciences (2001), 13: 123 - 133.

În cazul în care cinetica de eliberare de medicamente se supune acestei legi, cantitatea de medicament eliberat este o funcție liniară a  $t^{1/2}$  și  $D$  (Figura 59), și poate fi calculată din panta curbei. Ipoteza acestui model matematic constă în faptul că, medicamentul este singura componentă care difuzează din suport, iar  $D$  rămâne constantă în timp.

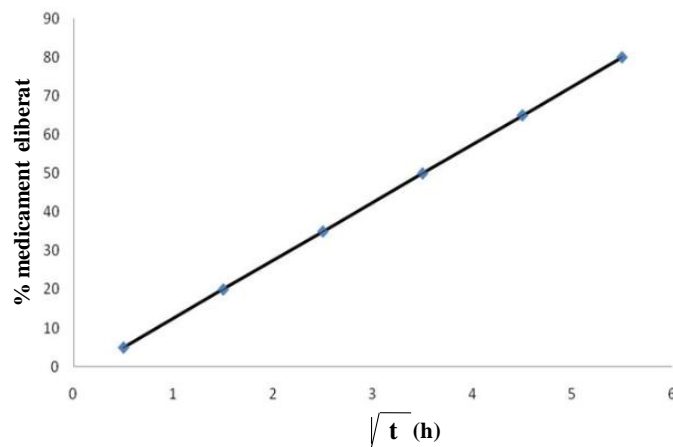


Figura 59. Modelul matematic de eliberare Higuchi

### Modelul Hixson – Crowell

Ecuatia (20) modelului Hixson - Crowell este :

$$3\sqrt{Q_0} - 3\sqrt{Q_t} = K_{HC} \cdot t \quad (20)$$

unde:  $Q_0$  este masa inițială de medicament,

$Q_t$  este masa cumulată de eliberare de medicament la momentul "t",

$K_{HC}$  este constanta de eliberare Hixson Crowell,

t este timpul.

Acest model matematic descrie eliberarea de medicamente prin dizolvare, cu schimbări în suprafață și diametru comprimatelor. Un grafic este trasat în funcție de diferența dintre rădăcina pătrată a concentrației inițiale și rădăcina patrată a procentului de medicament rămas în funcție de timp (Figura 60), în conformitate cu ecuația Hixson-Crowell.

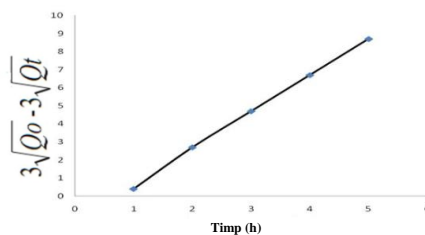


Figura 60. Modelul matematic de eliberare Hixson-Crowell

### Modelul KORSMEYER-PEPPAS

Ecuția Korsmeyer - Peppas este descrisă de ecuația 21:

$$F=(M_t/M)=K_m t^n \quad (21)$$

unde:  $F$  este fracția de medicament eliberată la momentul " $t$ ",

$M_t$  este cantitatea de medicament eliberată la momentul " $t$ ",

$M$  este cantitatea totală de medicament din formula farmaceutică,

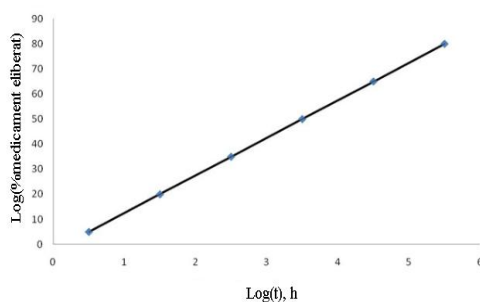
$k_m$  este constantă de viteză,

$n$  este exponentul de difuzie sau eliberare,

$t$  este timpul.

" $n$ " este estimat din regresie liniară a  $\log(M_t/M)$  funcție de  $\log t$  (Figura 61).

Dacă  $n$  este 0,45 indică o difuzie de tip Fickian; dacă  $0,45 < n < 0,89$  indică o difuzie neregulată sau de difuzie non-Fickiană.



**Figura 61. Modelul matematic de eliberare Korshmeyer-Peppas**

Dacă  $n$  este 0,89, indică un fenomen de relaxare tip 2.

Difuzia non-Fickiană se referă la combinație a celor două tipuri de difuzie și de eroziune controlată.

În cadrul acestei teze, eliberarea medicamentului a fost realizată cu ajutorul unei băi de testare a dizolvării (Dissolution Tester, DT 706/100LH, Erweka) echipat cu un încărcător automat de probe (Erweka), pompă peristaltică de prelevare probe cu 8 canale (Erweka), spectrofotometru (UV-VIS 1700), un calculator și un soft adecvat (Erweka). Probele au fost măsurate în cuve de cuarț identice 10 mm. Lățimea fantei a fost stabilită la 2 nm, cu un timp de integrare de 1 s.

## **CAPITOLUL III**

### **SINTEZA ȘI CARACTERIZAREA HIDROGELURILOR**

*” Invenția este o combinație între intelect și materiale.  
Cu cât îți folosești mai mult intelectul cu atât  
o să folosești mai puține materiale .”*

*” Un inventator eșuează de 999 ori, și dacă reușește  
o singură dată, continuă. El își privește eșecurile pur  
și simplu ca pe niște încercări. ”*

*Charles F. Kettering (1876-1958)*

**Hidrogelul** este o entitate materială cu o structură tridimensională formată din: polimeri hidrofili, insolubili în apă, dar care au capacitatea de a reține o mare cantitate de apă prin umflare, având o consistență moale și elastică și o tensiune superficială redusă, și o importantă cantitate de apă, cu proprietăți intermediare lichidelor și solidelor. În general, cantitatea de apă depășește 20% din greutatea hidrogelului. Cea mai importantă caracteristică a hidrogelurilor este umflarea sau contracția lor în prezența sau absența apei.

Individualizarea hidrogelurilor de alte materiale polimerice se face ținând cont de următoarele caracteristici:

- au volum și formă proprie;
- sunt, în general, medii transparente (incolore sau colorate); pot fi și opace;
- sub acțiunea căldurii (uscarea) are loc o pierdere accentuată de masă însoțită de o puternică contracție a volumului;
- la solicitări mecanice reduse au un comportament elastic pronunțat;
- la eforturi de comprimare are loc contracția volumului și creșterea densității.

Conținutul ridicat în apă determină proprietățile mecanice, de difuziune și de absorbție ale hidrogelurilor, conferindu-le capacitatea de a mima țesuturile vii. Permite, de asemenea, mărirea fracțiunii de biomolecule legate la suprafață, controlând interacțiunile hidrogel-mediul biologic. Modificarea conținutului de apă afectează permeabilitatea pentru electroliți, substanțe cu greutate moleculară mică și gaze.

Posibilitatea obținerii hidrogelului în forme geometrice variate și schimbarea relativ ușoară a formei fizice permite ajustarea proprietăților fizice în funcție de aplicație. În general,

caracteristicile fizice ale hidrogelurilor sunt determinate de metoda de sinteză și de parametrii de reacție.

Modul de structurare al apei, dependent de compoziția hidrogelului influențează interacțiunile biologice. Astfel, apa din hidrogeluri poate fi polarizată în jurul sarcinilor ionice, orientată spre dipoli, structurată în vecinătatea grupelor hidrofobe sau îmbibată în pori. Prezența sarcinilor negative pe suprafața hidrogelurilor nu este esențială pentru compatibilitatea sangvină, deși este favorizantă.

Pentru menținerea structurilor tridimensionale ale hidrogelurilor literatura de specialitate indică reticularea fizică și chimică a lanțurilor polimerice. În gelurile chimice, lanțurile polimerice sunt conectate prin legături covalente fiind astfel dificilă schimbarea formei acestor geluri. În cazul gelurilor fizice, lanțurile polimerice formează legături necovalente: legături Van der Waals, legături neionice, legături de hidrogen sau interacțiuni hidrofobe [144,145, 146].

Performanțele biomedicale ale hidrogelurilor sunt corelate cu conținutul de apă, compoziția chimică și puritatea polimerului, densitatea de reticulare, porozitatea, structura cvasiorganizată a apei și parametrii termodinamici de interacțiune dintre componenții mediului biologic și gel [147, 148].

Adecvarea unei anumite structuri polimerice la un scop precis, în cazul de față la rigorigle și funcțiile cartilajului, implică o bună cunoaștere a modului în care proprietățile polimerului pot fi dirijate încă din timpul procesului de polimerizare. Parametrii de influență asupra proprietăților hidrogelului rezultat prin polimerizare sunt: natura, concentrația și puritatea monomerilor utilizați, cantitatea de agent de reticulare, puritatea inițiatorului și a activatorului de inițiator, tehnica de polimerizare utilizată, parametrii tehnologici ai procesului de polimerizare.

Față de aceste aspecte lucrarea își propune realizarea de hidrogeluri pe bază de p(HEMA) și comonomeri cu caracter puternic hidrofil (acid acrilic-AA, acrilamidă-AAm) sau hidrofob (acrilat de etil - AE, acrilat de butil - AB), în prezența unui monomer bifuncțional cu

144. Stathopoulos A., Klonos P., Kyritsis A., Pissis P., Christodoulides C., Rodriguez Hernández J.C., Monleón Pradas M., Gómez Ribelles J.L., *Water sorption and polymer dynamics in hybrid poly(2-hydroxyethyl-co-ethyl acrylate)/silica hydrogels*, European Polymer Journal (2010), 46(1): 101-111.

145. Singh T.R.R., McCarron P.A., Woolfson A.D., Donnelly R.F., *Investigation of swelling and network parameters of poly(ethylene glycol)-crosslinked poly(methyl vinyl ether-co-maleic acid) hydrogels*, European Polymer Journal (2009), 45(4): 1239-1249.

146. Tomić S.Lj., Mičić M.M., Filipović J.M., Suljovrujić E.H., *Swelling and drug release behavior of poly(2-hydroxyethyl methacrylate/itaconic acid) copolymeric hydrogels obtained by gamma irradiation*, Radiation Physics and Chemistry (2007), 76(5): 801-810.

147. Van Tomme S.R., Storm G., Hennink W.E., *In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications*, International Journal of Pharmaceutics (2008), 35(1-2): 1-18.

148. Annabi N., Mithieux S.M., Boughton E.A., Ruys A.J., Weiss A.S., Dehghani F., *Synthesis of highly porous crosslinked elastin hydrogels and their interaction with fibroblasts in vitro*, Biomaterials (2009), 30(27): 4550-4557.

rol de reticulant, tetraetilenglicol diacrilat (TEGDA) în scopul utilizării lor în ingineria tisulară a cartilajului. Din punct de vedere chimic p(HEMA) prezintă legături covalente ce nu pot fi degradate enzimatic sau hidrolizate de acizi sau baze, are un conținut crescut în apă, de aproximativ 40%, ce poate fi controlat prin adaosul de monomeri cu caracter puternic hidrofil sau hidrofob, controlând, în același timp și proprietățile mecanice ale materialului.

### **III.1. Sinteza hidrogelurilor pe bază de HEMA și comonomeri cu caracter hidrofil sau hidrofob**

Hidrogelurile au fost sintetizate prin metoda de polimerizare radicalică, procedeul adoptat fiind de polimerizare în masă. Polimerizarea radicalică între monomeri și reticulant duce la formarea de zone reticulate mai mult sau mai puțin dense, în rețeaua de hidrogel; aceste tipuri diferite de reticulare poate să introducă neomogenități spațiale în rețeaua hidrogelurilor.

În reticularea chimică, lanțurile de polimer sunt reticulate la diferite segmente, cu diferite lungimi. Sub acțiunea de comprimare, deformarea este localizată cel mai adesea pe cele mai scurte lanțuri polimer, și, ca urmare, rețeaua reticulată este distrusă. Acest comportament mecanic la nivel molecular este, de asemenea, susținut la nivel macro; astfel, hidrogelurile convenționale sunt fragile din punct de vedere mecanic. Pentru îmbunătățirea proprietăților fizico-chimice și mecanice ale hidrogelurilor p(HEMA), ele au fost copolimerizate printr-o reacție de polimerizare radicalică cu monomeri având caracter hidrofil (AA, AAm), sau hidrofob (AE, AB).

Pentru a obține structura reticulată, ca agent de reticulare s-a folosit tetraetilenglicol diacrilat.TEGDA

Ca inițiator s-a utilizat un sistem redox, din inițiator solubil în apă s-a optat pentru procedeul în masă, la temperatura mediului ambiant, nefiind recomandată pentru aplicația considerată folosirea agentului termic sau a solvenților organici (care dau contaminări toxice).

Sistemul de inițiere redox utilizat pentru fabricarea gelurilor chimice prin polimerizare radicalică este constituit din APS și TEMED [149,150]. Un sistem ideal de inițiere trebuie să declanșeze reacția de polimerizare ușor, într-un timp scurt, și fără să inițieze producerea de produși citotoxici.

149. Feng X. D., Guo X. Q., Qiu K. Y., *Study of the initiation mechanism of the vinyl polymerization with the system persulfate/N, N,N', N'-tetramethylethylenediamine*, Makromolekular Chemistry (1988), 189: 77-83.

150. Zhang X. Z., Zhuo R. X., *Synthesis and properties of fast responsive, temperature sensitive p(NIPA-co-AA) hydrogel*, Chemical Journal of Chinese University (2000), 21(8): 1309-1311.



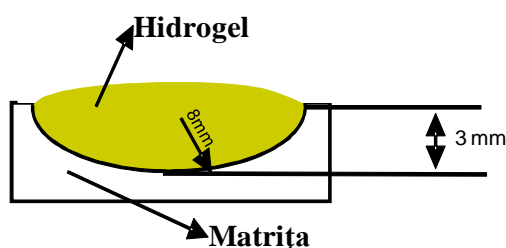
Duan și colaboratorii [151] au studiat mecanismul de inițiere APS/TEMED, și au arătat ca acest sistem are o toxicitate mică. Viteza de polimerizare este mărită, prin urmare scade durata procesului de sinteză a hidrogelului.

Gradul de umflare în soluții de interes biologic a fost controlat prin modificarea cantității de comonomer luată în experimente, variindu-se concentrația între 5 și 25 % (mol/mol). Cantitatea de reticulant TEGDA a fost de 5 % molar/molar) față de amestecul total de monomeri (HEMA+comonomer), iar inițiatorul a reprezentat 1 % (molar/molar) față de amestecul total de monomeri (incluzând agentul de reticulare). Soluțiile de inițiatori au fost preparate în concentrații de 5%(procente masice, în apă distilată). Componentele s-au amestecat în ordinea prezentată în tabelul 5 în fiolă de cântărire și s-a amestecat ușor cu o spatulă pentru omogenizarea amestecului.

**Tabelul 5. Exemplu de cantități calculate pentru sinteza de hidrogelurilor HEMA 5%AA**

Substanța	Cantitatea (ml)
HEMA	8,85
AA	0,48
TEGDA	0,05
APS	3,65
TEMED	1,85

După omogenizare, amestecul s-a turnat într-o matriță din ceramică emailată (Figura 62) pentru obținerea de suprafețe cât mai puțin rugoase. Amestecurile turnate în matriță au fost menținute timp de 24h la temperatura camerei, pentru definitivarea formării hidrogelurilor.



**Figura 62. Reprezentarea schematică a matriței de sinteză a hidrogelurilor**

Pentru a controla cât mai bine parametrii de reacție (aparitia de bule în structură, datorită unei viteze mari de reacție care nu lasă să iasă tot aerul din hidrogel), polimerizarea a

151. Duan S., Zhu W., Yu L. and Ding J., *Negative cooperative effect of cytotoxicity of a di-component initiating system for a novel injectable tissue engineering hydrogel*, Chinese Science Bulletin (2005), 50(11): 1093-1096.

avut loc în condiții anaerobe. Substanțele au fost degazeificate înainte de a fi folosite, iar polimerizarea a avut loc sub vid, pentru a evita formarea bulelor de aer în hidrogeluri.

Hidrogelurile obținute au fost purificate prin spălare cu apă distilată, timp de 5 zile, pentru a se îndepărta restul de produși nereacționați, schimbând zilnic apa. Acest lucru a fost evidențiat prin măsurarea valorii pH-ului, iar apa distilată a fost schimbată până când valoarea pH-ului soluției de spălare nu a fost diferită de a apei distilate.

Schema reacțiilor de polimerizare radicalică este prezentată în figura 63.



Prin copolimerizarea HEMA cu AA sau AAm, în prezență de reticulant TEGDA se obțin hidrogeluri cu hidrofilie crescută, prin introducerea în structura materialelor a grupelor –COOH sau –NH<sub>2</sub>, materialele obținute fiind sensibile la variația pH-ului mediului.

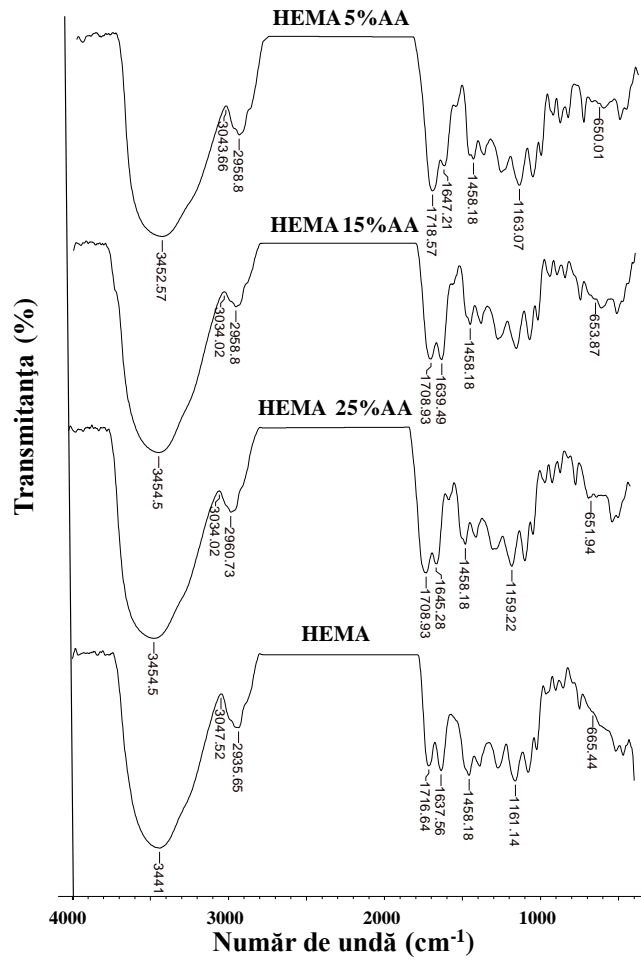
Prin copolimerizarea HEMA cu AE sau AB, în prezență de reticulant TEGDA se obțin hidrogeluri cu hidrofilie redusă față de a hidrogelurilor p(HEMA); caracteristicile de umflare, în acest caz, sunt controlate atât de interacțiuni prin legături de hidrogen, cât și ca urmare a organizării componentului hidrofob în matricea polimerică hidrofilă.

## **III.2. Caracterizarea hidrogelurilor**

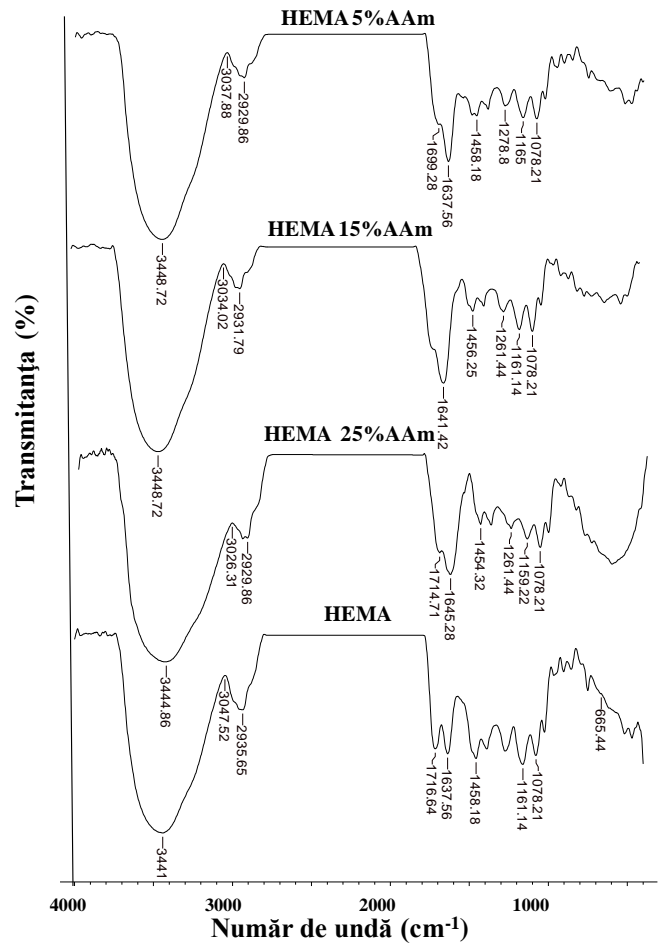
### **III.2.1. Analiza prin spectroscopie FTIR**

Analiza spectrală FTIR s-a bazat pe identificarea benzilor de absorbție care corespund vibrațiilor grupelor funcționale din molecule, în domeniul 400-4000 cm<sup>-1</sup>. În urma reacției de polimerizare se produce o scindare a legăturii duble C este C, care are un pic de absorbție în FTIR la 1636 cm<sup>-1</sup>. Acest pic nu apare în nici unul din spectrele hidrogelurilor sintetizate, ca rezultat că polimerizarea a avut loc.

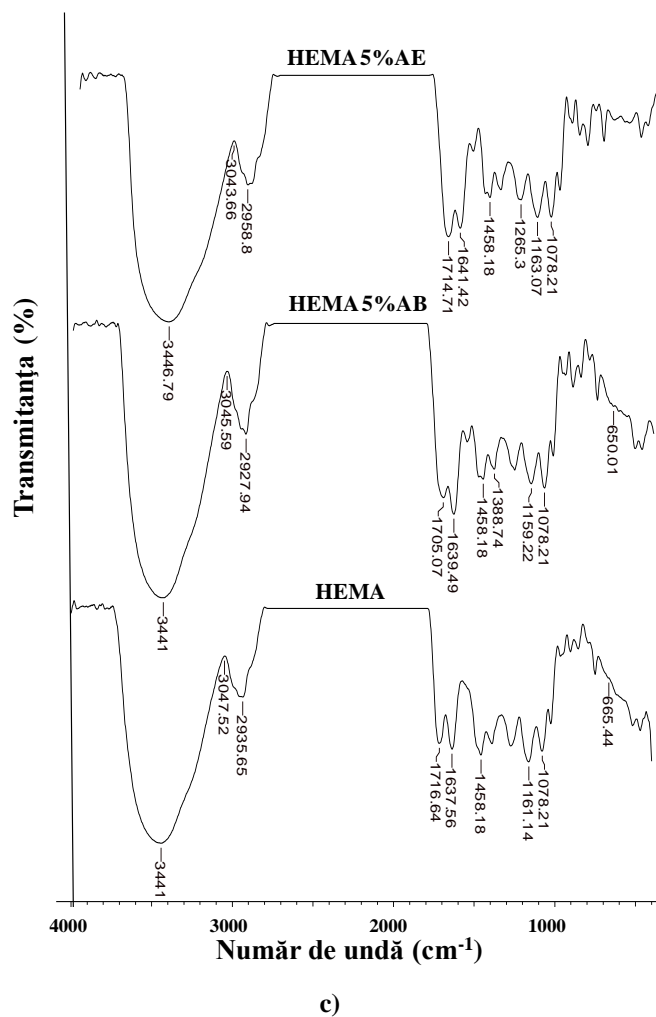
Spectrele de absorbție ale hidrogelurilor sintetizate sunt prezentate în figura 64.



a)



b)



c) **Figura 64. Spectrele FTIR pentru hidrogelurile sintetizate:**

- a) hidrogeluri pe bază de HEMA și AA
- b) hidrogeluri pe bază de HEMA și AAm
- c) hidrogeluri pe bază de HEMA și AE, AB

Pentru toate hidrogelurile sintetizate, apar benzi de absorbție specifice pentru HEMA și comonomerii folosiți: picul caracteristic la  $\sim 1730$  cm<sup>-1</sup> este datorat prezenței vibrației de întindere C-O din TEGDA, iar picul de cel de la  $\sim 1640$  cm<sup>-1</sup> corespunde legăturii C este O.

Grupărilor OH ale HEMA sunt reprezentate de picul  $\sim 3440$  cm<sup>-1</sup> iar CH<sub>3</sub> corespund picului 1458 cm<sup>-1</sup>. Gruparea metil și metilen au pic caracteristic la  $\sim 2960$  cm<sup>-1</sup>. La 1458 cm<sup>-1</sup> este reprezentată formarea legăturii C-C dintre monomeri.

Picul caracteristic observat la 650 cm<sup>-1</sup> este datorat vibrației în plan a legăturii -OH a grupărilor carboxilice ale AA. În cazul hidrogelurile cu acrilamidă, pe lângă picurile caracteristice HEMA aparare banda de absorbție de la 1261 cm<sup>-1</sup> care aparține legăturii C-N.

Odată cu creșterea procentului de comonomer, se poate observa o creștere a intensității benzii -OH ( $\sim 3440$  cm<sup>-1</sup>), benzii corespunzătoare legăturii C=O ( $\sim 1640$  cm<sup>-1</sup>) și a benzii

caracterisitice grupării metil, ceea ce confirmă faptul că copolimerul este prezent în structura hidrogelurile sintetizate.

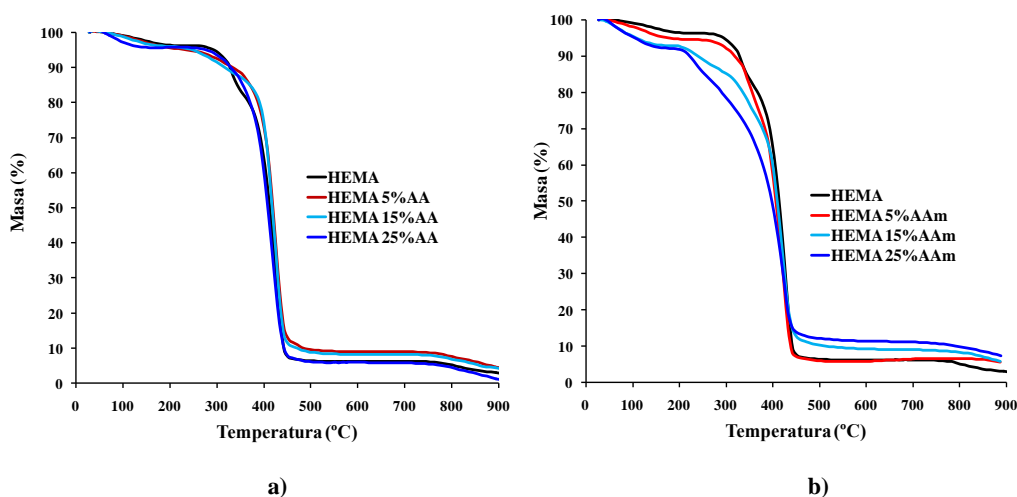
Din spectrele FTIR rezultă faptul că reacția de polimerizare a avut loc cu succes.

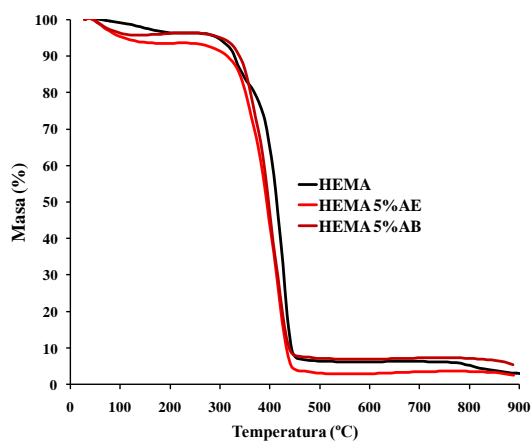
## III.2.2. Analize termice

### III.2.2.1. Analiza termogravimetrică

Pentru caracterizarea stabilității termice se determină temperatura la care începe degradarea termică a polimerului. Practic, odată cu inițierea degradării termice se modifică masa moleculară a acestuia [3]. Se consideră valori maxime ale temperaturilor pentru stabilitatea polimerului respectiv, temperatura la care masa probei a pierdut 1% din masa inițială. Se poate observa cu ușurință (Figura 62) că procesul de degradare termică a hidrogelurilor se manifestă cu intensitate maximă atunci când panta este maximă, deci derivata pierderii de masă are un maxim.

Flexibilitatea sistemelor polimerice este legată de morfologia, geometria și activitatea chimică. Termogramele înregistrate în condițiile menționate în capitolul 2, cuprind curbele TG ale hidrogelurilor sintetizate (Figura 66) și indică existența a două sau trei etape de degradare termică. Descompunerea termică are loc în două sau trei domenii distincte. În prima etapă pierderile procentuale de masă sunt mai mici de 10%. Principalele caracteristici termogravimetrice sunt prezentate în tabelul 6.





c)

Figura 65. Termogramele hidrogelurilor sintetizate:

- a) hidrogeluri pe bază de HEMA și AA  
 b) hidrogeluri pe bază de HEMA și AAm  
 c) hidrogeluri pe bază de HEMA și AE, AB

Tabelul 6. Principalele caracteristici termogravimetrice

PROBA	ETAPA	Tonse t	Tpeak	Tendset	W%	Reziduu
H MA	I	71	89	188	4	2,6
	II	<b>294</b>	335	381	18,2	
	III	381	426	445	75,2	
HEMA 5%AA	I	54	72	138	5	0
	II	<b>331</b>	419	450	95	
HEMA 15%AA	I	91	195	195	5,5	3,5
	II	<b>362</b>	425	449	91	
HEMA 25%AA	I	62	123	164	4,4	3,3
	II	251	285	392	11	
	III	<b>392</b>	423	443	81,3	
HEMA 5%AAm	I	64	163	316	5,75	5,37
	II	<b>316</b>	353	388	25,32	
	III	388	421	440	63,56	
HEMA 15%AAm	I	50	55	147	6,92	5,48
	II	<b>325</b>	337	380	26,60	
	III	380	421	445	61	
HEMA 25%AAm	I	46	57	141	8	6
	II	209	229	360	60	



	III	<b>360</b>	421	439	26	
HEMA 5%AE	I	44	62	120	7	2
	II	<b>322</b>	414	440	91	
HEMA 5%AB	I	43	60	104	5	6
	II	<b>328</b>	404	440	89	

Tonset – temperatura la care începe degradarea termică în fiecare etapă,

Tpeak – temperatura la care viteza de degradare din fiecare etapă este maximă,

Tendset – temperatura la care se termină degradarea termică în fiecare etapă,

W% pierderea procentuală de masă din fiecare etapă, reziduu – cantitatea de probă degradată ce rămâne la temperatură mai mare de 700°.

Din rezultatele obținute se poate observa că hidrogelurile sintetizate au o stabilitate termică mai mare decât ale hidrogelului HEMA, iar această stabilitate în general crește odată cu creșterea procentului de comonomer folosit la sinteză. Aceste rezultate sunt în concordanță cu rezultatele obținute din spectrele FTIR.

Odată ce sunt create premisele degradării termice a unui material polimeric, acesta suferă pierderi de masă care pot fi puse pe seama diferitelor mecanisme de degradare ce au loc la temperaturi diferite sau simultan în material, mecanisme care sunt specifice unor reacții chimice inverse celor care au determinat formarea legăturilor chimice [152]:

- scindări în lanțul principal (depolimerizare);
- scindări ale grupelor laterale;
- ciclizări;
- reticulări.

O evaluare corectă se poate face abordând procesul de degradare termică din punctul de vedere al cineticii sale care, fiind în speță un proces cinetic, poate fi modelat cu ajutorul ecuației lui Arrhenius. Utilizând acest model se pot determina parametrii specifici ai procesului de degradare termică precum ordinul de reacție  $n$  (pe baza căruia se pot obține informații privind mecanismul de degradare) și energia de activare a procesului de descompunere termică  $E_a$ . Astfel, datele au fost prelucrate pe baza diferitelor modele. Aplicarea metodei Freeman-Carroll (ecuația 22), este folosită la determinarea caracteristicilor cinetice prezentate în tabelul 7.

152. Mark J.E., Eisenberg A., Physical Properties of Polymers, Sec.Ed., American Chemical Society (1993).

$$\frac{\Delta \ln \frac{d\alpha}{dT}}{\Delta \ln(1-\alpha)} = n - \frac{Ea}{R} \times \frac{\Delta \left( \frac{1}{T} \right)}{\Delta \ln(1-\alpha)} \quad (22)$$

unde: Ea este energia de activare

$\alpha$  este gradul de conversie

T este temperatura

n este ordinul de reacție

R reprezintă constanta universală a gazelor.

Trasând graficul dependenței  $\Delta \ln(d\alpha/dT)/\Delta \ln(1-\alpha)$  funcție de  $\Delta(1/T)/\Delta \ln(1-\alpha)$  din panta drepte se poate calcula energia de activare Ea și din interceptul la origine se obține ordinul de reacție n. Factorul preexponențial se calculează în baza ecuației 23:

$$\frac{d\alpha}{dT} = \frac{1}{\beta} A \exp\left(-\frac{Ea}{RT}\right) f(\alpha) \quad (23)$$

în care  $\beta$  este  $dT/dt$  reprezintă viteza de încălzire. Gradul de deconversie se calculează cu relația 24, în care  $m_i$  este masa inițială a probei,  $m(t)$  este masa probei la un moment oarecare t și  $m_f$  este masa finală.

$$\alpha = \frac{m_i - m(t)}{m_i - m_f} \quad (24)$$

Tabelul 7. Valorile energiei de activare

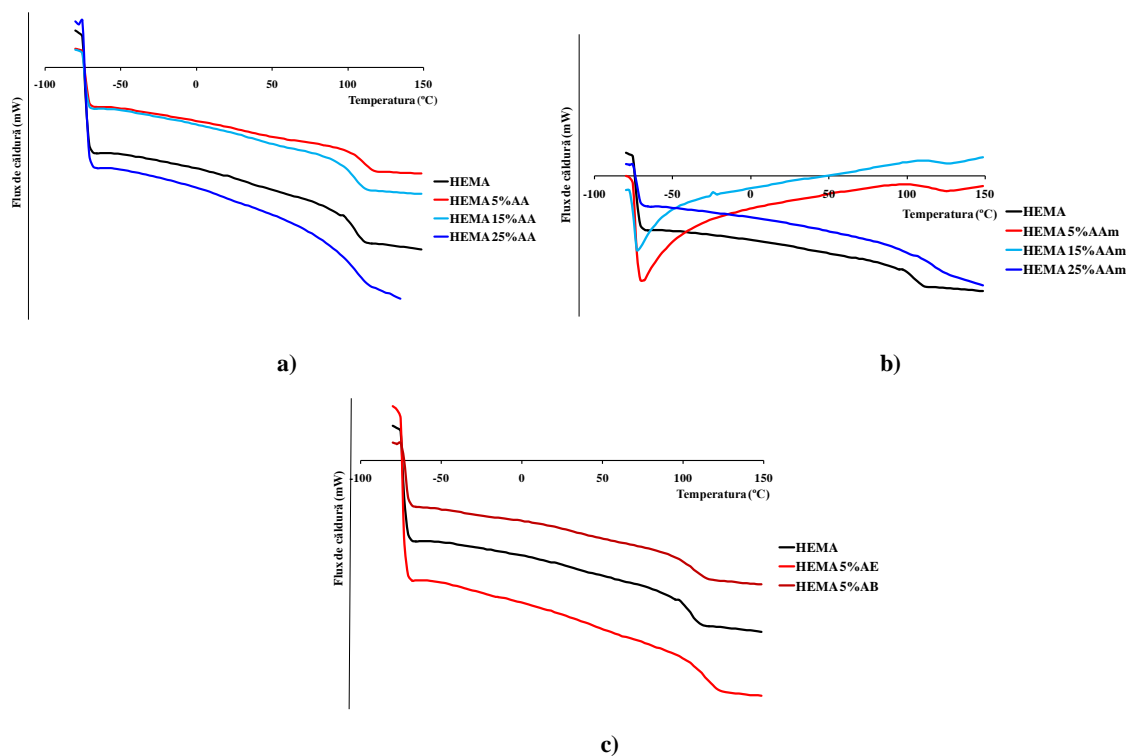
PROBA	Ea (kJ/mol)	n
HEMA	144±0,77	0,44±4,41e-03
HEMA 5% AA	137±1,72	0,60±24,70e-03
HEMA 15% AA	252±1,19	1,06±1,09e-03
HEMA 25% AA	304±2,69	1,24±15,33e-03
HEMA 5% AAm	134±2,05	0,47±12,66e-03
HEMA 15% AAm	113±2,30	1,06±7,5e-03
HEMA 25% AAm	240±1,42	0,36±13,16e-03
HEMA 5% AE	70±1,36	0,34±19,56e-03
HEMA 5% AB	88±22,6	0,55±22,6e-03

Energia de activare în general crește odată cu creșterea procentului de comonomer adăugat, sugerând o îmbunătățire a stabilității termice a hidrogelurilor. Valoarea mică a

ordinului de reacție sugerează faptul că la descompunerea termică a hidrogelurilor, procesele fizice de transport sunt mai importante decât cele chimice.

### III.2.2.1.2. Analize de calorimetrie diferențială-DSC

Stările de tranziție relevă condițiile în care se modifică structura fizică și chimică a polimerului, cu consecințe asupra proprietăților fizico-mecanice și a performanțelor acestuia [153]. Din măsurătorile DSC au fost determinate temperaturile de tranziție sticloasă ( $T_g$ ).  $T_g$  reprezintă temperatura la care matricea polimerului trece de la starea vitroasă la cea de elastică asemănătoare cu cea din cauciuc. Pentru a putea obține valoarea  $T_g$ , proba trebuie încălzită, de aceea  $T_g$  apare în termogramele DSC ca o etapă de tranziție și nu ca un pic (Figura 66). Hidrogelurile cu valoarea  $T_g$  mare au și o stabilitate termică în timp și la temperaturi ridicate (Tabelul 8).



**Figura 66. Curbele DSC pentru:**  
**a) hidrogeluri pe bază de HEMA și AA**  
**b) hidrogeluri pe bază de HEMA și AAm**  
**c) hidrogeluri pe bază de HEMA și AE, AB**

153. Freeman E.S., Carroll B., *The application of thermoanalytical techniques to reaction kinetics. The thermogravimetric evaluation of the kinetics of the decomposition of calcium oxalate monohydrate*, Journal of Physical Chemistry (1958), 62: 394.

Tabelul 8. Valorile temperaturilor de tranziție

PROBA	T <sub>g</sub> (°C)
HEMA	96
HEMA 5% AA	111
HEMA 15% AA	107
HEMA 25% AA	104
HEMA 5% AAm	120
HEMA 15% AAm	121
HEMA 25% AAm	106
HEMA 5% AE	113
HEMA 5% AB	110

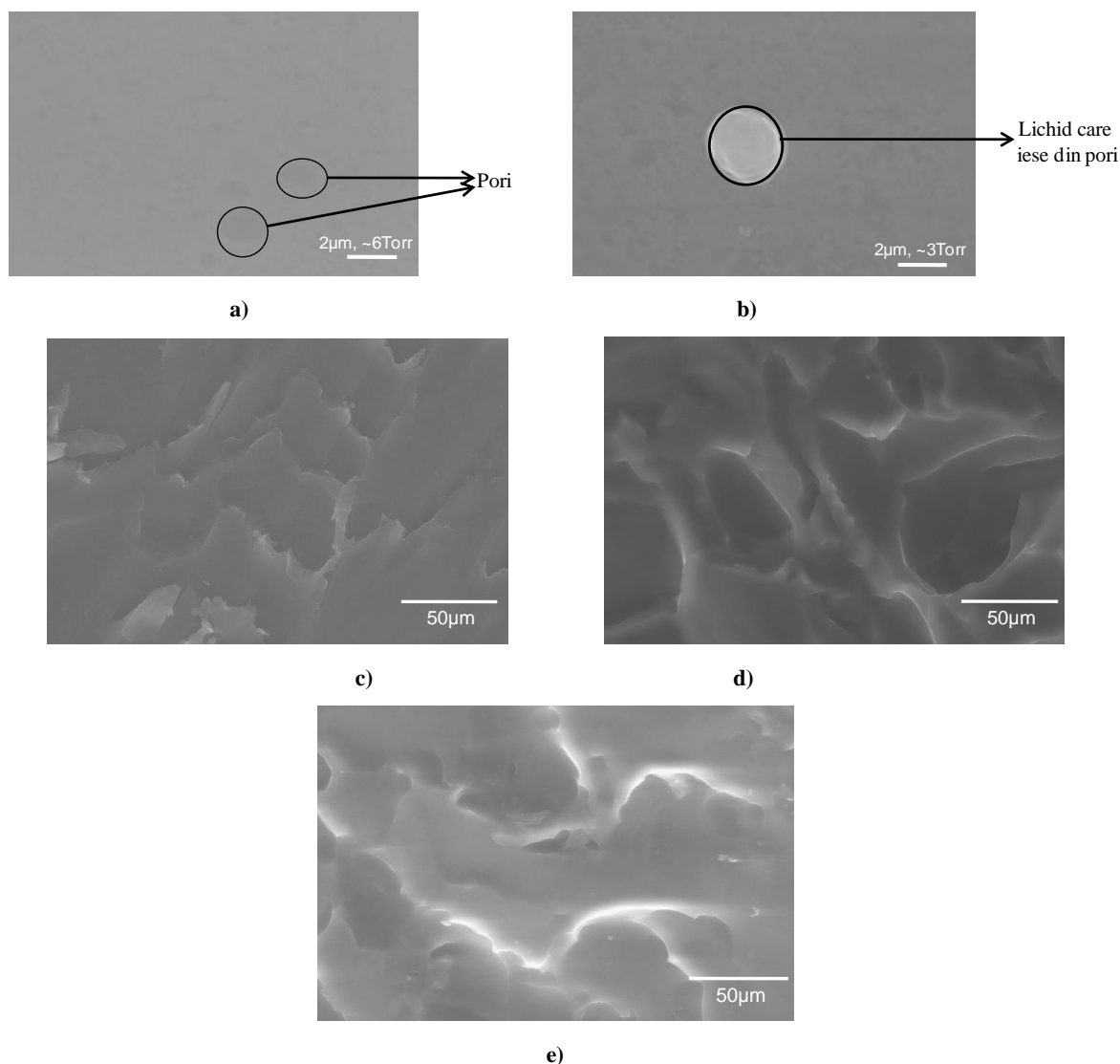
Valoarea T<sub>g</sub> a crescut cu adăugarea de comonomer, ceea ce ne confirmă îmbunătățirea proprietăților termice odată cu creșterea cantității de monomer hidrofil sau hidrofob.

### III.3. Analiza morfologică a hidrogelurilor: ESEM, SEM

#### III.3.1. Analiza hidrogelurilor prin ESEM

ESEM este o tehnică avansată a SEM-ului pentru caracterizarea a hidrogelurilor. În timp ce tehnica SEM utilizează un vid înaintat pentru prevenirea interferenței aerului cu electronii secundari, ESEM-ul poate fi realizat într-un vid înaintat (până la o presiune de 10 Torr). Avantajul major al acestei tehnici constă în faptul că probele nu suferă alte tipuri de tratamente (acoperiri, deshidratare), iar atmosfera controlată va menține structura stabilă hidratată a hidrogelurilor. Pentru a asigura o rezoluție adecvată a micrografiilor, presiunea a variat între 2-5 Torr, la o tensiune de accelerare de 30kV. Hidrogelurile au fost menținute la o temperatură de 5°C folosind un platan de răcire: această procedură a asigurat un mediu hidratat, prevenind astfel deshidratarea hidrogelurilor.

Cu ajutorul ESEM s-a putut examina suprafața și secțiunea transversală a hidrogelurilor sintetizate. Un exemplu tipic de micrografie ESEM în suprafață și în secțiune transversală pentru hidrogelul HEMA și cele sintetizate cu AA este prezentat în figura 67.



**Figura 67. Micrografiile ESEM ale suprafețelor și secțiunilor transversale ale hidrogelurilor:**

- a) suprafața hidrogel la ~6Torr**
- b) suprafața hidrogel la ~3Torr**
- c) secțiune transversală hidrogel HEMA**
- d) secțiune transversală hidrogeluri HEMA 5%AA**
- e) secțiune transversală hidrogel HEMA 25%AA**

Din micrografiile ESEM de suprafață se poate observa o structură microporoasă, cu pori de diametrul  $\sim 2\mu\text{m}$ . Cu toate că rezoluția nu este foarte bună la o presiune de  $\sim 3$  Torr, atunci când presiunea crește ( $\sim 6$  Torr) se poate observa cum lichidul iese din acești pori, putând astfel concluziona, ca avem de-a face cu o structură microporoasă. Acest fapt se datorează matriței în care a fost realizată polimerizarea, și ne va ușura interpretarea testelor mecanice (capitolul V.2).

Din micrografiile ESEM în secțiune transversală se poate observa că prin copolimerizare se obține o structură poroasă mai bine definită față de hidrogelul HEMA.

Prezența comonomerului determină formarea unei structuri mai laxe, cu pori sferici, fără zone de compacte. Distribuția porilor este relativ omogenă în secțiune, porii având dimensiuni situate în jurul valorii de  $50\mu\text{m}$ .

### III.3.2. Analiza hidrogelurilor prin SEM

Cu ajutorul SEM s-a putut evidenția morfologia suprafeței hidrogelurilor în stare uscată. În figura 68 este prezentată microfotografia hidrogelurilor sintetizate cu conținut diferit de AA. Se poate observa o structură în care porii sunt închiși.

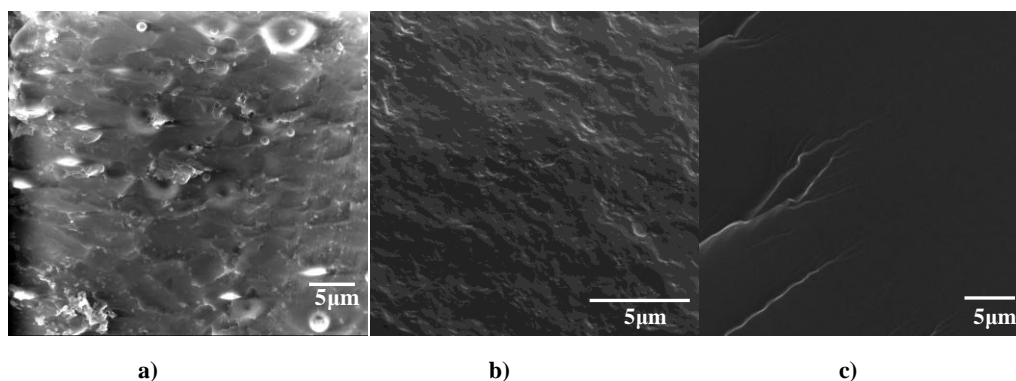


Figura 68. Micrografie SEM a suprafeței hidrogelurilor

- a) HEMA
- b) HEMA 5%AA
- c) HEMA 25%AA

Hidrogelurile sunt sensibile la bombardarea cu electroni, de aceea, imaginea hidrogelului HEMA are artefacte cauzate de fasciculul de electroni. Însă cu toate acestea se poate observa că, prin adăugarea de comonomer AA morfologia structurii hidrogelurilor a devenit mai netedă.

## III.4. Umflarea în soluții cu caracteristici similare cu lichidele biologice

Proprietatea cea mai importantă a hidrogelurilor este aceea ca se umflă în prezența apei sau a lichidelor similare cu cele din organism, și se contractă în lipsa acestora. Gradul de umflare este determinat de natura lanțului polimeric și de densitatea de reticulare.

Conținutul ridicat în apă determină proprietățile mecanice, de difuzie și adsorbție ale hidrogelurilor, conferindu-le capacitatea de a simula țesuturile vii, în special endoteliul

vaselor sanguine. În plus, permite mărirea fracțiunii de biomolecule legate la suprafața, controlând interacțiunile hidrogel - biopolimeri.

Gradul de umflare al hidrogelurilor este influențat, în principal, de compoziția chimică a acestora. Hidrogelurile cu un conținut mai mare de grupe hidrofile vor avea un grad de umflare mult mai mare decât cele care conțin mai multe grupări hidrofobe.

Fizico-chimia umflării [154] are următoarele etape (Figura 69):

1. ionizarea grupărilor carboxil, cu eliberarea de  $H^+$ ;
2.  $H^+$  se recombina cu  $OH^-$  formând apa;
3. sarcina este compensată prin difuzia cationilor ( $Na^+$ ) și a  $OH^-$  în hidrogel;
4. fluxul de noi ioni generează o presiune osmotică care duce la umflarea hidrogelului.

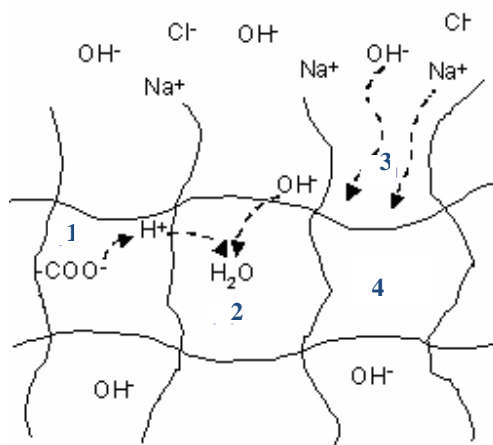


Figura 69. Etapele umflării unui hidrogel ionic

Datorită prezenței grupării carboxil, hidrogelurile pe bază de p(HEMA) manifestă o sensibilitate crescută la variații de pH.

Pentru a caracteriza gradul de umflare al hidrogelurilor, testele de umflare au fost realizate la diferite valori de pH de la 3,6 la 9. Soluțiile tampon cu diferite valori de pH au fost preparate prin amestecul de diferite cantități de TRIS cu acid clorhidric și apă pură. Clorura de sodiu a fost adăugată pentru a stabili o tărie ionică de 0,5M, care este tăria ionică în condiții fiziologice.

Hidrogelurile au fost uscate și imersate în soluțiile tampon și termostatate în baie de apă, la temperatura de 37°C. Hidrogelurile au fost scoase la timpi diferiți, prestabiliți, excesul de soluție a fost îndepărtat ușor cu ajutorul unei hârtii de filtru, și cântărite.

Comportamentul la umflare al hidrogelurilor în diferite pH-uri este prezentat în figurile 70-72.

154. De S. K. et al., *Equilibrium swelling and kinetics of pH-responsive hydrogels: Models, experiments, and simulations*, Journal of Microelectromechanical Systems (2002), 11: 544-555.

Hidrogelurile se umflă în toate condițiile de pH testate datorită absorbției apei în structura poroasă. Disocierea legăturilor de hidrogen, combinată cu forțele de repulsie electrostatice fac ca rețeaua de hidrogel să se umfle. p(HEMA) este un hidrogel neutru, cu puține grupări ionizabile pe catenele secundare, de aceea gradul de umflare este foarte mic indiferent de pH.

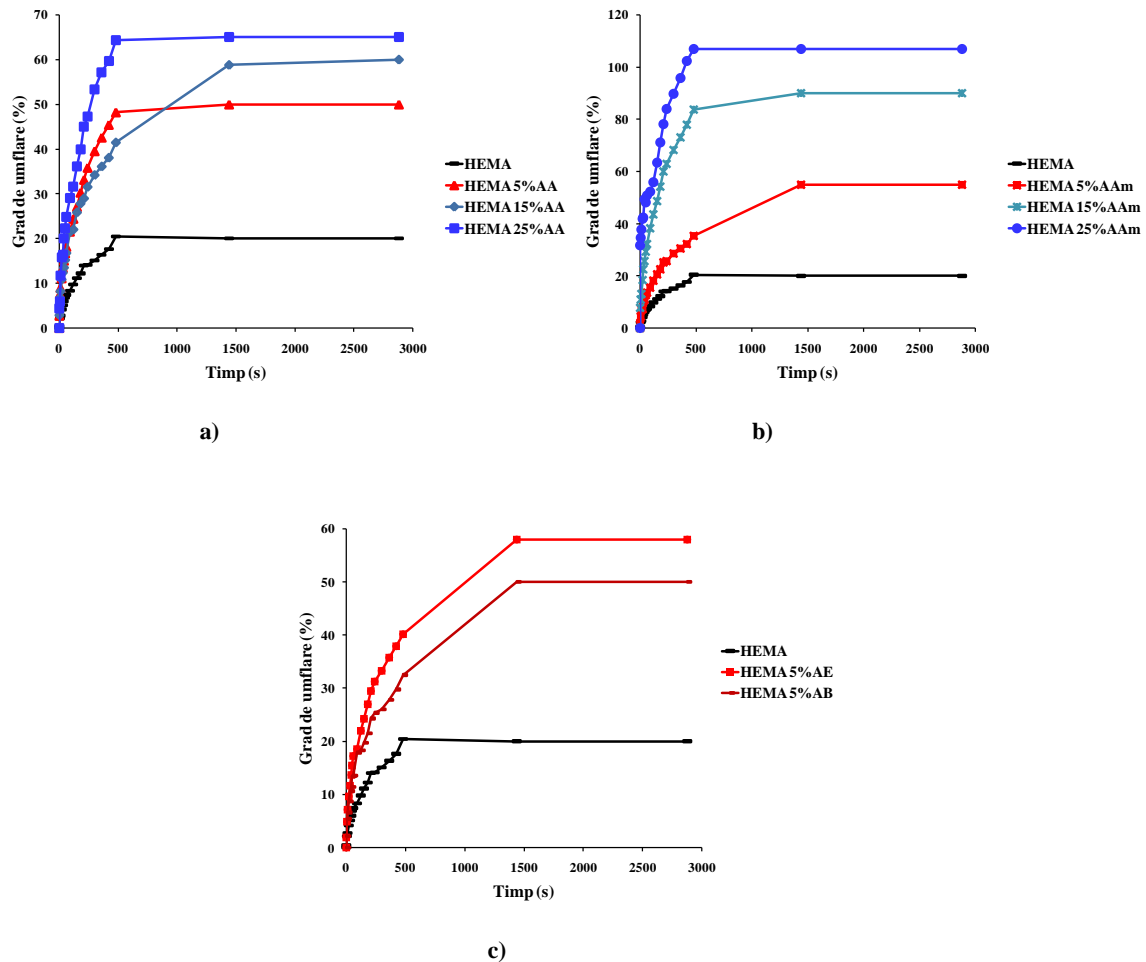


Figura 70. Cinetica de umflare a hidrogelurilor sintetizate, în mediu de pH 3,6:

- a) hidrogeluri pe bază de HEMA și AA;
- b) hidrogeluri pe bază de HEMA și Aam;
- c) hidrogeluri pe bază de HEMA și AE, AB.



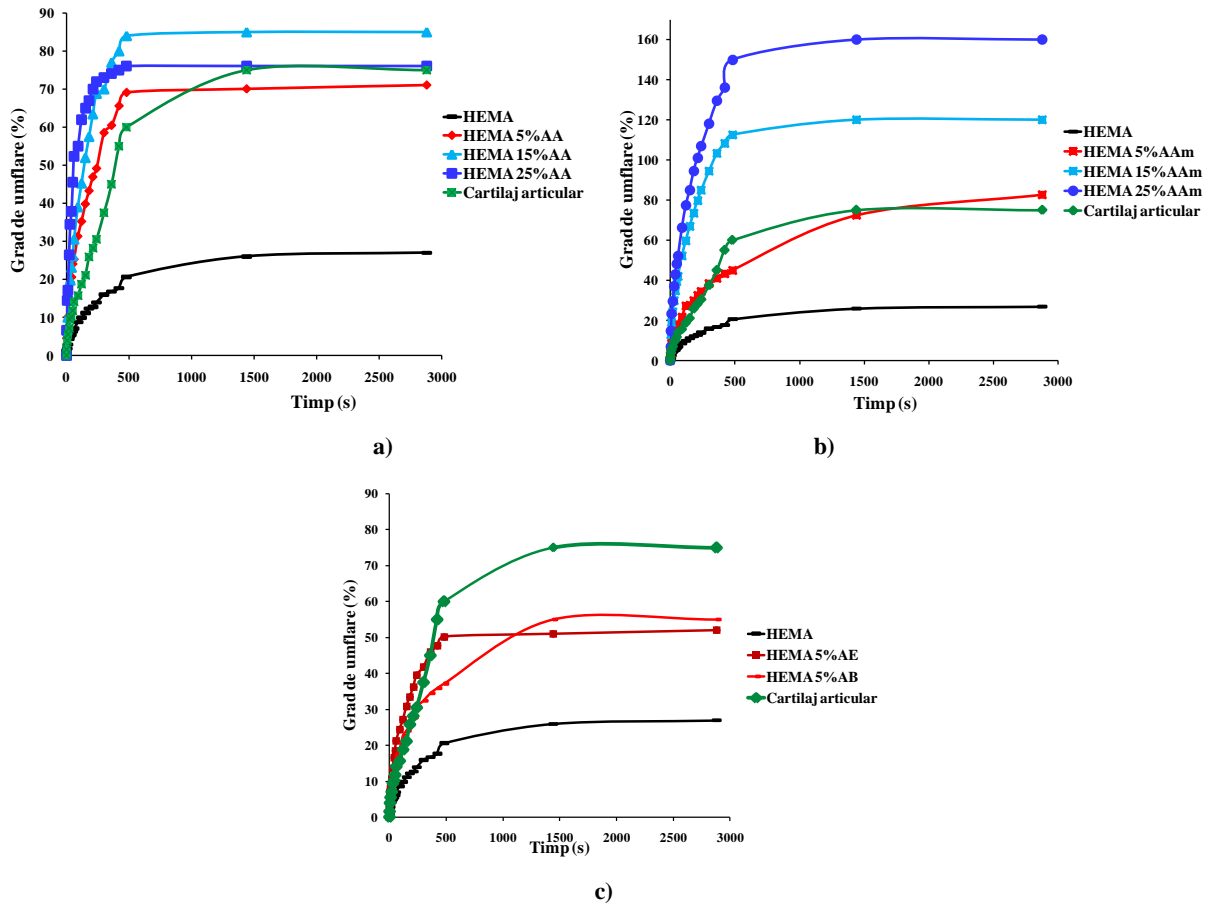
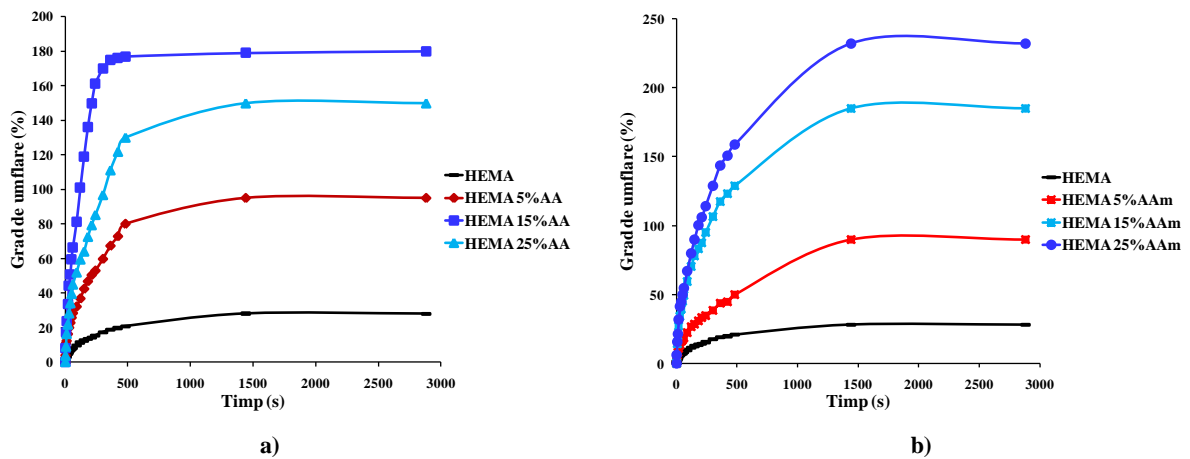
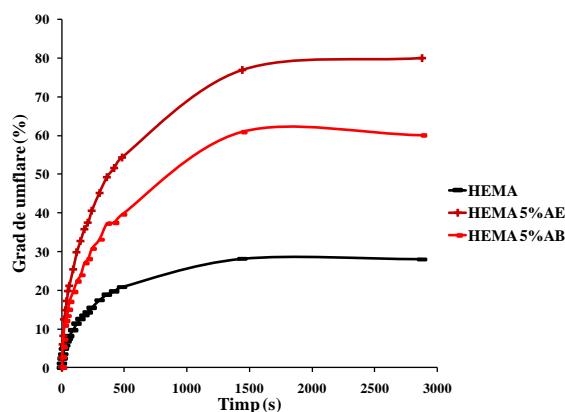


Figura 71. Cinetica de umflare a hidrogelurilor sintetizate în mediu de pH7:

- a) hidrogeluri pe bază de HEMA și AA;
- b) hidrogeluri pe bază de HEMA și AAm;
- c) hidrogeluri pe bază de HEMA și AE, AB.





c)

**Figura 72. Cinetica de umflare a hidrogelurilor sintetizate în mediu de pH9:**

**a) hidrogeluri pe bază de HEMA și AA;**

**b) hidrogeluri pe bază de HEMA și AAm;**

**c) hidrogeluri pe bază de HEMA și AE, AB.**

În cazul conținutului de grupe carboxilice din copolimeri, gradul de umflare al hidrogelurilor crește cu creșterea pH-ului mediului, datorită repulsiilor electrostatice dintre formele ionizate ale grupelor carboxilice.

Diferențele în gradul de umflare pot fi explicate pe seama pH-ului: în mediu acid grupările  $-COOH$  ale copolimerilor sunt nedisociate iar în mediu bazic sunt disociate. [155].

În stare disociată, au loc repulsiile electrostatice între grupele carboxilice anionice, determinând distanțarea acestora și creșterea volumului ocupat de moleculele de apă, fenomenul conduce la un grad de umflare mai mare.

În cazul aplicațiilor lor ca substitut de cartilaj articular, pH-ul este 7. Se observă o creștere a gradului de umflare odată cu creșterea procentului de comonomer.

În cazul monomerilor hidrofobi AE și AB, datorită hidrofobicității lor, se poate observa o scădere a gradului de umflare.

Se observă, de asemenea, că hidrogelurile pHEMA 5%AA, pHEMA 15%AA și pHEMA 5%AAM au un comportament asemănător cu cel al cartilajului articular, în procesul de umflare.

În concluzie, protocolul experimental folosit ne-a permis îmbunătățirea și controlarea hidrofiliilor hidrogelurilor pHEMA astfel încât ele să aibă un comportament hidrofilic asemănător cu cel al cartilajului articular.

155 Kurkuri M.D., Aminabhavi T.M., *Poly(vinyl alcohol) and poly(acrylic acid) sequential interpenetrating network pH-sensitive microspheres for the delivery of diclofenac sodium to the intestine*, Journal of Controlled Release (2004), 96: 9-20.

### III.5. Determinarea tensiunii superficiale

Capacitatea de umezire/hidrofilia poate fi evaluată atunci când o picătură de lichid vine în contact cu o suprafață solidă. Gradul de umezire este determinat de forțele de coeziune dintre moleculele de lichid și forțele de adeziune care rezultă din interacțiunile moleculare dintre lichid și solid (Figura 73). Gradul de umezire este măsurat cu ajutorul unghiului de contact.

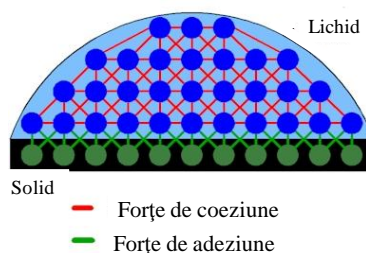


Figura 73. Forțele care intervin în măsurarea unghiului de contact

Cu scăderea unghiului de contact, gradul de umezire crește. Astfel, atunci când unghiul de contact atinge valoare de  $180^\circ$ , gradul de umezire este minim. Gradul de umezire poate fi explicat prin forțele de coeziune și cele de adeziune. O forță de adeziune mare în care coeziunea e mică va da unghiuri de contact foarte mici. Din momentul în care interacțiunile dintre solid și lichid se diminuează, iar forța de coeziune crește, gradul de umezire scade iar unghiul de contact crește.

Lucrul mecanic de adeziune ( $W_a$ ) se poate calcula cu ajutorul relației Young-Dupree (relația 25):

$$W_a = \gamma(1 + \cos\theta) \quad (25)$$

unde:  $\gamma$  este tensiunea superficială;

$\theta$  este unghiul de contact.

Valorile lucrului mecanic de adeziune obținut în diferite medii pentru hidrogelurile de compoziție diferită, sunt prezentate în figura 74.

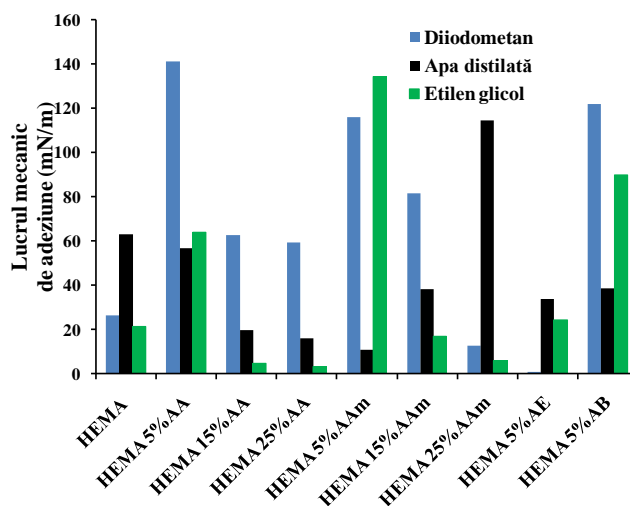


Figura 74. Valorile lucrului mecanic de adeziune

Lucrul mecanic de coeziune este definit ca forța necesară pentru a separa lichidul în mai multe părți, iar pentru calcul se folosește formula 26:

$$W_c = 2\gamma \quad (26)$$

Valorile obținute pentru hidrogelurile sintetizate sunt trecute în tabelul 9.

Tabelul 9. Valorile lucrului mecanic de coeziune pentru hidrogelurile sintetizate

Proba	Lucrul mecanic de coeziune (mN/m)
HEMA	70
HEMA 5% AA	144
HEMA 15% AA	86
HEMA 25% AA	78
HEMA 5% AAm	138
HEMA 15% AAm	130
HEMA 25% AAm	46
HEMA 5% AE	34
HEMA 5% AB	132

Deci unghiul de contact este invers proporțional cu gradul de umectare (Figura 75).

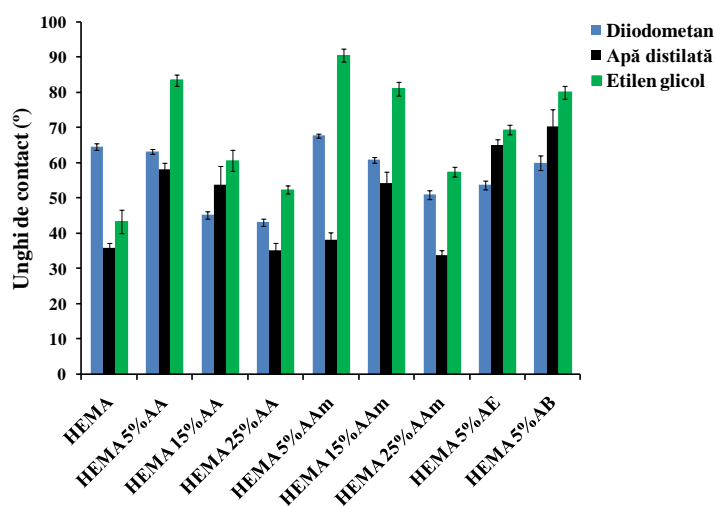


Figura 75. Valorile unghiului de contact pentru diferite lichide utilizate

Din valorile de unghi de contact s-a calculat tensiunea superficială pentru hidrogelurile sintetizate, prezentate în tabelul 10.

Tabelul 10. Valorile tensiunii superficiale

Proba	Tensiunea superficială (mN/m)
HEMA	35
HEMA 5% AA	72
HEMA 15% AA	43
HEMA 25% AA	39
HEMA 5% AAm	69
HEMA 15% AAm	65
HEMA 25% AAm	23
HEMA 5% AE	17
HEMA 5% AB	66

Tensiunea superficială este determinată de prezența legăturilor de hidrogen [156]. Astfel, adăugarea de comonomer duce la creșterea valorii tensiunii superficiale, deci este necesară o energie din ce în ce mai mare pentru a rupe legăturile din hidrogel.

Valorile unghiului dinamic, ne dă relații cu privire la textura suprafeței testate, dacă este omogenă sau neomogă. O suprafață omogenă este atunci când lichidul va umple toate

156. Schrader M.E., Loeb G.I., *Modern Approaches to Wettability. Theory and Applications*, New York: Plenum Press. (1992), ISBN 0306439859.

rugozitățile de suprafață, deci va avea un histerezis mare [157]. Valorile obținute pentru hidrogelurile testate sunt prezentate în figura 76.

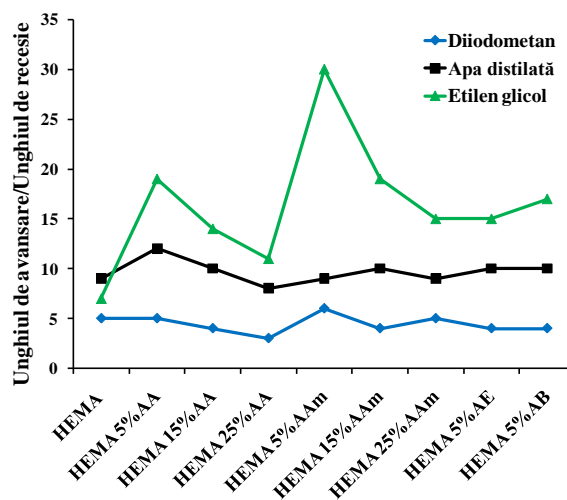


Figura 76. Valorile histerezisului obținut la măsurarea unghiului dinamic

Putem observa că valorile histerezisului scad cu adăugarea de comonomer, deci, va crește omogenitatea de suprafață a hidrogelurilor sintetizate.

## III.6. CONCLUZII

1. S-au sintetizat hidrogeluri pe bază de p(HEMA) și comonomeri cu caracter puternic hidrofîl (AA, AAm) sau hidrofob (AE, AB), în prezența unui monomer bifuncțional cu rol de reticulant (TEGDA), în scopul utilizării lor în ingineria tisulară a cartilajului.

Sinteza hidrogelurilor a fost realizată conform unui protocol care a luat în considerare folosirea unui reticulant propice pentru a obține hidrogeluri cu hidrofilie controlată, iar complexul redox de inițiere folosit, netoxic, a facilitat polimerizarea, la temperatura camerei. Astfel, protocolul stabilit este simplu și reproductibil.

2. Din analiza datelor de spectroscopie în infraroșu (spectrele FTIR) rezultă faptul că reacția de polimerizare s-a produs între componentele considerate pentru sinteză. Odată cu creșterea procentului de comonomer, se poate observa o creștere a intensității benzii –OH (~3440 cm<sup>-1</sup>), benzii corespunzătoare legăturii C este O (~1640 cm<sup>-1</sup>) și a benzii caracteristice grupării metil, ceea ce confirmă faptul că procesul de copolimerizare a avut loc.

3. Din datele TG obținute se poate observa că hidrogelurile sintetizate au o stabilitate termică mai mare decât ale hidrogelului HEMA, iar această stabilitate în general crește odată

157. Marmur A., *Wetting of Hydrophobic Rough Surfaces: To be heterogeneous or not to be*, Langmuir (2003), 19: 8343–8348.

cu creșterea procentului de comonomer folosit la sinteză, identificat de asemenea și în spectrele FTIR. Energia de activare în general crește odată cu creșterea procentului de copolimer adăugat, sugerând o îmbunătățire a stabilității termice a hidrogelurilor. Valoarea mică a ordinului de reacție sugerează faptul că la descompunerea termică, procesele fizice de transport sunt mai importante decât cele chimice. Din analiza DSC s-a putut calcula valoarea  $T_g$  a hidrogelurilor. Aceasta a crescut cu adăugarea de comonomer, ceea ce ne confirmă îmbunătățirea proprietăților termice odată cu creșterea cantității de comonomer.

4. Din micrografiile ESEM se poate observa că prin copolimerizare se obține o structură poroasă mai bine definită față de hidrogelul HEMA. Din micrografiile SEM se poate observa o structură mai netedă odată cu adăugarea de comonomer, însă, hidrogelurile sunt sensibile la fasciculul de electroni.

5. În toate cazurile, gradul de umflare al hidrogelurilor crește cu creșterea pH-ului mediului, datorită repulsiilor electrostatice dintre formele ionizate ale grupelor carboxilice. În cazul aplicațiilor lor ca substitut de cartilaj articular, pH-ul este 7. Se observă o creștere a gradului de umflare odată cu creșterea procentului de comonomer. În cazul monomerilor hidrofobi AE și AB, datorită hidrofobității lor, se poate observa o scădere a gradului de umflare. Se observă de asemenea că hidrogelurile HEMA 5%AA, HEMA 15%AA și HEMA 5%AAM au un comportament asemănător cu cel al cartilajului articular.

6. Adăugarea de comonomer a dus la creșterea valorii tensiunii superficiale, datorată legăturilor de hidrogel din hidrogel. Mărimea unghiului dinamic, dă informații cu privire la textura suprafeței testate, dacă este omogenă sau neomogenă. Valorile histerezisului au scăzut cu adăugarea de comonomer, deci, omogenitatea de suprafață a hidrogelurilor sintetizate descrește în acest sens.

# CAPITOLUL IV

## STUDII PRIVIND EVALUAREA BIOMECHANICĂ A HIDROGELURILOR

*"Lucrul cel mai important în ceea ce privește știința nu se referă atât la cum ajungi la noi fapte, ci, cum să descoperi că te gândești la ele."*

*William Henry Bragg (1862-1942)*

Cele mai importante cerințe pe care trebuie să le îndeplinească biomaterialele folosite în ingineria tisulară a cartilajului articular sunt legate de proprietățile mecanice. Prin modificarea raportului dintre comonomerii folosiți la sinteza hidrogelurilor este posibilă controlarea proprietăților mecanice.

Proprietățile mecanice depind de mai mulți factori printre care: compoziția, gradul de umflare și condițiile de mediu. Teoriile elasticității și vâscoelasticității sunt folosite pentru interpretarea comportamentului mecanic al hidrogelurilor. Aceste teorii au la bază teste care urmăresc evoluția în timp a hidrogelurilor în urma aplicării unui stimul.

Pentru obținerea unor date pertinente, condițiile de testere a hidrogelurilor sintetizate au fost realizate în condiții fiziologice similare cu cele ale cartilajului articular (mediu de hidratare, viteza de compresiune, viteza de forfecare).

### IV.1. Determinarea caracteristicilor mecanice la compresiune

**PRINCIPIU:** Cu ajutorul reometrului descris în capitolul II, au fost realizate testele de compresiune; reometrul permite înregistrarea deformației sub efectul unei forțe aplicate. În acest caz se va studia răspunsul la o compresiune uniaxială a hidrogelurilor. Geometria aleasă a fost plan/plan. Platanalele folosite au fost din oțel inoxidabil. Hidrogelurile cilindrice au fost comprimate cu o viteză de deformare constantă. Deformarea ( $\Delta h$ ) cu care este comprimată proba este cunoscută pentru că deformația ( $\epsilon$ ) impusă este cunoscută. Prin intermediul captorului de la nivelul platanului superior este măsurată forța normală ( $F$ ) exercitată de către eșantion ca răspuns la deformația aplicată, care depinde de proprietățile reologice ale materialului. Pentru interpretarea rezultatelor a fost trasată curba tensiune ( $\sigma$ ) în funcție de deformare ( $\epsilon$ ).



**PARAMETRII:**

- Deformarea ( $\varepsilon$ ): dacă  $h_0$  este grosimea inițială a eșantionului inițial, atunci deformarea  $\varepsilon$  este calculată cu ajutorul relației 23:

$$\varepsilon \text{ este } \Delta h/h_0 \quad (23)$$

- Tensiunea ( $\sigma$ ): Forța exercitată asupra eșantionului reprezentată de forța  $F$ , exprimată în Newton (N). Pentru a determina proprietățile de material, tensiunea este definită ca fiind:

$$\sigma \text{ este } F / S \quad (24)$$

unde  $S$  este suprafața asupra căreia se exercită forța  $F$ .

- Modulul de elasticitate aparent (modulul lui Young): dacă sunt considerate deformări exercitate asupra unui material, modulul de elasticitate aparent notat  $E^*$ , este calculat cu ajutorul formulei:

$$E \text{ este } \sigma / \varepsilon \text{ (legea lui Hooke)} \quad (25)$$

Un material al cărui modul  $E^*$  este ridicat, este considerat rigid.

**IV.1.1. Stabilirea parametrilor experimentali****PROTOCOLUL EXPERIMENTAL**

**PROBELE:** Hidrogeluri cu formă cilindrică, cu diametrul de 50mm, și o grosime de ~2mm, în stare hidratată în soluție tampon pH este 7. Pentru testarea cartilajului articular de pui au fost folosite eșantioane cu o grosime de 2mm și un diametru a părții bombate de 3 mm.

În cadrul experimentelor de compresiune pot apărea două situații [158]:

- Hidrogelul are o frecare considerabilă, care nu poate fi neglijabilă la peretele platanului. În acest caz, pentru a putea evalua răspunsul mecanic din volumul hidrogelului, se va încerca să se mărească această frecare și să se imobilizeze hidrogelul la peretele platanului (Figura 77a).
- Hidrogelul are o frecare neglijabilă ( $\sim 0$ ). În acest caz, răspunsul mecanic al hidrogelului are două componente: o parte de alunecare, și una de compresiune. Problemele care apar în acest caz, sunt legate de deformările

158. Margaron Y, **Bostan L.**, Exposito J.-Y., Malbouyres M., Trunfio-Sfarghiu A.-M., Berthier Y., Lethias C., *Tenascin-X increases the stiffness of collagen gels without affecting fibrillogenesis*, Biophysical Chemistry (2010), 147: 87–91.

mari favorizate de o alunecare maximă, care poate induce fisuri în zona externă a hidrogelului (Figura 77b).

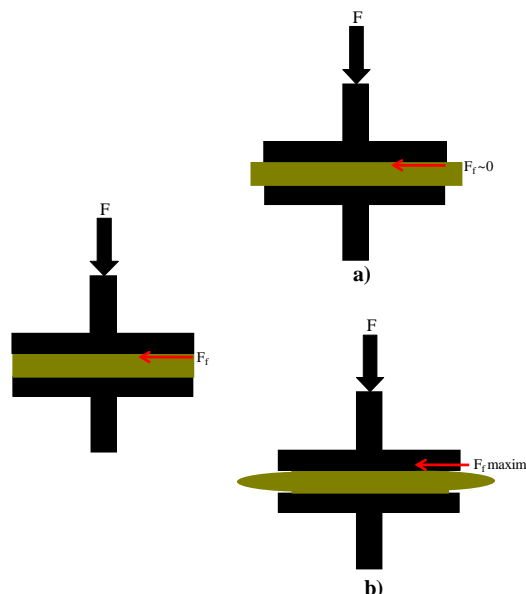


Figura 77. Condițiile limită la peretele platanelor reometrului:

a) alunecare maximă

b) aderență maximă

Pentru a preveni aceste probleme care apar la compresiunea unui hidrogel, s-a ales folosirea de hârtie abrazivă (cu granulație de  $\sim 180\mu\text{m}$ ) lipite pe cele două platane ale reometrului, obținându-se astfel o aderență maximă la perete. Pentru a preveni fisurarea hidrogelului, au fost realizate comprimări de 20% din grosimea probei, într-un singur pas sau 4 comprimări de câte 5%.

Fiecare compresiune a fost urmată de o perioadă de relaxare de 600s, timp necesar pentru relaxarea completă a hidrogelului.

**HIDRATAREA ȘI PRE-ÎNCĂRCAREA:** Pentru a fi în aceleași condiții fiziologice ca și cartilajul articular, toate testele de compresiune au fost realizate în mediu hidratat, folosindu-se ca mediu de hidratare soluție tampon pH 7. Cu toate că platanele nu sunt propice pentru a realiza teste în mediu hidratat, a fost improvizat un platan astfel încât să permită efectuarea testelor în mediu hidratat, prin lipirea unui 'manșon' din plastic (Figura 78a).

Pentru uniformizarea rugozităților de suprafață, pentru fiecare test de compresiune, o pre-încărcare de 0,02N a fost exercitată asupra fiecărui hidrogel înainte de măsurători (ceea ce corespunde lui  $h_i$ , față de  $h_0$  care reprezintă grosimea inițială (Figura 78b)).

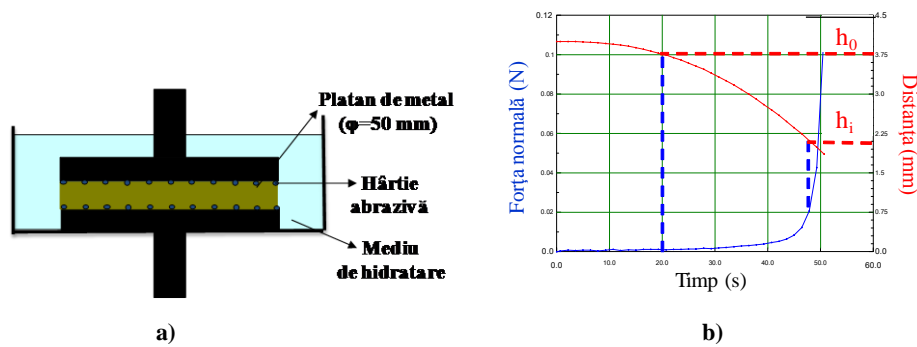


Figura 78. a) Dispozitivul final de testare în compresie  
b) Pre-încărcarea înainte de compresie

**CALCULUL SUPRAFEȚEI DE CONTACT (S):** Aria de contact în cazul hidrogelurilor a fost considerată constantă, hidrogelurile având un diametru egal cu cel al platanelor, iar cu ajutorul hârtiei abrazive au aderat puternic la peretele platanelor. În cazul cartilajului articular, măsurarea suprafeței de contact a fost realizată prin comprimarea suprafeței cartilajului cu o lamă de sticlă (care asigură o pre-încărcare de 0,02N), iar cu ajutorul unui microscop optic s-a putut calcula aria de contact.

**PROTOCOLUL DE COMPRESIUNE/RELAXARE:** După pre-încărcare, au fost aplicate deformări într-un singur pas (~20%), sau în 4 pași, compresii de 5% fiecare. Compresiunea a fost urmată de o perioadă de relaxare până la echilibru (600 s). Viteza de compresie a fost aleasă constantă de 0,02 mm/s; această viteză este aleasă conform datelor bibliografice astfel încât să fie încadrată în intervalul de valori fiziologice ale solicitărilor cartilajului articular [159]. Acest protocol a fost ales pentru a determina caracteristicile de elasticitate ale hidrogelurilor sintetizate, în comparație cu cel al cartilajului articular.

**INTERPRETAREA STATISTICĂ:** Fiecare test a fost repetat de trei ori, și cu ajutorul programului de statistică Student t (Kelida Graph) a fost determinată deviația standard, ca indicator statistic al gradului în care o valoare individuală dintr-o distribuție de valori, tinde să varieze față de media distribuției.

## IV.1.2. Rezultate și discuții

Testele reologice au fost realizate pe hidrogelurile sintetizate și pe cartilajul articular de pui. Graficul forței normale în funcție de timp ne permite să comparăm testele de comprimare realizate într-un singur pas de 20% sau în 4 pași de 5% fiecare (Figura 79).

159. Hayes W.C., Keer L.M., Herrmann G., Mockros L.F., *A mathematical analysis for indentation tests of articular cartilage*, *Journal of Biomechanics* (1972), 5(5): 541-551.

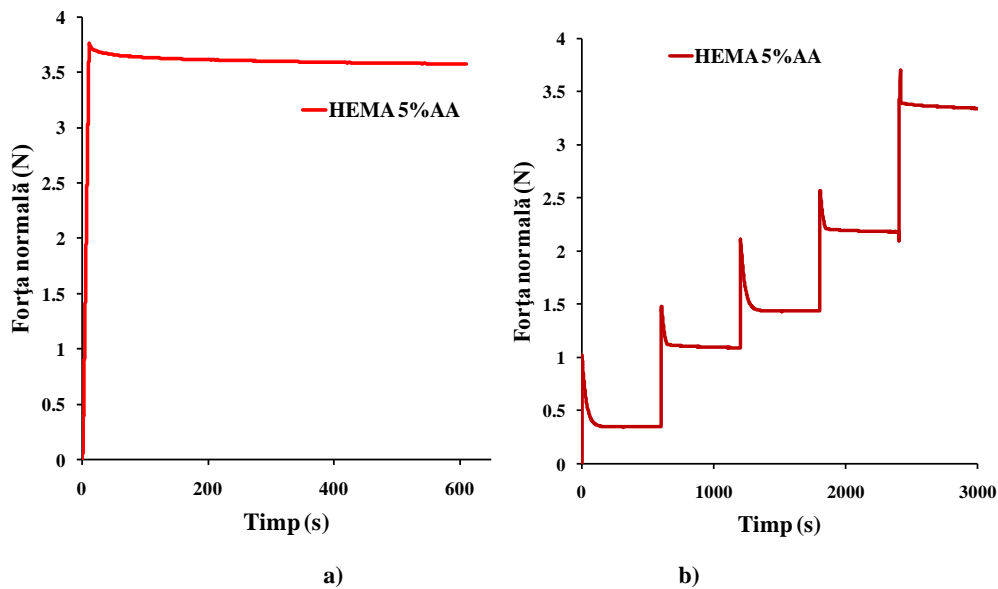
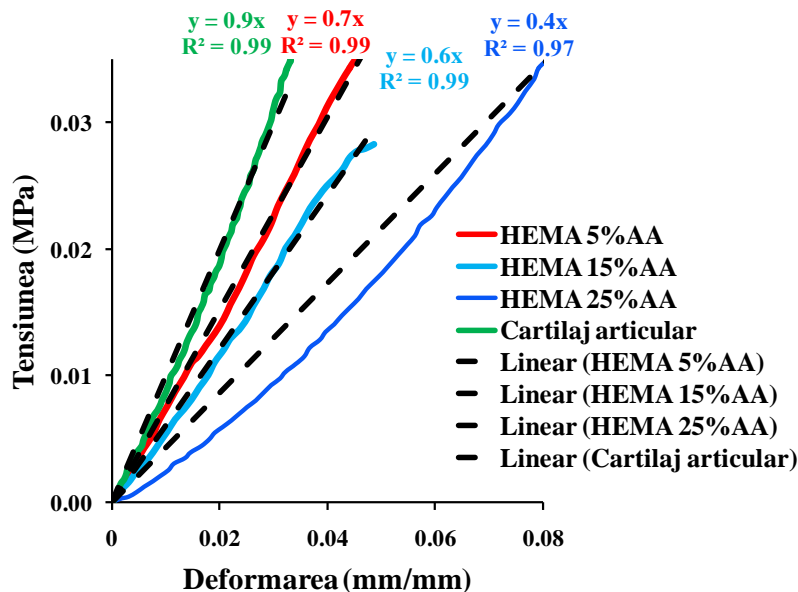


Figura 79. Curbe de compresiune de 20% față de grosimea hidrogelului:

- a) compresiune în 5 pași de 4% fiecare din grosimea hidrogelului;
- b) compresiune într-un singur pas de 20% din grosimea hidrogelului.

Din figura 77 se poate observa că avem același răspuns la comprimare fie că este în 5 pași sau un singur pas. Acest rezultat confirmă faptul că avem o reproductibilitate a rezultatelor referitoare la proprietățile de material, obținându-se același răspuns, indiferent de modul de aplicare a solicitării.

Pentru a cuantifica comportamentul la compresiune a hidrogelurilor în comparație cu cel al cartilajului articular, a fost calculat modulul elastic aparent,  $E^*$ . Conform legii lui Hooke,  $E^*$  este calculat din panta părții liniare a curbei tensiune ( $\sigma$  este  $F/S$ ) în funcție de deformare ( $\epsilon$ ). În cazul compresiunilor în 5 pași, s-a luat în considerare cele 5 picuri maxime de compresiune, în timp ce pentru compresiunea într-un singur pas, s-au luat în considerare toate valorile presiunilor corespunzătoare părții de compresiune a curbei (Figura 80).



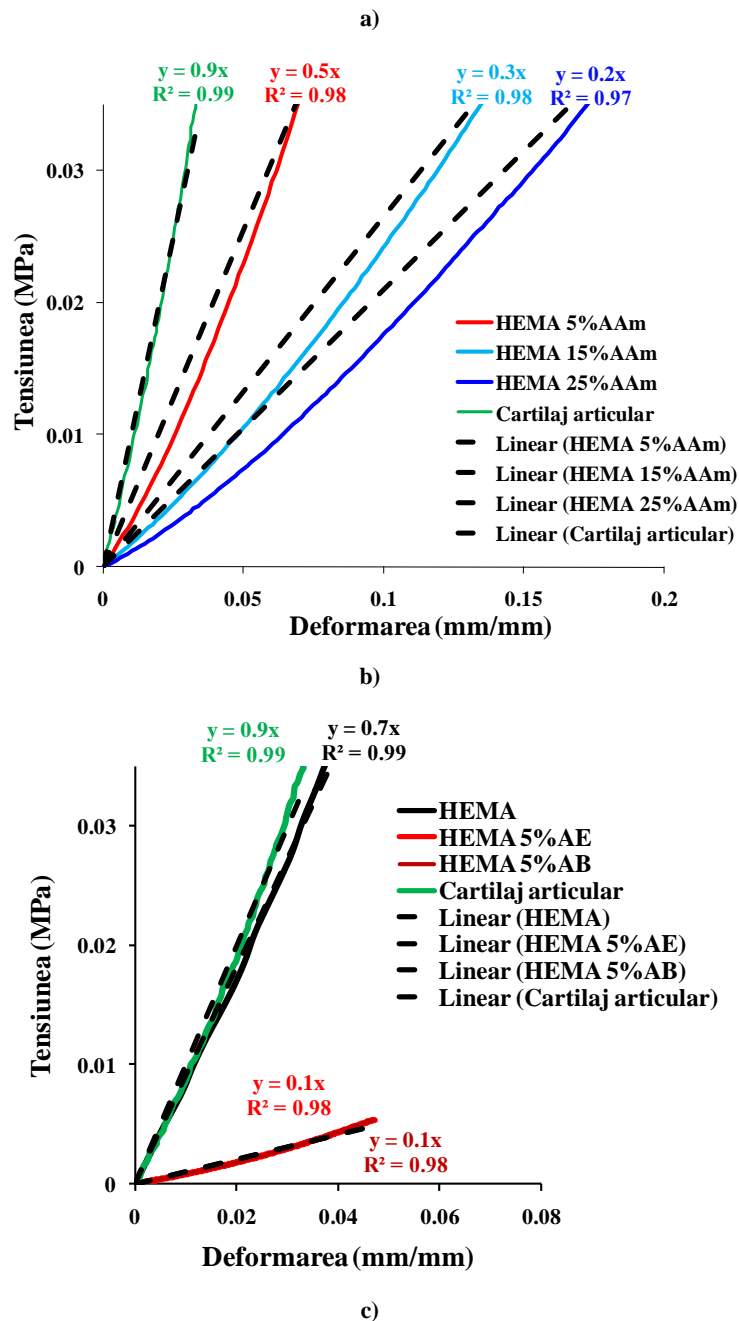


Figura 80. Curbele de compresie pentru hidrogelurile sintetizate în comparație cu cartilajul articular, cu linia de regresie corespunzătoare:

- a) hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AA
- b) hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AAm
- c) hidrogel HEMA, hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomeri AE, AB

Se poate observa că răspunsul fiecărui hidrogel la compresie este diferit în funcție de comonomerul folosit. Amplitudinea picurilor de compresie, deci răspunsul imediat la compresie, al hidrogelurilor cu HEMA, HEMA 5%AA este asemănător cu cel al cartilajului articular. Odată cu creșterea conținutului de comonomer, flexibilitatea lanțurilor polimerice crește, astfel încât, elasticitatea hidrogelurilor va crește cu creșterea procentului de comonomer adăugat. Astfel, modulul de elasticitate va scădea cu adăugarea de comonomer.

Rezultatele obținute sunt prezentate în tabelul 11.

Tabelul 11. Valorile modului de elasticitate apparent,  $E^*$  pentru hidrogelurile sintetizate și cartilajul articular

Proba	$E^*$ (MPa)
<b>HEMA</b>	<b><math>0,7 \pm 0,02</math></b>
<b>HEMA 5%AA</b>	<b><math>0,7 \pm 0,03</math></b>
<b>HEMA 15%AA</b>	<b><math>0,6 \pm 0,01</math></b>
<b>HEMA 25%AA</b>	<b><math>0,4 \pm 0,03</math></b>
HEMA 5%AAm	$0,5 \pm 0,02$
HEMA 15%AAm	$0,3 \pm 0,01$
HEMA 25%AAm	$0,2 \pm 0,03$
HEMA 5%AE	$0,1 \pm 0,01$
HEMA 5%AB	$0,1 \pm 0,04$
<b>Cartilaj articular</b>	<b><math>0,9 \pm 0,05</math></b>

Se poate observa că hidrogelurile HEMA și cele cu comonomerul AA au un comportament asemănător cu cel al cartilajului articular.

### Influența mediului de hidratare

Hidrogelurile pe bază de HEMA sunt hidrogeluri sensibile la variația pH-ului. De aceea, pentru a caracteriza comportamentul la compresiune, testele de comprimare au fost realizate atât la pH 3,6, pH 7 și 9 (Figura 81).

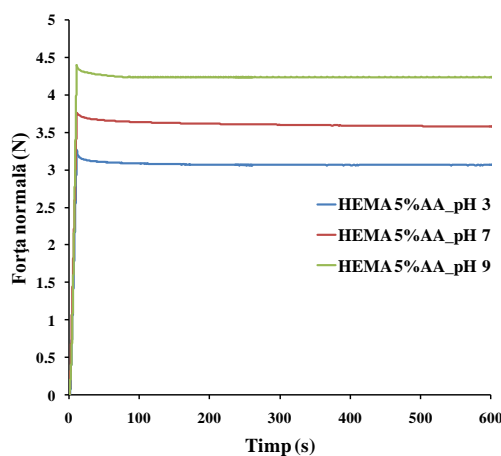


Figura 81. Teste de comprimare la diferite valori de pH

În figura 81 este prezentată o curbă tip a comportării hidrogelurilor la comprimare la diferite valori de pH. Se observă că odată cu creșterea pH-ului avem o creștere a forței normale. Deci, în concordanță cu testele de umflare, cu cât hidrogelul are un grad de umflare mare, cu atât el va fi mai puțin "rigid".

Acest comportament se datorează ionizării grupelor carboxil. Hidrogeluri sintetizate conțin în structura lor grupe ionizabile (carboxilice), iar în mediul apos, cu pH mare, grupele ionizează generând, dezvoltând sarcini electrice fixate pe hidrogel. Ca urmare, are loc o respingere electrostatică și o posibilitate mare de hidratare. Cu creșterea gradului de ionizare, numărul de sarcini electrice care se fixează pe gel crește, rezultând o creștere a respingerii electrostatice între lanțurile macromoleculelor; fenomenul este mai accentuat cu cât pH este mai mare. Prin urmare, intensitatea răspunsului hidrogelurilor la compresiune crește cu creșterea pH-ului.

## IV.2. Determinarea caracteristicilor de vâscoelasticitate

**PRINCIPIU:** Aparatul folosit în acest caz a fost tot reometrul, folosit în aceeași configurație ca în testele de compresiune (Figura 78a). Însă, în cazul testelor de baleiaj de frecvență (FS) se păstrează constantă amplitudinea și se urmărește variația modulelor de forfecare și a tangentei unghiului de pierderi pe un domeniu larg de frecvențe. Baleiajul de frecvență oferă informații utile legate de structura internă a hidrogelului polimeric.

Condițiile de bază pentru efectuarea corectă a unei astfel de analize sunt:

- Proba aderă la ambele plăci și nu apar alunecări sau deplasări locale;
- Proba este deformată omogen în întreg spațiul de forfecare.

**PARAMETRII:** În cazul diagramelor obținute în cazul baleiajului de frecvență modulul de acumulare ( $G'$ ) descrie comportarea elastică a probei, obținându-se informații cu privire la stabilitatea și rezistența structurală a probei ("rigiditate"), în timp ce modulul de pierderi ( $G''$ ) oferă informații cu privire la comportarea vâscoasă ("flexibilitatea"). Tangenta unghiului de pierderi,  $\tan(\delta)$ , se calculează ca raport al celor două module:  $\tan(\delta)$  este  $G''/G'$ .

Pentru toate probele determinarea a fost realizată la o deformație  $\gamma$  este 0,5%, pentru a ne plasa în domeniului de vâscoelasticitate liniară, și la o comprimare de ~15% din grosimea inițială a hidrogelului.

Domniul de frecvență ales a fost între 0-15 Hz, care corespunde domeniului fiziologic al cartilajului articular [160, 161].

### IV.2.1. Stabilirea parametrilor experimentali

**PROBELE:** Hidrogeluri cu formă cilindrică, cu diametrul de 0,5 m, și o grosime de ~2mm în stare hidratată, în soluție tampon pH 7. Pentru testarea cartilajului articular de pui au fost folosite eșantioane cu o grosime de 2mm și un diametru a părții bombate de 3 mm.

**INTERPRETAREA STATISTICĂ:** Fiecare test a fost repetat de trei ori, și cu ajutorul programului de statistică Student t (Kelida Graph) a fost determinată deviația standard, ca indicator statistic al gradului în care o valoare individuală dintr-o distribuție de valori, tinde să varieze față de media distribuției.

### IV.2.2. Rezultate și discuții

Testele reologice au permis analiza în condiții dinamice și oscilatorii, determinând astfel, în același timp modulul elastic și vâscos al materialelor polimerice.

Amândouă modulele au crescut odată cu frecvența aplicată,  $G'$  fiind mai mare ca  $G''$ , indicând faptul că hidrogelurile testate au un comportament elastic solid la frecvențele studiate. Totodată, la  $\omega$  mici, se pot observa câteva mici modificări ale  $G''$ , și acestea pot fi atribuite componentei vâscoase ale hidrogelurilor (Figura 82).

---

160 Park M.S., Hung C.T., Athesian G.A, *Mechanical response of bovine articular cartilage under dynamic unconfined compression loading and physiological stress levels*, OsteoArthritis and Cartilage (2004), 12: 65-73.  
161. Buckley M.R., Gleghorn J.P., Bonassar L.J., Cohen I., *Mapping the depth dependence of shear properties in articular cartilage*, Journal of Biomechanics (2008), 41: 2430-2437.



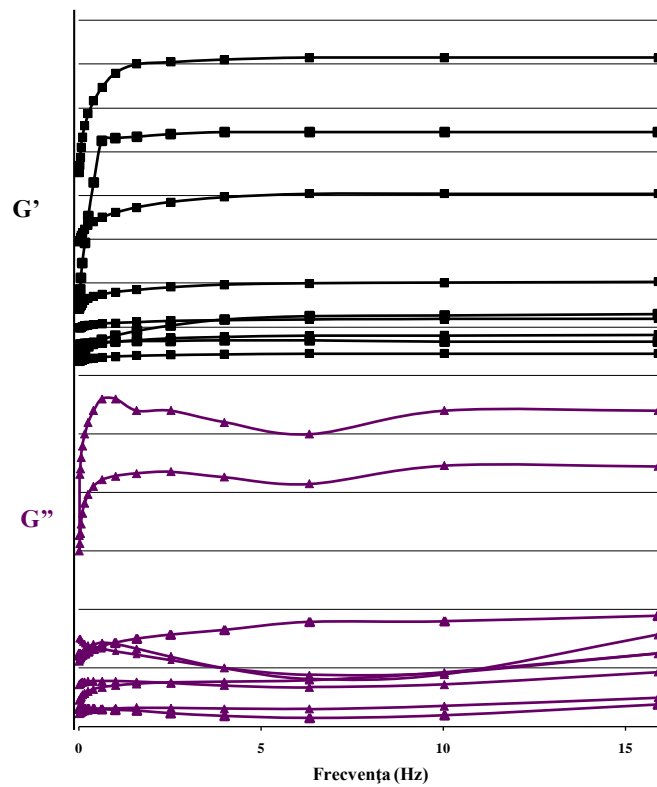


Figura 82. Reprezentarea lui  $G'$  și  $G''$  pentru hidrogelurile obținute

Calcularea modului de forfecare dinamic,  $G^*$  (Figura 83) a permis reprezentarea evoluției sale în funcție de frecvența aplicată.

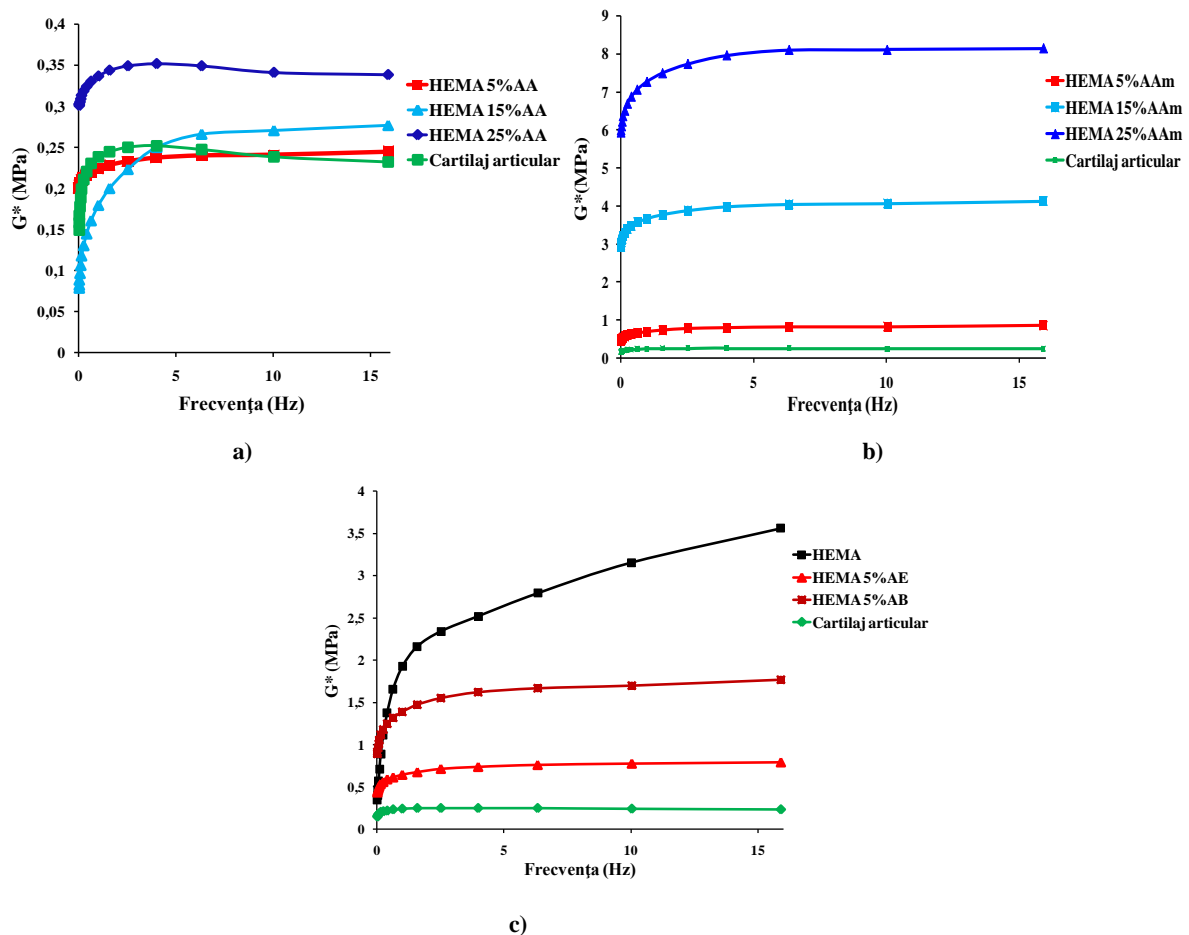


Figura 83. Modulul de forfecare aparent pentru hidrogelurile sintetizate în comparație cu cartilajul articular:

- a) hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AA;
- b) hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AAm;
- c) hidrogel HEMA, hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomeri AE, AB.

Valorile  $\tan(\delta) < 1$  indică prezența unei rețele interne stabile de forțe în probă, măsură a stabilității mecanice a acestora (Figura 82). Creșterea bruscă a valorii  $\tan(\delta)$  relevă faptul că hidrogelurile au o structură formată dintr-o rețea permanentă reticulată.

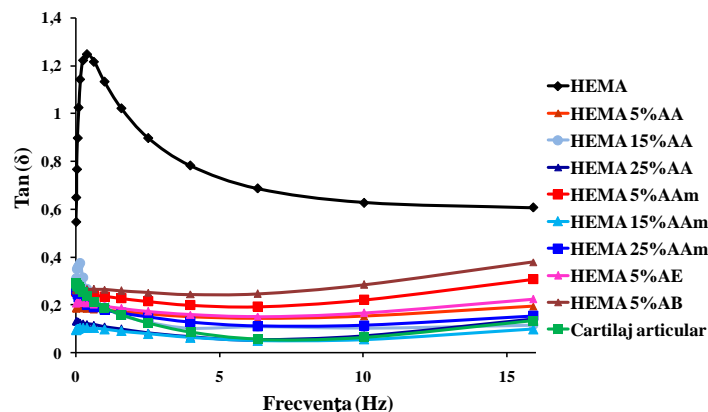


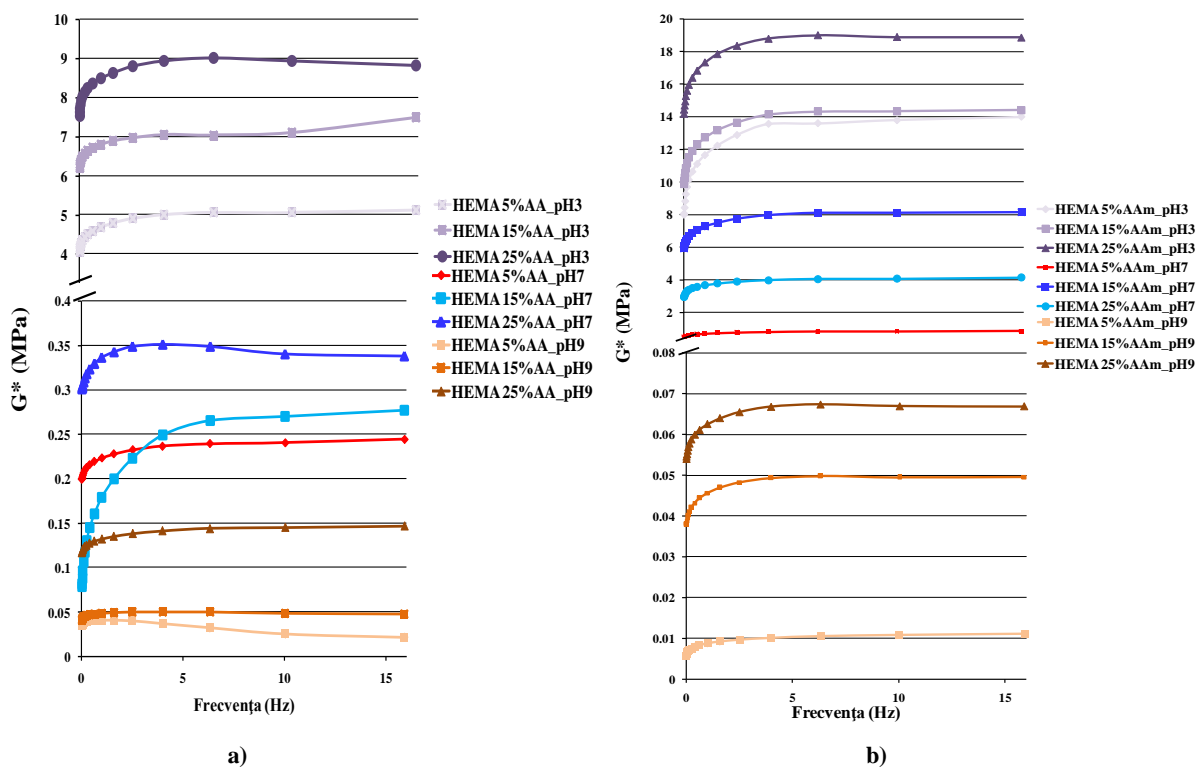
Figura 84. Valorile  $\tan(\delta)$  obținute pentru hidrogelurile sintetizate în comparație cu cartilajul articular

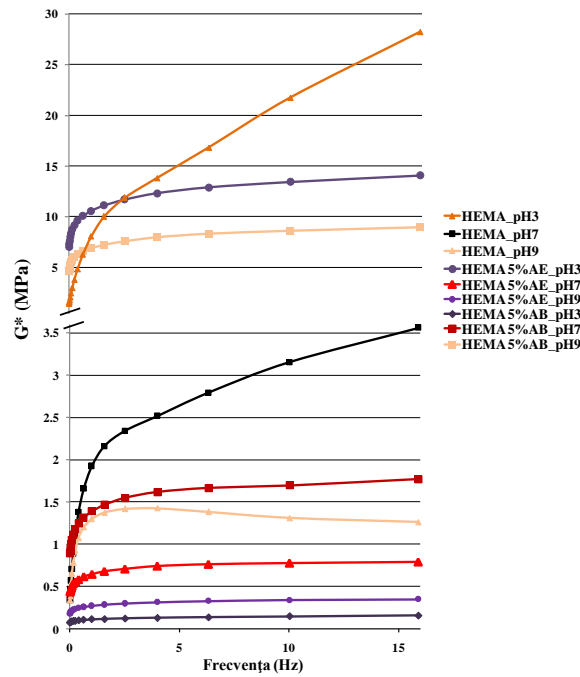
De asemenea, valorile obținute pentru hidrogelurile sintetizate cu comonomeri, se încadrează în plaja de valori normale ale cartilajului articular, în care  $\tan(\delta)$  are valori cuprinse între 0,15 și 0,36.

În concluzie, copolimerizarea a dus la îmbunătățirea proprietăților hidrogelului pe baza de HEMA, cu rezultate comparabile cu cele obținute pentru cartilajul articular.

### Influența mediului de hidratare

În condiții de pH alcalin se creează o rezistență mare la curgere, datorită creșterii repulsiilor electrostatice dintre grupările negative (COO<sup>-</sup>). La pH acid și bazic, rezultatele obținute în ceea ce privește valorile modulului de forfecare ( $G^*$ ) sunt în concordanță cu gradul de umflare al hidrogelurilor: crește cu creșterea pH-ului și cu concentrația de comonomer (Figura 85).



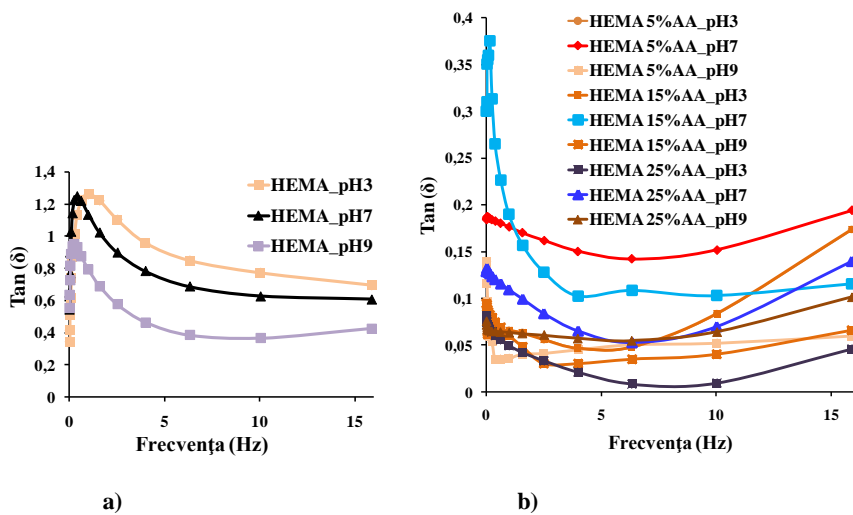


c)

 Figura 85. Valorile  $G^*$  obținute la variația de pH pentru:

- a) hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AA
- b) hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AAm
- c) hidrogel HEMA, hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomeri AE, AB

În cazul  $\tan(\delta)$ , se observă o creștere cu pH-ul și cu procentul de monomer adăugat (Figura 86). La toate hidrogelurile sintetizate, în afară de cele HEMA, valoarea  $\tan(\delta)$  este mai mică ca 0,5, ceea ce semnifică o predominare a componentei elastice a hidrogelurilor.



a)

b)

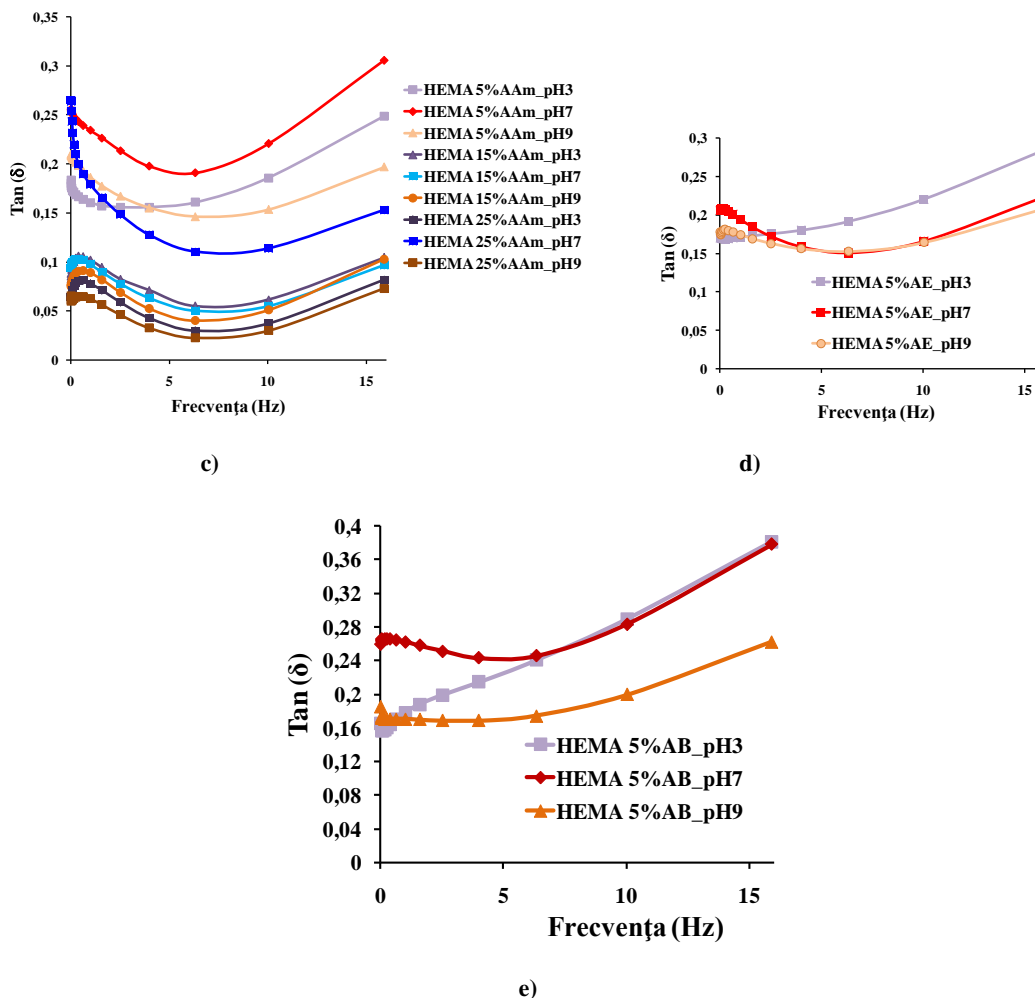


Figura 86. Valorile  $\tan(\delta)$  obținute în funcție de pH pentru hidrogelurile sintetizate:

- hidrogeluri HEMA
- hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AA
- hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AAm
- hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AE
- hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AB

### IV.3. Analiza critică a materialelor și selecția sistemelor cu potențiale aplicații biomedicale

În tabelul 12 sunt sintetizate principalele valori obținute pentru hidrogelurile sintetizate și cartilajul articular.

Tabelul 12. Sinteza rezultatelor preliminarilor obținute

Proba	Grad de umflare (%)	G* (MPa, la 3Hz )	E* (MPa)
HEMA	26 ±1	2,3±0,5	<b>0,7±0,02</b>
HEMA 5%AA	<b>71 ±1</b>	<b>0,23 ±0,1</b>	<b>0,7±0,03</b>
HEMA 15%AA	<b>76±1</b>	<b>0,22±0,4</b>	<b>0,6±0,01</b>
HEMA 25%AA	<b>85 ±1</b>	<b>0,24 ±0.1</b>	<b>0,4±0,03</b>
HEMA 5%AAm	<b>82±1</b>	0,76±0,2	0,5±0,02
HEMA 15%AAm	120±1	7,7±0,3	0,3±0,01
HEMA 25%AAm	160±1	3,87±0,1	0,2±0,03
HEMA 5%AE	52±1	0,71±0,4	0,1±0,01
HEMA 5%AB	55±1	1,61±0,5	0,1±0,04
Cartilaj articular	<b>75 ±1</b>	<b>0,25 ±0.2</b>	<b>0,9±0,05</b>

Valorile care se apropie de cele ale cartilajului articular sunt prezentate îngroșat în tabelul 12. Se poate astfel observa că prin folosirea comonomerilor pentru hidrogelurile sintetizate s-au putut controla proprietățile hidrogelurilor pe bază de HEMA. Însă, adaosul comonomerului AA determină obținerea de hidrogeluri care se apropie cel mai mult de comportarea cartilajului articular. De aceea, în continuare, pentru testele următoare, se va lua în considerare doar trei formulări: HEMA 5%AA care are un răspuns mecanic la compresiune asemănător cu al cartilajului articular, HEMA 25%AA care are un răspuns mecanic la forfecare asemănător cu al cartilajului articular, precum și hidrogelul HEMA care este etalonul și cartilajul articular, pentru a putea compara valorile obținute. Valoarea obținută pentru cartilajul articular corespunde cu datele bibliografice [162].

#### **IV.4. Analiza nanomecanică a hidrogelurilor p(HEMA-co-AA)**

Pentru hidrogelurile selectate, datorită faptului că sinteza a fost realizată prin polimerizare radicalică, s-a pus problema omogenității de suprafață. Pentru aceasta, au fost realizate teste la scară nano, folosind microscopia de forță atomică. Testele de nanoindentare au fost realizate în aceleași condiții ca și cele la scară macro.

162. Mow V.C., Ratcliffe A., *Structure and function of articular cartilage and meniscus*, In: Basic orthopaedic biomechanics, 2nd ed. Philadelphia, PA: Lippincott-Raven (1997), p. 113–177.

În tabelul 10 sunt prezentate valorile tipice comparative pentru a putea realiza teste la scară nano, în aceleași condiții ca cele de la scară macro.

Tabelul 13. Comparație între parametrii pentru testele nano și macro [163]

	Nano	Macro
Aria de contact	10-16 m <sup>2</sup>	10-5 m <sup>2</sup>
Forța	0-200x10 <sup>-9</sup> N	1-10N
Tensiunea	0-2 GPa	0,1-1 MPa
Viteza	0,05-10 μm/s	10 μm/s -260 mm/s

După cum se poate observa, pentru a avea o corespondență între testele de la scară macro și nano, forța normală este de șapte ordine de mărime mai mică în testele nano decât în cele macro.

#### IV.4.1. Teste de nanoindentare

**PRINCIPIU:** pentru măsurarea proprietăților nano-mecanice ale cartilajului de pui și hidrogelurilor sintetizate s-au utilizat măsurători în AFM. Pentru această aplicație, eșantionul vine în contact cu vârful nanometric al AFM-ului într-o manieră controlată, prin deplasarea tubului piezoelectric [Z (nm)]. În urma contactului, are loc o deflexiune statică a cantilever-ului. Această deviație este măsurată prin intermediul reflexiei fascicolului laser, care este proporțională cu forța [Fn(pN)] suportată de cantilever (Figura 87).

Pentru interpretarea rezultatelor au fost trasate curbe de forță de apropiere, F în funcție de deplasarea pe direcția z.

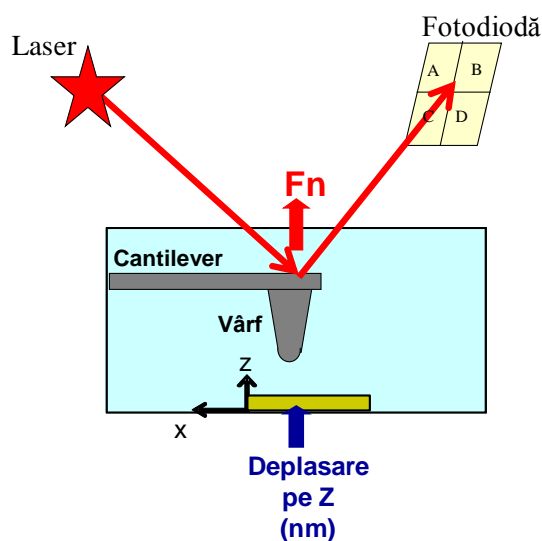


Figura 87. Reprezentarea schemei simplificată a AFM-ului

163. Feldman K., Fritz M., Hahner G., Marti A., Spencer N.D., *Surface forces, surface chemistry and tribology*, Tribology International (1998), 31(1-3): 99-105.

**PARAMETRI:**

**MODELUL TEORETIC CONTACTULUI LUI HERTZ:** Contactul lui Hertz se referă la forțele localizate atunci când două suprafețe sferice vin în contact, și se deformează ușor sub acțiunea forțelor aplicate. În acest caz, cele două suprafețe sunt vârful nanometric și eșantioanele, considerate sferice la scară nanometrică. Teoriei lui Hertz ne permite să punem în ecuație ( $F$  este  $\frac{4}{3} \sqrt{R E^* (dz)^{1,5}}$ ) forța din zona de contact în funcție de forța normală aplicată [ $F$  (pN)], raza vârfului nanometric ( $R$ ) și modulul de elasticitate aparent [ $E^*$ (MPa)].

**IV.4.1.1 Stabilirea parametrilor experimentali****PROTOCOL EXPERIMENTAL**

**PROBELE:** Hidrogelurile sintetizate și cartilajul de pui proaspăt, prelevat în aceeași zi au fost fixate (prin lipire cu ajutorul unei cantități mici de cianoacrilat) în suporturi de teflon (Figura 88).

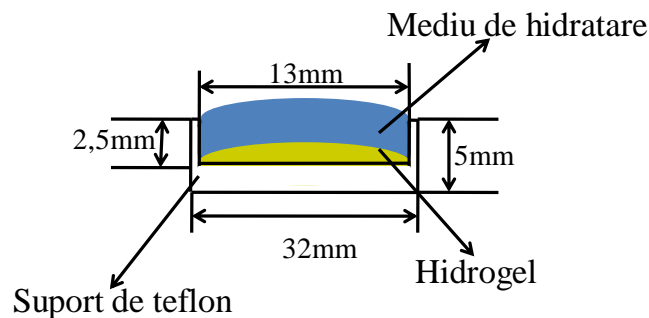
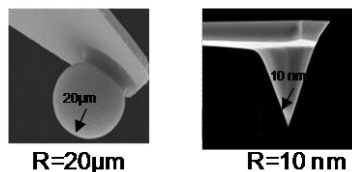


Figura 88. Schema suportului de teflon utilizat la teste de nanoindentare

Utilizarea acestor suporturi în teflon a permis formarea unui menisc la adăugarea mediului de hidratare, asigurând astfel menținerea condițiilor de hidratare pe parcursul experimentelor.

Pentru analize au fost utilizate două tipuri de nanosenzori (Figura 89):

- cu vârf ascuțit, din nitrură de siliciu ( $\text{Si}_3\text{Ni}_4$ ) cu raza de 10nm și constanta elastică de 1N/m (Veeco, DNP-S10) (Figura 89a);
- cu vârf sferic, din borosilicat cu raza de 20 $\mu\text{m}$  și constantă elastică de 2,8 N/m (NanoandMore, CP-FM-BSG) (Figura 89b).



a)

b)

Figura 89. Micrografii ale nanosenzorilor folosiți:

a) vârf sferic

b) vârf ascuțit



Testele au fost făcute la o viteză medie de 500nm/s .

**INTERPRETAREA STATISTICĂ:** Fiecare test a fost repetat de trei ori, și cu ajutorul programului de statistică Student t (Kelida Graph) a fost determinată deviația standard, ca indicator statistic al gradului în care o valoare individuală dintr-o distribuție de valori, tinde să varieze față de media distribuției.

#### IV.4.1.2. Rezultate și discuții

Pentru măsurarea deflexiunii cantilevierului care susține vârful nanometric, la apropierea eșantionului, avem următoarele situații (Figura 90):

- când vârful nu este în contact cu suprafața nivelul deflexiunii cantilever-ului este zero, deci forța exercitată asupra sondei este zero;
- când vârful este în contact cu o suprafață rigidă (în cazul nostru este referința), cum aria de contact rămâne constantă pentru că suprafața nu se deformează, deflexiunea măsurată va fi comportarea elastică a cantilevierului, deci, vom obține o dreaptă cu panta proporțională cu constanta elastică a cantilever-ului:  $k_c$ ;
- când vârful este în contact cu o suprafață elastică (cazul hidrogelurilor și a cartilajului articular) deflexiunea cantilever-ului va fi reprezentată de deformarea cantilever-ului+deformarea probei:  $k_c+k_s$ . Cum contactul este considerat la scară nano sferă-plan, aria de contact variază cu forța normală, și vom obține o curbă parabolică.

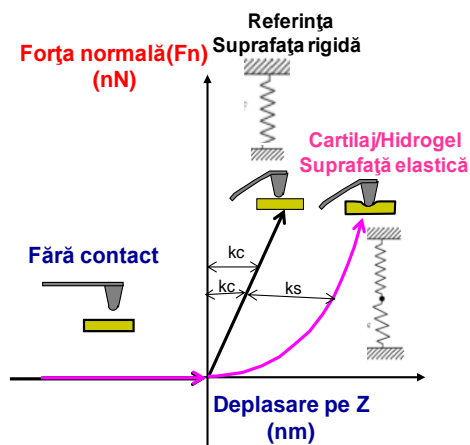


Figura 90. Interpretarea curbelor obținute prin nanoindentare

Pentru a interpreta aceste măsuri vom fița curba parabolică printr-o regresie de tip putere (Figura 91).

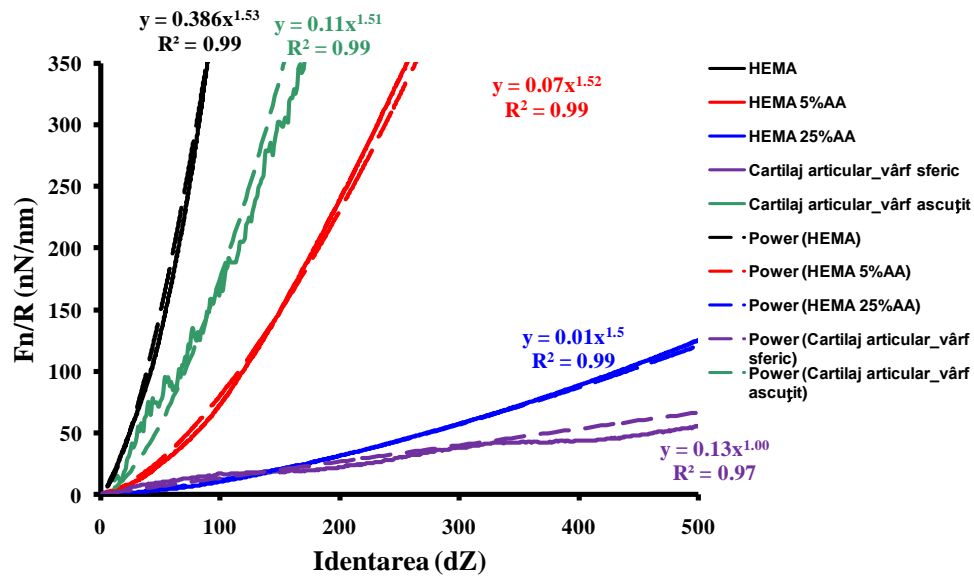


Figura 91. Reprezentarea curbelor  $F_n/R$  în funcție de indentare și curbele de fitare tip putere

În figura 90 se poate observa curbele de indentare pentru hidrogelurile sintetizate și cartilajul articular obținute în cazul testelor cu vârful sferic. Rezultatele (statistică pe ~1000 puncte de măsură) ne arată că, în cazul hidrogelurilor testate cu vârful sferic și cartilajului articular testat cu vârful ascuțit, analiza regresiei cu ajutorul unei curbe tip putere ne dă un coeficient  $\alpha$  de 1,5 (Figura 92a). Însă, în cazul cartilajului articular, pentru testele în care este folosit nanosenzorul cu vârful sferic obținem coeficient 1 (Figura 92b).

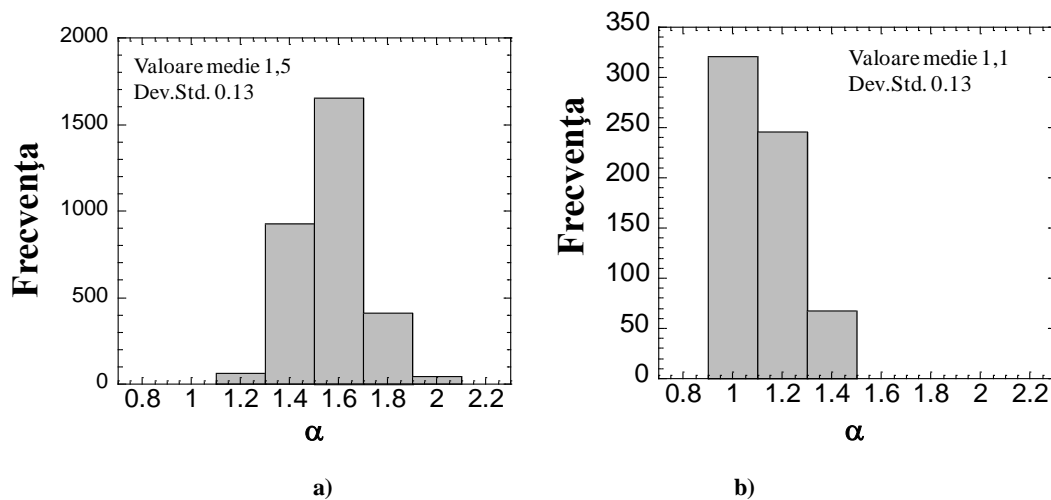


Figura 92. Histogramele obținute pentru:

- hidrogelurile sintetizate testate cu vârful sferic și cartilajul articular testat cu vârful ascuțit
- cartilajul articular testat cu vârful sferic

Explicația acestui comportament se poate pune pe baza rugozității cartilajului articular. Cartilajul articular are o rugozitate de ~1000nm. Având același ordin de mărime cu

cel al vârfului de nanoindentare, este posibil să avem contacte multiple (Figura 93), ceea ce va duce la obținerea unui coeficient cu valoarea 1.



Figura 93. Schema simplificată a cartilajului articular testat cu:

a) vârf sferic

b) vârf ascuțit

În consecință, pentru a avea rezultate verosimile la scară nanometrică, trebuie controlați parametrii de testare, pentru a putea minimiza interpretările greșite. De exemplu, curbele AFM arată că pentru testele în care s-a folosit vârful sferic, cu raza de  $20\mu\text{m}$ , se obține o curbă de regresie cu coeficientul de 1,5, în cazul în care rugozitatea este mică (cazul hidrogelurilor), însă, când rugozitatea este de același ordin de mărime cu raza vârfului (cazul cartilajului articular), rezultatele nu urmează aceeași lege, având mai degrabă o lege liniară, aceasta putând fi datorată punctelor multiple de arii de contact. Pentru a soluționa această problemă, s-a ales folosirea unui vârf cu o rază mai mică decât rugozitatea cartilajului articular [164].

Deci, pentru a putea avea date interpretate de teoria lui Hertz, trebuie să alegem vârful nanosenzorului în funcție de rugozitatea probelor.

O altă condiție pentru a putea aplica teoria lui Hertz, este să nu existe forțe de adeziune. Se poate observa din histograma din figura 94 că doar 40% din curbele obținute au avut o adeziune de  $0,7\text{nN}$ , în timp ce mai mult de jumătate din ele nu prezintă adeziune.

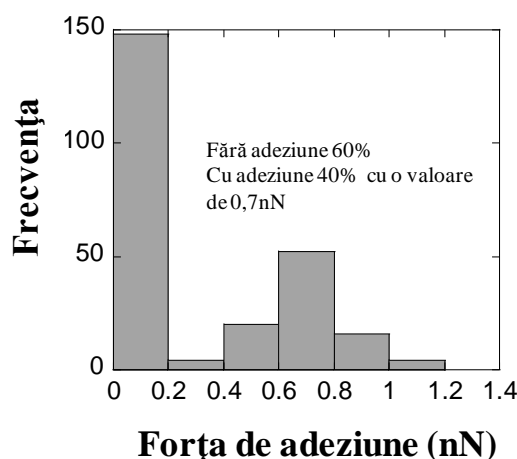


Figura 94. Histograma pentru forțele de adeziune

164. **Bostan L.**, Sfarghiu-Trunfio A-M., Vereștiuc L., Popa M.I., Munteanu F., Berthier Y., *Macro and nanotribological characterisation of a new HEMA hydrogel for articular cartilage replacement*, Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering 92010), 13(1): 33-35, ISSN: 1025-5842.

Toate aceste rezultate, ne permite aplicarea modelului teoretic al contactului lui Hertz, cu ajutorul căruia va fi posibilă calcularea modulului elastic aparent la scară nano (Figura 95).

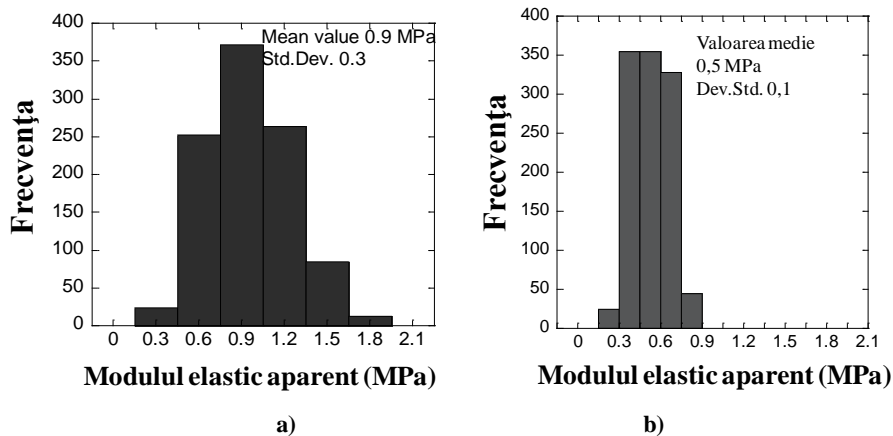


Figura 95. Histograme obținute pentru valorile modulului elastic aparent:

a) cartilajul articular

b) hidrogelul HEMA 5%AA

Valorile obținute pentru modulul elastic aparent sunt prezentate în tabelul 14.

Tabelul 14. Valorile modulului de elasticitate aparent obținute la scară nano

Proba	E* (MPa)
HEMA	0,9±0,08
HEMA 5%AA	0,5±0,1
HEMA 25%AA	0,2±0,07
Cartilaj articular	0,9±0,1

Valorile modulului de elasticitate aparent obținut la scară nano sunt comparabile cu cele obținute la scară macro, însă cu mici diferențe. Aceste diferențe cresc cu adăugarea comonomerului de AA și se datorează neomogenității hidrogelurilor, așa cum au arătat și testele de determinare a unghiului de contact dinamic.

### Influența variației de viteză

Viteza medie la care au fost realizate testele a fost variată, de la 10μm/s la 0.05μm/s. Se poate observa din rezultatele obținute (Figura 96) că modulul elastic aparent scade odată cu creșterea vitezei, ceea ce confirmă, încă o dată, caracterul vâscoelastic al hidrogelurilor sintetizate asemănător cu cel al cartilajului articular.

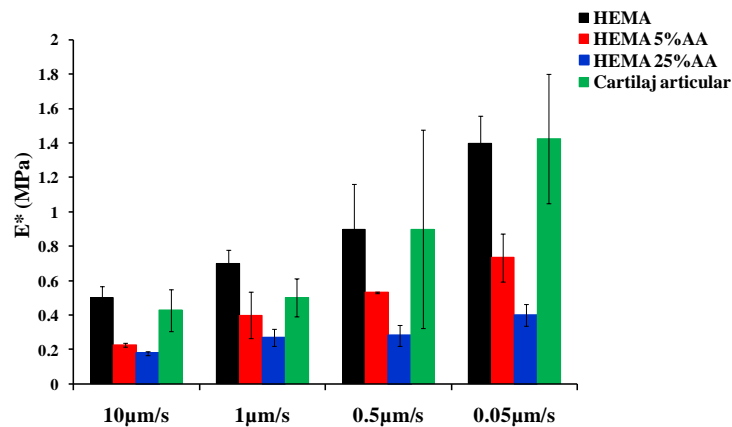


Figura 96. Modulul de elasticitate aparent la scară nano în funcție de viteză

## IV.5. CONCLUZII

1. Testele de compresiune au fost realizate pentru a evalua proprietățile hidrogelurilor sintetizate comparativ cu cele ale cartilajului articular. Hidrogelurile HEMA și HEMA cu comonomerul AA au avut un comportament asemănător cu cel al cartilajului articular, în ceea ce privește modulul elastic aparent ( $E^*$ ).

2. Testele de forfecare pe hidrogelurile sintetizate și pe cartilajul articular au permis determinarea modulului de forfecare global ( $G^*$ ). Valorile obținute confirmă proprietățile de viscoelasticitate a hidrogelurilor sintetizate cu comonomerul AA, comportarea acestora fiind asemănătoare cu cea a cartilajului articular.

3. Pe baza rezultatelor obținute, s-au selectat trei formulări pentru următoarele teste:

- hidrogelul HEMA, etalonul, pentru a vedea comparativ comportamentul hidrogelurilor obținute prin modificarea acestui hidrogel;
- hidrogelul HEMA 5%AA care are un răspuns mecanic la compresiune asemănător cu al cartilajului articular;
- Hidrogelul HEMA 25%AA are un răspuns mecanic la forfecare asemănător cu al cartilajului articular.

4. Omogenitatea suprafeței hidrogelurilor sintetizate a fost testată la scară nano cu ajutorul AFM-ului, în aceleași condiții ca cele realizate la scară macro. Valorile modulului de elasticitate aparent obținut la scară nano sunt comparabile cu cele obținute la scară macro, cu mici diferențe datorate neomogenităților care cresc odată cu adăugarea de comonomer AA.

## CAPITOLUL V

### ANALIZA TRIBOLOGICĂ A HIDROGELURILOR

*"Dintre toate variabilele asociate cu mișcarea de rostogolire, cel mai important factor este frecarea. Frecarea în mișcarea de rostogolire, ca și alte procese mecanice, poate fi un prieten bun sau un dușman de moarte, iar controlul său într-un interval maxim de valori este esențial pentru fiecare proces."*

*Eduard Williams Roberts (1997)*

Una din cele mai importante caracteristici mecanice ale cartilajului articular o reprezintă coeficientul de frecare foarte mic dar și uzura mică, ceea ce îl face un material performant din punct de vedere tribologic.

În biomecanica articulară, tribologia se ocupă cu studiul forțelor care permit ca două corpuri solide alăturate să se deplaseze unul pe celălalt, deplasare ce se realizează ca forțe tangențiale, intensitatea de frecare depinzând de:

- masa corpurilor ce se deplasează: determină presiunea unitară, care este forța de presiune a masei pe unitatea de suprafață (ce va favoriza uzura mai rapidă sau mai lentă a suprafețelor de contact);
- forma spațială a suprafețelor de contact de care depinde congruența acestora;
- natura chimică a suprafețelor de contact, ce realizează "coeficientul de frecare";
- viteza de deplasare relativă, care pe măsură ce crește determină scăderea forței de frecare, ajungându-se la "frecarea de alunecare";
- existența unui lichid intermediar între suprafețele articulare, care influențează intensitatea forțelor de frecare, lichidul sinovial, lichid non-newtonian (vâscozitatea lui scade pe măsură ce viteza de deplasare și sarcina de încărcare se măresc).

Lubrefierea specifică a cartilajului (de suprafață, prin absorbția lubrifiantului din structura sa, peste care "aderă" o peliculă de lichid format din amestecul condromucoproteinelor secretate de condrocite și acidul hialuronic al lichidului sinovial) îi asigură un coeficient de frecare foarte mic, cu valori de 0,005-0,01 [165].

---

165. Mow V. C., Proctor S. C., Kelly A. M., *Biomechanics of Articular Cartilage*, in Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System, Nordin M. and Frankel V. H. eds., Lea & Ferbinger, Philadelphia, London (1998).

Datorită modului de unire al capetelor articulare, mișcările fiziologice ale articulațiilor în jurul unor axe biomecanice, sunt de tip special, care permit variate tipuri de mobilizări ale segmentelor capetelor articulare:

- pendular, ce realizează mișcările clasice de flexie, extensie, abducție, adducție, circumducție ale segmentelor;
- oscilator, care implică mobilizările polivalente, oscilante ale segmentelor cât și mișcări intracapsulare ale capetelor osoase: alunecarea (glisarea)
- rularea, o suprafață articulară se răsucește, descriind un arc de cerc, în jurul axului longitudinal al osului;
- sinovia, membrana conjunctivo-histiocitară ce învelește spațiul articular și creează intraarticular vilozițiile sinoviale, secretă lichidul sinovial (lubrifiantul perfect) care alături de structura specială a sinovialei favorizează mișcarea articulară cu o opozabilitate cât mai mică.

Având aceste proprietăți tribologice importante, cu un coeficient de frecare foarte mic, și este necesar ca materialele pentru ingineria tisulară a cartilajului articular să reconstruiască toate aceste proprietăți. Astfel, hidrogelurile sintetizate au fost analizate din punct de vedere al proprietăților tribologice, atât la scară macro cât și la scară nanometrică.

## V.1. Studii de frecare la scara macroscopică

**PRINCIPIUL METODEI** constă în frecarea suprafeței eșantioanelor pe o suprafață de sticlă. Avantajul folosirii platanului din sticlă constă în faptul că se poate vizualiza contactul dintre cele două suprafețe, și degradarea probelor, acolo unde este cazul.

**PARAMETRI** folosiți pentru testele tribologice au fost stabiliți pe același reometru ARES folosit la testele de comprimare și forfecare. De obicei, testele tribologice se realizau cu un tribometru, însă folosirea reometrului ne permite controlarea unor parametri, ca viteza de deformare și frecvența de oscilare. De asemenea, geometria hidrogelurilor nu are importanță, iar sensibilitatea în măsurarea de coeficienți de frecare mici este mai mare decât în cazul unui tribometru [166]. A fost impusă o deformare normală constantă (15% din grosimea hidrogelurilor) și s-a măsurat cuplul de frecare alcătuit din forța normală și tangențială, ceea ce ne-a permis să reprezentăm coeficientul de frecare în funcție de timp. Pentru a evita suprapunerea liniilor de frecare ale celor trei hidrogeluri am realizat deplasări alternative

166. Gong J.P, Osada Y., *Surface friction of polymer gels*, Polymeric Science (2002), 27: 3-38.

corespunzătoare unei treimi din circumferința platanului reometrului (Figura 97). Testele au fost realizate în mediu hidratat, soluție pH 7, pentru a imita mediul fiziologic *in vivo*.

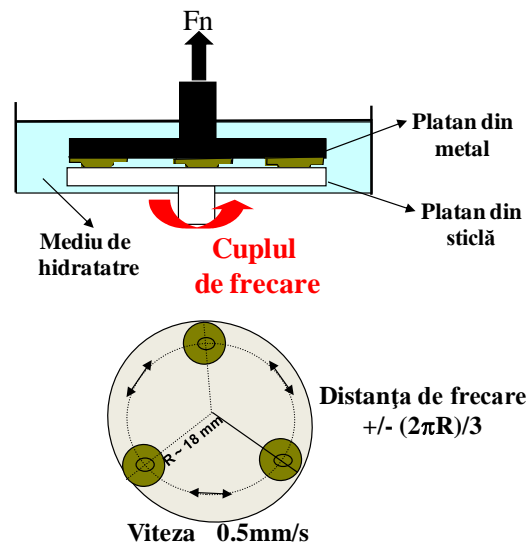


Figura 97. Reprezentarea schematică a dispozitivului de frecare la scară macro

**COEFICIENTUL DE FRECARĂ (COF)**, permite caracterizarea contracției perpendiculare la direcția efortului aplicat. La o întindere, este raportul dintre contracția transversală și alungire axială. Este întotdeauna mai mică sau egală cu 0,5, o valoare limită care corespunde unei material incompresibil, cum ar fi de exemplu un lichid sau cauciuc (material solid).

### V.1.1. Stabilirea parametrilor experimentali

**PROTOCOL EXPERIMENTAL** pentru testele realizate a fost folosită o viteză de 0,5mm/s, valoare ce reprezintă media intervalului fiziologic [167]. Forța tangențială înregistrată în timpul testelor a fost divizată la forța normală, obținându-se astfel coeficientul de frecare (COF).

**PROBELE** folosite au fost trei hidrogeluri plan convexe care au fost simetric lipite pe platanul superior din metal iar cel pe care au fost frecate hidrogelurile din sticlă. Hidrogelurile au fost în stare hidratată în soluție tampon pH 7.

**INTERPRETAREA STATISTICĂ:** Fiecare test a fost repetat de trei ori, și cu ajutorul programului de statistică Student t (Kaleida Graph) a fost determinată deviația standard, ca indicator statistic al gradului în care o valoare individuală dintr-o distribuție de valori, tinde să varieze față de media distribuției.

167. Macirowski T., Tepic S. and Mann R.W., *Cartilage stresses in the human hip joint*, ASME (1994), 116: 10-18.



## V.1.2. Rezultate și discuții

Penru a calcula coeficientul de frecare s-a determinat valoarea acestuia la dus și întors în funcție de timp (Figura 98). Valoarea COF este media valorilor obținute care are semnul plus la dus și semnul minus atunci când a fost schimbat sensul de frecare.

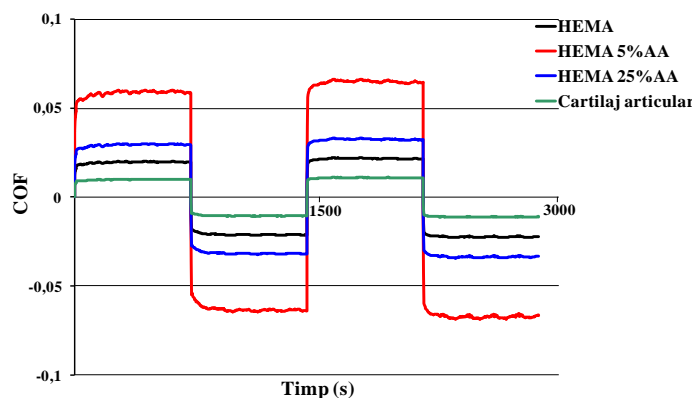


Figura 98. Graficul COF la scară macro în funcție de timp

Valorile obținute și cu deviația standard respectivă sunt prezentate în tabelul 15.

Tabelul 15. Valorile coeficienților de frecare pentru hidrogelurile sintetizate

Proba	COF
HEMA	0,02±0,002
HEMA 5% AA	0,05±0,004
HEMA 25% AA	0,03±0,003
Cartilaj articular	0,01±0,005

Rezultatele au arătat un coeficient de frecare mic, de ordinul  $10^{-2}$ , și constant pentru o perioadă de 30 minute fără degradarea mecanică a probelor.

### Influența variației de viteză

Rețeaua polimerică reține lichidul în hidrogel, datorită forțelor de interacțiune, astfel hidrogelul are o anumită rigiditate, însă, în același timp hidrogelul are o consistență moale, deformându-se sub acțiunea unei forțe externe. Comportamentul hidrogelurilor la frecare este diferit de cel al solidelor, astfel, se poate observa o variație a coeficientului de frecare în funcție de forța normală, viteza de frecare, și în funcție de compoziție.

Coeficientul de frecare scade cu creșterea deformației aplicate și a vitezei de frecare (Figurile 99 și 100).

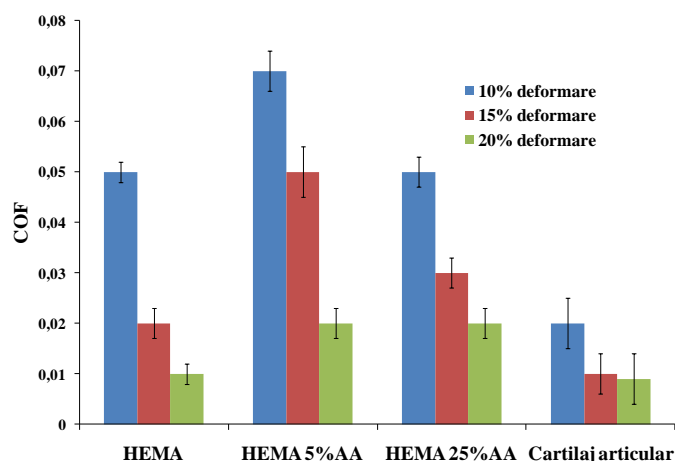


Figura 99. Variația COF în funcție de deformare

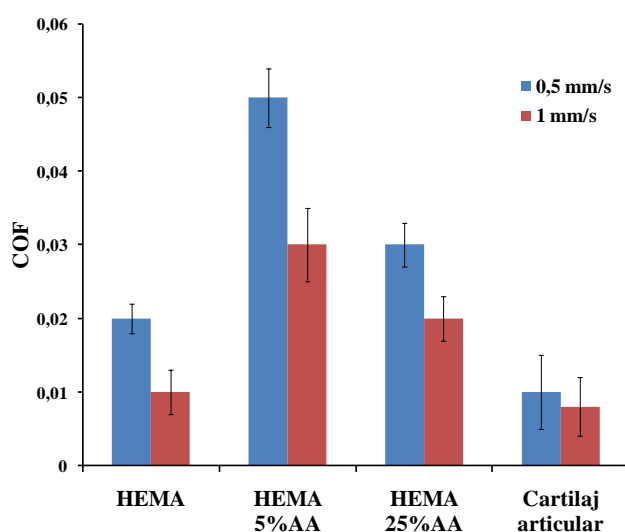


Figura 100. Variația COF în funcție de viteza de frecare

Acest comportament se datorează rugozităților probelor, astfel încât, în cazul unei deformări mici, sau unei viteze de frecare mici, rugozitățile nu sunt complet comprimate, și aderă la suprafața de frecare. În cazul unei comprimări mai mari, rugozitățile sunt complet comprimate, iar mediul hidratat asigură un film de lubrefiere continuu astfel încât, valoarea coeficientului de frecare scade.

## V.2. Teste nanotribologice

AFM-ul permite înregistrarea forțelor laterale care apar în urma interacțiunilor dintre vîrf și suprafață. Există două forțe laterale care au o componentă orizontală: forța de frecare și forța normală, care derivă din verticală datorită asperităților de suprafață (Figura 101).

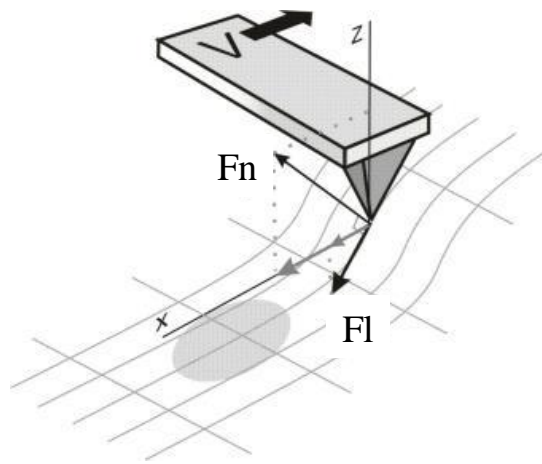


Figura 101. Natura forțelor laterale

Forța normală este determinată de rugozitățile de suprafață. De aceea, forțele laterale dau informații în ceea ce privește topografia de suprafață. Însă, studiul forțelor de frecare ne pot da alte informații importante referitoare la proprietățile de suprafață. Astfel, AFM este o tehnică foarte importantă pentru tribologie.

Măsurarea forțelor laterale este influențată de forțele de frecare dar și normale. De aceea nu este posibilă măsurarea lor într-un singur pas. Pentru separarea efectului tribologic, este de ajuns să se inverseze direcția de scanare. În acest caz, forța de frecare își va schimba semnul, în timp ce forța normală va rămâne constantă.

**PRINCIPIUL METODEI** constă în faptul că, în afara forțelor normale, cantileverul este sensibil și la forțele de frecare ( $F_f$ ) care creează un cuplu de torsiune, și deci o variație pe orizontală a semnalului fotodiodei. Experimentele de frecare au fost realizate în modul de modulare lateral. Această tehnică constă în aplicarea unei deplasări laterale contactului dintre vârf și suprafață și măsurarea răspunsului de torsiune, adică a forței laterale create, în condițiile în care forța normală este constantă (Figura 102).

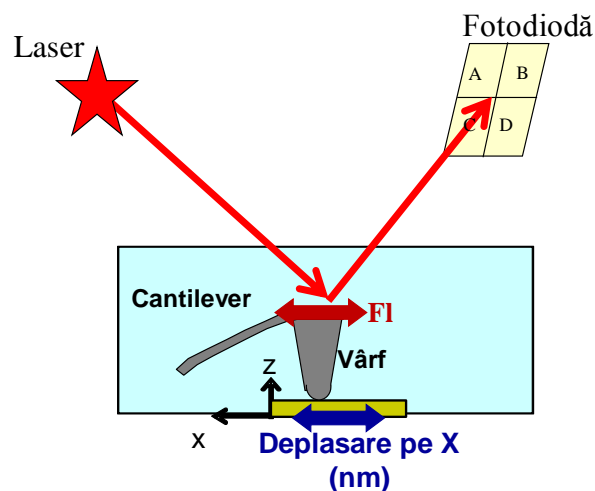


Figura 102. Reprezentarea schematică a dispozitivului de frecare la scară nano

## V.2.1. Stabilirea parametrilor experimentali

Pentru **PROTOCOLUL EXPERIMENTAL** în cazul măsurătorile tribologice la scară nano s-a folosit tot microscopul de forțe atomice. Eșantionul este în contact cu sondă, și se impune o deplasare a eșantionului menținând forța normală constantă. Măsurând torsiunea cantilevărului putem determina forța laterală cunoscând constanta elastică de torsiune a levierului. Testele au fost realizate în mediu hidratat, iar pentru a avea aceleași condiții experimentale ca cele de la scară macro, s-a folosit un senzor nanometric sferic din borosilicat (sticlă), cu o constantă de torsiune de 150N/m și o rază de 20 $\mu$ m. Distanța de frecare a fost de  $\sim 20 \mu\text{m}$ , iar viteza de 0,5  $\mu\text{m/s}$  ceea ce corespunde la 3Hz, valoare corespunzătoare condițiilor fiziologice [168]. Forța normală a fost de 500 nN.

**PROBELE** folosite au constat în hidrogeluri hidratate în soluție tampon pH 7 și cartilaj articular de pui.

**INTERPRETAREA STATISTICĂ:** Fiecare test a fost repetat de trei ori, și cu ajutorul programului de statistică Student t (Kaleida Graph) a fost determinată deviația standard, ca indicator statistic al gradului în care o valoare individuală dintr-o distribuție de valori, tinde să varieze față de media distribuției.

## V.2.2. Rezultate și discuții

Valorile COF la scară nano în funcție de timp sunt reprezentate în figura 103. În cazul cartilajului articular, datorită rugozităților sale de același ordin cu cel al senzorului AFM, nu s-a putu interpreta valorile obținute.

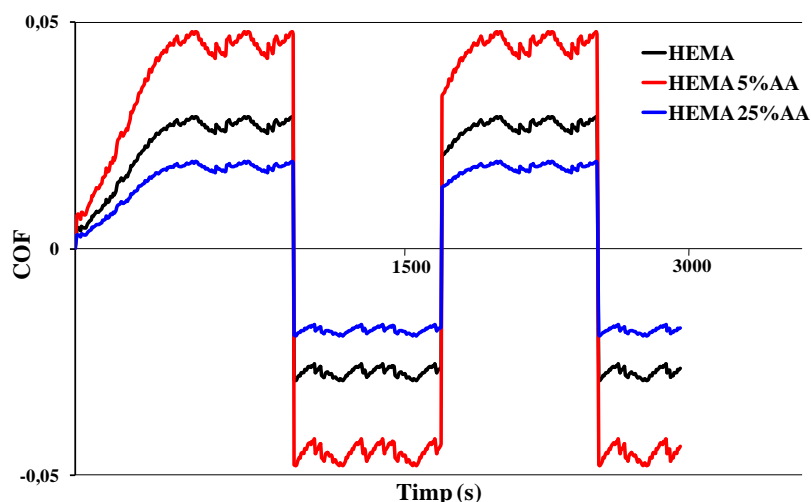


Figura 103. Graficul COF la scară nano în funcție de timp

Valorile obținute și cu deviația standard respectivă sunt trecute în tabelul 16.

168. Stolz M., Raiteri R., Daniels A.U., VanLandingham M.R., Baschong W., and Aebi U., *Dynamic Elastic Modulus of Porcine Articular Cartilage Determined at Two Different Levels of Tissue Organization by Indentation-Type Atomic Force Microscopy*, Biophysical Journal (2004), 86: 3269-3283.

Tabelul 16. Valorile coeficienților de frecare obținuți

Proba	COF
HEMA	0.03±0.005
HEMA 5%AA	0.05±0.007
HEMA 25%AA	0.02±0.003
Cartilaj articular	-

Valorile obținute sunt mici, de ordinul 10<sup>-2</sup>, cu mici diferențe față de valorile obținute la scară macro.

### Influența variației vitezei

S-a studiat comportamentul hidrogelurilor la variației forței normale aplicate și a vitezei de frecare. Influența variației coeficientului de frecare în funcție de forța aplicată și viteză sunt reprezentate în figura 104, respectiv figura 105.

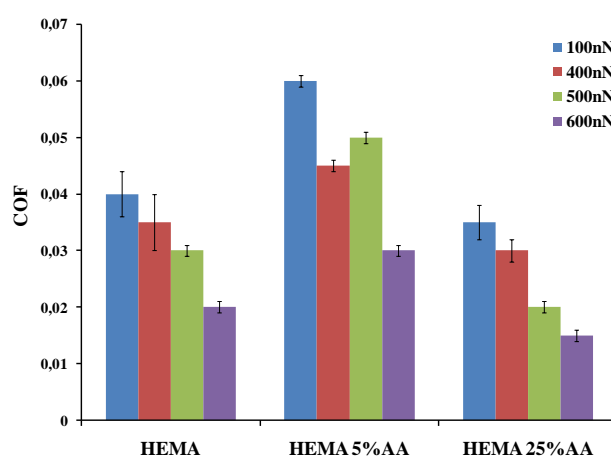


Figura 104. Variația COF în funcție de forța aplicată

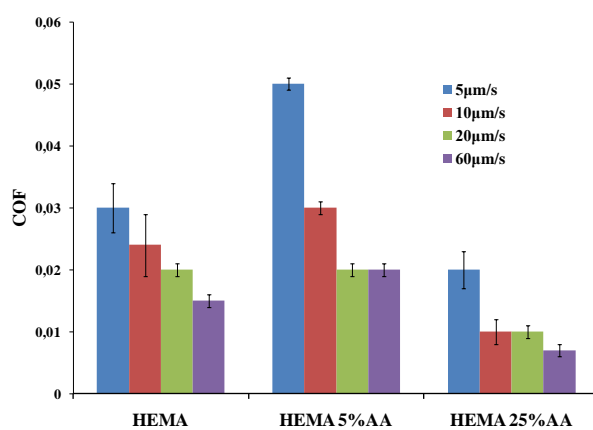


Figura 105. Variația COF în funcție de viteza de frecare

Se poate observa aceeași tendință de variație a coeficientului de frecare, și anume o scădere a valorii sale în funcție de forța aplicată și viteză, datorată comprimării rugozităților și regimului de lubrefiere respectiv.

### V.3. Studii de topografie

Tehnica AFM oferă un contrast extrem de mare pe suprafețe netede la scară nanometrică. Microscopul optic și electronic nu pot să determine textura suprafeței care este ușor măsurată cu AFM. Aplicațiile includ vizualizarea topografiei suprafeței atât în perspectiva 2D cât și 3D, măsurarea rugozității de suprafață și a ariei acesteia. Toți parametrii pot fi calculați după ce imaginea este achiziționată.

**PRINCIPIUL METODEI** AFM constă în măsurarea topografiei probelor prin scanarea unui vârf pe o suprafață atât în aer cât și în lichid. Imaginile sunt generate cu ajutorul unui semnal ce vine de la fotodetector, acesta fiind asociat cu deflecțiile cantilever-ului în urma interacției acestuia cu suprafața. Forța dintre vârf și suprafață, este valoarea de referință pentru deflexia cantilever-ului.

#### V.3.1. Stabilirea parametrilor experimentali

Pentru **PROTOCOLUL EXPERIMENTAL** s-a ales un senzor AFM cu o constantă elastică mică de 0,2 N/m (VEECO, DNP-S-10), în modul contact. A fost măsurată rugozitatea pic-la-pic, care reprezintă valoarea medie dintre picul maxim și minim de rugozitate.

**PROBELE** folosite au constat în hidrogeluri hidratate în soluție tampon pH 7.

**INTERPRETAREA STATISTICĂ:** Fiecare test a fost repetat de trei ori, și cu ajutorul programului de statistică Student t (Kaleida Graph) a fost determinată deviația standard, ca indicator statistic al gradului în care o valoare individuală dintr-o distribuție de valori, tinde să varieze față de media distribuției.

#### V.3.2. Rezultate și discuții

Imaginile topografice sunt prezentate în figura 106.

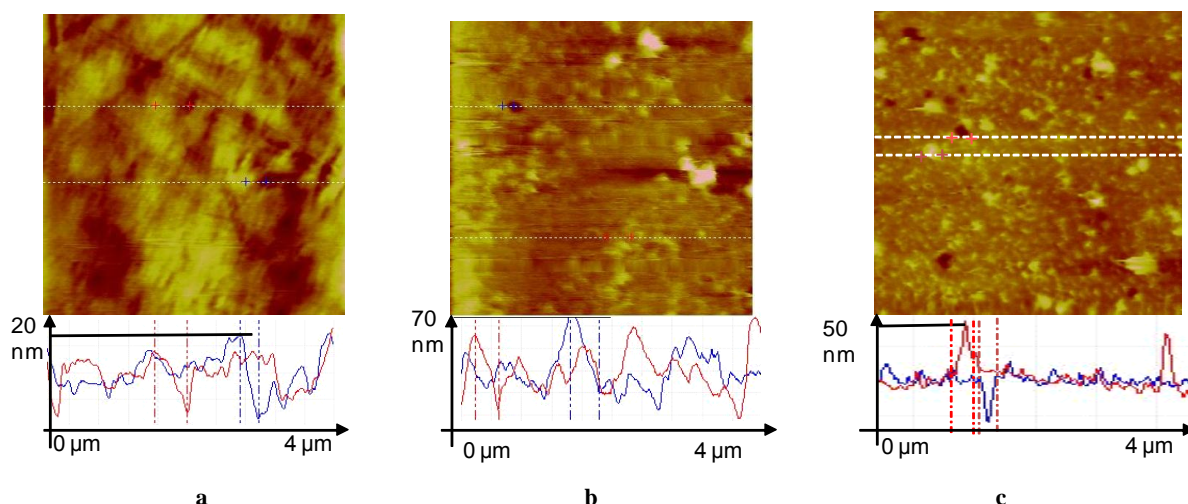


Figura 106. Topografia AFM pentru hidrogelurile:

- a) HEMA
- b) HEMA 5%AA
- c) HEMA 25%AA

Valorile rugozităților pic-la-pic sunt prezentate în tabelul 17. Se poate observa că valorile rugozităților pic-la-pic sunt mici, ca și consecință a folosirii matriței din ceramică.

Tabelul 17. Valorile rugozității pic-la-pic

Proba	Rugozitate pic-la-pic (nm)
HEMA	$\sim 15 \pm 2$
HEMA 5% AA	$\sim 50 \pm 5$
HEMA 25% AA	$\sim 25 \pm 2$

Valoarea rugozității a variat la adăugarea comonomerului de AA, nesemnălându-se o dependență liniară a caracteristicii odată cu creșterea concentrației de AA în hidrogel; adaosul de AA în hidrogel a determinat, totuși, o creștere a rugozității materialului.

## V.4. CONCLUZII

1. Caracteristica mecanică principală a cartilajului articular, coeficientul de frecare, a fost determinată pentru hidrogelurile sintetizate, atât la scără macro, cât și nano.

2. Valorile coeficienților de frecare determinați, atât la scără macro cât și nano, pentru hidrogelurile sintetizate, au valori mici de ordinul  $10^{-2}$ , de același ordin de mărime cu valoarea cartilajului articular.

3. Coeficientului de frecare a variat în funcție de structura hidrogelurilor, astfel, valoarea sa a scăzut cu creșterea gradului de umflare, deci cu adăugarea de comonomer AA. De asemenea, așa cum era de așteptat, coeficientul de frecare a fost mai mic în cazul hidrogelurilor cu rugozitate mai mare.



## CAPITOLUL VI

# STUDII CINETICE DE ÎNCĂRCARE ȘI ELIBERARE DE PRINCIPII ACTIVE ÎN/DIN HIDROGELURI P(HEMA-CO-AA)

*"Pentru a răspunde la noi întrebări, pentru a crea noi posibilități, în ceea ce privește problemele vechi, dintr-o perspectivă nouă, avem nevoie de imaginația creatoare și rezultate progresiste din domeniul științei. "*

*Albert Einstein (1879-1955)*

*"Există trei mijloace principale de obținere a cunoștințelor. . . observarea, meditația, și experimentare. Observare colectează fapte; meditația le combină; experimentarea verifică rezultatul acestei combinații."*

*Claude Bernard (1813 - 1878)*

Ingenieria tisulară a cartilajului articular presupune, pe de o parte, sinteza de matrici cu proprietăți asemănătoare cu cele ale cartilajului articular, iar pe de altă parte, datorită faptului că terapia medicamentoasă orală a condroplastiilor are multe efecte secundare, eliberarea unor principii active din aceste matrici sintetizate.

În terapia medicamentoasă, adesea sunt necesare doze repetate care să mențină nivelele de medicament în domeniu terapeutic, o risipă uneori de medicament, în cazul celor costisitoare. Pentru a garanta existența unei cantități suficiente de medicament la organul destinat, sunt necesare uneori doze crescute. Mai mult, metodele specifice de administrare (de exemplu injecțiile) pot fi neplăcute.

Cu ajutorul unor sisteme de eliberare controlată de medicament, se poate administra "țintit" un principiu activ (medicament), sau elibera controlat. Ca și suport, s-au folosit hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AA, datorită biocompatibilității lor, precum și comportamentului mecanic asemănător cu cel al cartilajului articular, făcându-le candidate ideale pentru implantul de cartilaj articular.

## VI.1. Eliberarea controlată de principii active: Generalități

Termenul de eliberare controlată se referă la sistemele de eliberare a medicamentelor care posedă un caracter efectiv, stabil și predictibil de eliberare, ce evoluează în funcție de variabilele ce guvernează sistemul receptor.

Sistemele cu eliberare controlată au apărut ca o necesitate, în obținerea unui anumit profil cinetic, la administrarea unui principiu activ (medicament) în organism sau într-un alt mediu. Metodele de preparare au la bază procese fizice simple sau reacții chimice în principal între un principiu activ și un suport polimeric, care pot fi de tip ionic sau covalent.

Realizarea unor sisteme de dozare controlată s-a dovedit a fi o necesitate evidentă a medicinei moderne, ca urmare a faptului că utilizarea medicamentelor tradiționale prezintă o serie de dezavantaje (Figura 107):

- doza clasică realizează doza terapeutică pentru o scurtă perioadă de timp, necesitând pentru realizarea tratamentului administrări repetate;
- concentrația în sânge a principiului activ nu poate fi constantă, depășind nivelul toxic al acestuia;
- resorbția neuniformă și incompletă a principiului activ;
- obișnuința la agenții patogeni.

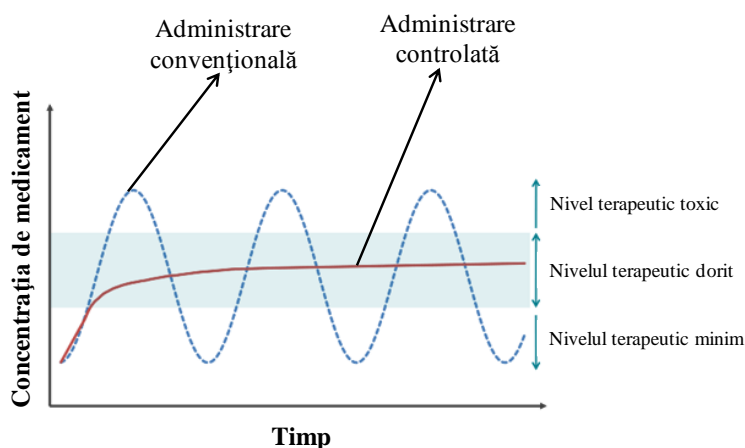


Figura 107. Tipuri de administrare a medicamentului

În timp ce majoritatea eforturilor de până acum s-au concentrat pe dezvoltarea de tratamente sistemice, aceste principii active au un risc considerabil de efecte sistemice adverse, cum ar fi efectele cardio-vasculare și efectele secundare gastrointestinale, identificate la majoritatea medicamentelor antiinflamatorii nesteroidiene (AINS) și inhibitorilor ciclooxigenazei 2 (COX-2) utilizați în tratarea durerii articulare din etapele de desfășurare a procesului inflamator (Figura 108).

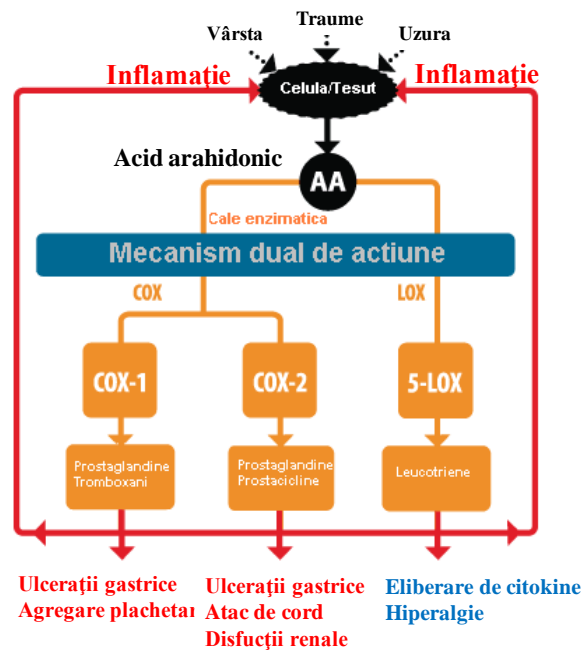


Figura 108. Etapele reacțiilor inflamatorii

Mecanismele de eliberare sunt complexe dar, pe baza modelelor cinetice simple, se pot stabili relații între viteza de eliberare și timp. Administrarea acestor sisteme se poate realiza pe aceleași căi ca și în cazul principiului activ sub formă simplă, în schimb, față de administrarea așa-zis tradițională, poate prezenta unele avantaje semnificative.

Astfel se pot evita:

- unele bariere având ca efect reducerea toxicității;
- mărirea intervalelor de administrare (reducerea dozelor);
- eliberare la țintă;
- alte căi de administrare decât cele cunoscute.

Biotehnologia poate utiliza cu succes avantajele oferite de sistemele cu eliberare controlată în cele mai diverse domenii: farmaceutic, medical etc.

În medicină și farmacie, principalele utilizări ale hidrogelurilor sunt în domeniul biosenzorilor, eliberării controlate a medicamentelor și regenerării țesuturilor și se datorează proprietăților remarcabile pe care acestea le au:

- conținutul lor de apă și elasticitatea le face similare cu țesutul natural din punct de vedere al interacțiunilor biologice la nivel molecular;
- multe hidrogeluri furnizează suprafețe inerte (pentru diversele dispozitive implantabile) care previn adsorbția nespecifică a proteinelor (antifouling);
- moleculele biologice pot fi legate covalent de hidrogeluri prin intermediul unor reacții chimice bine controlate;

- proprietățile mecanice și gradul de umflare în apă ale hidrogelurilor pot fi reglate relativ ușor, de exemplu prin modificarea densității de reticulare;
- hidrogelurile pot fi sintetizate să-și modifice proprietățile sub acțiunea unor stimuli externi, cum ar fi temperatura, pH, etc.

Datorită diverselor materiale utilizate în obținerea sistemelor de eliberare controlată și a diferitelor căi de acțiune ale acestora, este dificilă clasificarea pe baza unei singure variabile, precum: structura chimică, mecanismul de acțiune, modul de acțiune.

Din punct de vedere terapeutic, sistemele de eliberare controlată a substanțelor biologice active prezintă următoarele avantaje:

- localizarea eliberării medicamentului într-o anumită regiune a organismului, fapt ce contribuie la scăderea nivelului concentrației terapeutice;
- potențarea activității prin cuplarea mai multor unități de principiu activ, identice sau diferite, pe același polimer purtător;
- asigurarea tratamentului continuu, chiar și în timpul somnului;
- factorul economic este favorabil.

Dintre dezavantajele sistemelor de eliberare controlată :

- dificultatea de a modifica sau de a regla dozarea la perioade scurte de timp. De aceea, în majoritatea cazurilor practice, se fac observații ale răspunsului organismului la doze singulare de principiu activ după care se administrează medicamentele cu eliberare prelungită;
- efecte secundare: produsele cu eliberare prelungită nu prezintă doar efectul benefic de durată extinsă a medicamentului ci și în cazuri de hipersensibilitate a pacientului pentru o anumită medicație, efecte secundare nedorite;
- risc de toxicitate în cazul în care suportul este degradat și se produce eliberarea cvasitotală a principiului activ.

Biomaterialele/hidrogelurile care intră în structura unui sistem de eliberare controlată trebuie să îndeplinească anumite condiții:

- să fie inert din punct de vedere chimic;
- să nu conțină impurități toxice pentru organism;
- să aibă o structură fizică adecvată;
- să fie ușor de prelucrat;
- să fie degradabil sau nedegradabil în funcție de destinație și scop;
- metabolizii unui biomaterial degradabil să fie netoxici.

Pentru a analiza caracteristicile de suport pentru eliberare controlată de medicamente, hidrogelurile pe bază de HEMA și AA s-au supus testelor de încărcare și eliberare de principii biologice active utilizate în tratamentul afecțiunilor cartilajului.

### VI.1. 1. Alegerea principiului activ

Antiinflamatoriile nonsteroidiene (AINS) sunt folosite eficient în combaterea durerii, administrate pe cale generală sau topice locale. Toleranța digestivă, prezența unor afecțiuni simultane, prezența unor contraindicații și, nu în ultimul rând, experiența personală a practicianului vor determina alegerea preparatului. Dintre acestea menționăm (Tabel 18):

Tabelul 18. Tipuri de AINS folosite în tratarea patologiilor articulare

Medicament	Indicații	Contraindicații
1.Diclofenac	Artrite si osteoartrite acute si cronice si degenerescente articulare Inflamatie dureroasa posttraumatica, postchirurgicala.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• uneori greață, diaree, epigastralgie (mai ales la începutul tratamentului)</li> <li>• sângerări digestive minore, cefalee, amețeli</li> <li>• rareori afectarea ficatului cu creșterea transaminazelor, afectarea rinichiului</li> <li>• foarte rar reacții anafilactoide (comune pentru toate antiinflamatoriile nesteroidiene)</li> <li>• supozitoarele provoacă uneori iritație locală - prurit, senzație de arsură</li> </ul>
2.Ibuprofen	Artropatii inflamatorii cronice (artrita reumatoida, spondilartrita anchilozanta, artrita psoriazica)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ulcer gastric și duodenal, hepatite, angioedem</li> </ul>
3.Naproxen	Osteoartrite, gută	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ulcer gastric și duodenal</li> </ul>

	<p>artritică, artrite reumatoide, spondilite anchilozante, reumatism articular acut și alte forme de boli reumatismale, articulare și musculare. Traumatisme în sistemul osteoarticular, sciatică</p>	<p>(contraindicație relativă),</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• predispoziții hemoragice,</li> <li>• hipersensibilitate la medicament (mai rar)</li> <li>• preparatul nu se administrează copiilor sub vârsta de 5 ani. În cazul cirozelor medicamentul trebuie administrat cu precauțiune</li> </ul>
4.Meloxicam	<p>Analgezic Reduce febra Antiinflamator</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• sângerare și toxicitate la nivel gastrointestinal</li> <li>• cefalee</li> <li>• !insolubil în apa</li> <li>• !ușor solubil în acetona, etanol si methanol</li> <li>• ;solubil în dimetilformamida</li> </ul>
6.Ketoprofen	<p>Antiinflamator nonsteroidian Analgezic Antipiretic Inhibă sinteza prostaglandinelor și agregarea plachetară</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ulcer gastroduodenal în evoluție</li> <li>• Insuficiență hepatică severă</li> <li>• Insuficiență renală severă</li> </ul>
7.Indometacin	<p>Antiinflamatoar Antipiretic Analgezic</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• leziuni ulcerative gastrointestinale (ulcer gastroduodenal, colită ulceroasă, enterită regională), alergie sau intoleranță la indometacină, alte inflamatorii nesteroidiene, salicilați;</li> <li>• prudență în insuficiența</li> </ul>

		<p>renală și hepatică, insuficiența cardiacă, hipertensiunea arterială, la bolnavii cu tulburări de coagulare, la psihotici, epileptici, parkinsonieni și în prezența infecțiilor</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• supozitoarele sunt contraindicate în caz de proctită sau antecedente de proctită și de sângerări rectale recente.</li> </ul>
8. Acetaminofen (paracetamol)	Analgezic Antipiretic	<ul style="list-style-type: none"> <li>• prudență în cazul insuficienței hepatice sau renale și în hepatite</li> </ul>

Dintre toate aceste medicamente, s-a ales ibuprofenul și ketoprofenul datorită utilizării lor frecvente în tratarea patologiilor articulare și datorită unei reactivități ridicate în tratare, însă cu cele mai numeroase efecte adverse la nivelul tubului digestiv.

### VI.1.1.1. Ibuprofenul

#### STRUCTURA

Ibuprofenul este un antiinflamator nesteroidian, derivat al acidului fenilpropionic. Manifestă acțiune antiinflamatoare, analgezică și antipiretică. Ibuprofenul, acid 2-(4'-izobutilfenil)-propionic, cunoscut și sub denumirea de Nurofen, sintetizat în 1961, reprezintă un caz interesant de medicament care folosește amestecul racemic. Enantiomerul (S) este, însă, responsabil de efectele analgezice și antiinflamatoare. 50% din ibuprofenul racemic, care este enantiomerul (R) nu este complet pierdut din cauza reacțiilor enzimatiche produse în organism care îl transformă în enantiomer (S).

Acetilcoenzima-A sintetaza transformă (R)-ibuprofenul în coenzima-A, tioesterul corespunzător. Urmează racemizarea și hidroliza cu formarea (S)-ibuprofenului.

Stabilirea activității specifice a enantiomerilor din compușii medicamentoși a fost posibilă după dezvoltarea metodelor de separare și identificare a enantiomerilor. Cea mai potrivită metodă de analiză este cromatografia de lichide din cauza instabilității enantiomerilor și a riscului de racemizare la temperaturile ridicate necesare în cromatografia de gaze.

Solubilitatea ibuprofenului crește odată cu pH-ul (Figura 109) [169].

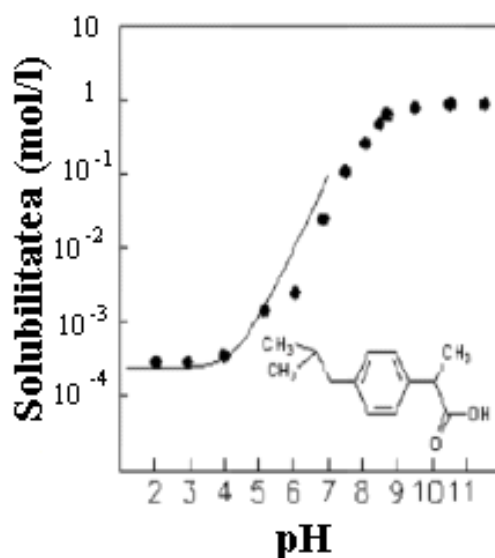


Figura 109. Curba de solubilitate a ibuprofenului în funcție de pH

### Mecanismul de acțiune

Mecanismul de acțiune este determinat de blocarea ciclooxygenazei I și II – enzima de bază a metabolismului acidului arahidonic, fiind un precursor al prostaglandinelor, care joacă un rol important în patogeneza inflamației, durerii și febrei. Acțiunea analgezică este determinată de mecanismul atât periferic, cât și central. Ca și toate antiinflamatoare nesteroidiene, ibuprofenul manifestă acțiune antiagregantă.

La administrarea internă ibuprofenul practic complet se absoarbe din tractul gastrointestinal. Consumul concomitent al alimentelor încetinește viteza de absorbție al ibuprofenului. Concentrația plasmatică maximă se realizează după 45 min - 1 oră după administrarea internă. Se metabolizează în ficat (99%). Se elimină sub formă nemodificată prin urină. Ibuprofenul complet se elimină din organism timp de 24 ore. O cantitate neînsemnată se elimină cu masele fecale. Timpul de înjumătățire din plasmă este de 1,5-2,5 ore. 80% din doză se elimină pe cale renală, preponderent sub formă de metaboliți (70%), 10% - sub formă nemodificată; 20% se elimină pe cale intestinală sub formă de metaboliți.

### Utilizarea terapeutică

Se utilizează în afecțiunile degenerative și inflamatorii ale articulațiilor și coloanei vertebrale (inclusiv artrita reumatică și reumatoidă, spondilita anchilozantă, osteoartroză), sindromul articular în acutizarea gutei, artrita psoriazică, tendinite, bursite, radiculite,

169. Avdeef A., Berger C.M., *Correlation between the acid-base titration and the saturation shake-flask solubility-pH profile methods*, *Current Pharmaceutical Research* (2000), 17: 85-89.



inflamația traumatică a țesuturilor moi și sistemului locomotor, nevralgii, mialgii, sindromul algic în infecțiile organelor ORL, anexită, algodismenoree, cefalee, odontalgii, febră în diverse infecții.

### **Farmacologia**

Doze și mod de administrare: adulților câte 400-800 mg de 3-4 ori pe zi. Doza maximă pentru adulți este de 2,4 g.

Contraindicații: Afecțiuni eroziv-ulceroase ale tractului gastrointestinal în acutizare, maladii ale nervului optic, tulburări ale hematopoezei, afectarea severă a funcției hepatice și/sau renale. Hipersensibilitate la ibuprofen.

Reacții adverse:

- Din partea tractului gastrointestinal: frecvent – greață, anorexie, vomă, senzație de discomfort în epigastru, diaree.
- Din partea sistemului nervos central: frecvent – cefalee, vertij, tulburări ale somnului, excitație, tulburări de vedere.
- Din partea sistemului hematopoetic: la administrare îndelungată – anemie, trombocitopenie, agranulocitoză.
- Din partea sistemului urinar: la administrare îndelungată – tulburarea funcției renale.

*Reacții alergice:* frecvent - erupții cutanate; rar – sindrom bronhospastic.

### **VI.1.1.2. Ketoprofen**

#### **Structura**

Ketoprofen [2-(3-benzoylphenyl)propionic acid] este un antiinflamator nesteroidian utilizat foarte frecvent în ameliorarea durerii, inflamației cauzate de diferite cauze ca osteoartrita, artrita reumatoidă, spondiloza anchilozantă sau crampe abdominale asociate menstruației.

Mecanismul de acțiune al ketoprofenului este în principal asociat cu blocarea formării unor substanțe ca prostaglandinele, mediatorii chimici necesari dezvoltării inflamației. Ketoprofenul este administrat sub formă de amestec racemic enantiomeri R și S, care sunt echivalenți. Prezintă selectivitate enantiomerică, numai enantiomerul S având activitate farmacologică. Formula moleculară este C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>, cu o masă moleculară de 254,29 g/mol.

Are un pKa de 5,94, solubil în metanol:apă (3:1) și un coeficient de partiție în n-octanol:apa de 0,97 (buffer pH 7,4). Ketoprofenul se prezintă ca fiind o pudră albă, fără miros, nehigroscopică, sub formă fin granulată, cu punctual de topire la 95°C. Este foarte

solubilă în etanol, cloroform, acetonă, eter și solubil în benzen și soluții foarte alcaline, dar practic insolubil în apă la 20°C [170, 171].

Forma convențională de dozaj al acestui medicament, administrat oral, este rapid și aproape complet absorbită în tractul gastro intestinal, atingându-se, în același timp, nivelul plasmatic dorit într-un interval de 1-3 ore [172].

Ketoprofenul reprezintă un medicament propice pentru eliberarea controlată datorită timpului de înjumătățire al eliminării plasmatice foarte mic, și o solubilitate mică în apă, în formă neionizată care îi afectează biodisponibilitatea [173].

În consecință, pentru a menține nivelul plasmatic terapeutic, formele de dozare modificate ar fi foarte benefice, permițând administrarea o singură dată a medicamentului cu consecințe îmbunătățite asupra condiției pacientului [174]. În ultimele decenii, folosirea polimerilor hidrofilii, a atras o mare atenție în tehnologia eliberării controlate a produselor farmaceutice, datorită abilității de a forma rețele în mediul apos [175].

Ketoprofenul este un analgezic folosit la reducerea inflamației articulațiilor și țesutului muscular. Este un acid slab, fiind protonat la valori mici de pH, făcându-l foarte hidrofobic și insolubil în soluțiile tampon apoase, și este ionizat la valori mari ale pH-ului, făcându-l astfel solubil în soluțiile tampon apoase. Solubilitatea în forma neutră, în apă, este de 0,014% masice [176].

Curba de solubilitate a ketoprofenului este prezentată în figura 110 [177].

170. Jamali F., Brocks D.R., *Clinical pharmacokinetics of ketoprofen and its enantiomers*, Clinical Pharmacokinetic (1990), 19(3): 197–217.

171. Solini's M.A., De la Cruz Y., Hernandez R.M., Gascon A.R., Calvo B., Pedraz J.L., *Release of ketoprofen nantiomers from HPMC K100M matrices—diffusion studies*, International Journal of Pharmaceutics (2002), 239: 61–68.

172. Parfitt K. (Eds.), *Martindale: The Complete Drug Reference*, 32th Edition., The Pharmaceutical Press, London (1999), p. 48–49.

173. Palmieri G.F., Bonacucina G., Di Martino P., Martelli S., *Microencapsulation of semisolid Ketoprofen/polymer microspheres*, International Journal of Pharmaceutics (2002), 242: 175–178.

174. Roda A., Sabatini L., Mirasoli M., Baraldini M., Roda E., *Bioavailability of a new ketoprofen formulation for once-daily oral administration*, International Journal of Pharmaceutics (2002), 241: 165–172.

175. Vueba M.L., Batista de Carvalho L.A.E., Veiga F., Sousa J.J., Pina M.E., *Influence of cellulose ether polymers on ketoprofen release from hydrophilic matrix tablets*, European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics (2004), 58: 51–59.

176. Lynch M.L., Ofori-Boateng A., Hippe A., Kochvar K., Spicer P.T., *Enhanced loading of water-soluble actives into bicontinuous cubic phase liquid crystals using cationic surfactants*, Journal of Colloid and Interface Science (2003), 260: 404–413.

177. Avdeef A., Berger C.M., *Correlation between the acid-base titration and the saturation shake-flask solubility-pH profile methods*, Current Pharmarmaceutical Resesearch (2000), 17: 85-89.

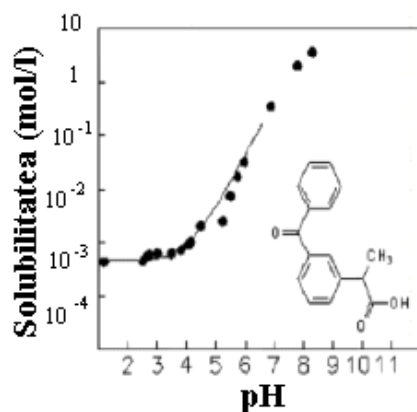


Figura 110. Curba de solubilitatea ketoprofenului în funcție de pH

### Mecanismul de acțiune

Ca toate AINS, baza fiziologică a activităților farmacodinamice a ketoprofen se presupune a fi corelată cu metabolismul acidului arahidonic [178]. Acidul arahidonic este cel mai abundent și, probabil, cel mai important dintre precursorii eicosanoidelor. Este un acid gras cu 20 atomi de carbon, acid care conține patru legături duble. Eliberarea de acid arahidonic de către fosfolipidele membranare este catalizată de activare enzimatică a fosfolipidei A<sub>2</sub>.

Acesta este apoi transformată în diverse forme de prostaglandine, inclusiv tromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), prostaglandina D<sub>2</sub> (PGD<sub>2</sub>), prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), prostaglandina F<sub>2α</sub> (PGF<sub>2α</sub>) și prostaglandina I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) prin activitatea enzimei ciclooxygenaza COX. Prostaglandinele intervin în mai multe procese, controlând contractilitatea musculaturii netede, mediază durerea și febră, reglarea tensiunii arteriale și agregarea plachetară [179, 180].

Ciclooxygenaza (COX), o prostaglandine-endoperoxide sintetază (PTGS), catalizează formarea de prostaglandine din acid arahidonic [181]. COX este o enzimă funcție dublă, atât de ciclooxygenaza cât și de peroxidază [166]. Există în principal două izoenzimele COX, COX-1 (izoenzimă constitutivă) și COX-2 (izoenzimă inductibile). Aceste izoenzime au roluri fiziologice și fiziopatologice diverse, cu diferențe importante în structura farmacologică și a profilurilor de inhibiție. Izoenzima COX-1 este esențială pentru menținerea stării

178. Kantor T.G., *Ketoprofen: a review of its pharmacologic and clinical properties*, Pharmacotherapy (1986), 6: 693-703.

179. Lee J.L., Mukhtar H., Bickers D.R., Kopelovich L., Athar M., *Cyclooxygenases in the skin: pharmacological and toxicological implications*, Toxicology and Applied Pharmacology (2003), 192: 294 - 306.

180. Vane J.R., Botting R.M., *Mechanism of action of anti-inflammatory drugs*, Scandinavian Journal of Rheumatology (1996), 25(102): 9 - 21.

181. Howard P.A., Delafontaine P., *Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and cardiovascular risk*, Journal of the American College of Cardiology (2004), 43: 519 - 525.

fiziologice normale în multe țesuturi, inclusiv rinichii, tractul gastro-intestinal și trombocite. Izoenzima COX-2 este indusă de diferiți stimuli inflamatori, inclusiv citokine, endotoxine și factori de creștere.

Ketoprofenul este unul dintre cei mai puternici inhibitori ai ciclooxigenazei în concentrații apropiate de intervalul concentrației plasmatice terapeutice (EC50 2 micrograme / l) (136). Inhibă reversibil COX acționând în competiție cu substratul, acidul arahidonic, pentru a activa complexul substrat-enzimă. Această inhibare are ca rezultat reducerea producerii de către țesut a unor prostaglandine, cum ar fi PGE2 și PGF2 $\alpha$ . În plus, față de efectele sale asupra ciclooxigenazei, ketoprofenul inhibă reacția lipoxigenazei din etapele de reacții a acidului arahidonic. Aceste etape de reacții produce acizi monohidroxiil ne-ciclici (HETE) și leucotriene. Dintre acestea, numai leucotriene (B4, C4, și D4) sunt considerate a crește permeabilitatea vasculară, cu toate acestea, ambele HETE și leucotriene sintetizate în cadrul leucocitelor sunt active în promovarea migrației și de activarea de leucocite. Sa considerat că inhibitorii lipoxigenazei pot duce la atenuarea inflamației mediată celular și întârzie astfel progresia în distrugerea țesutului inflammat la nivelul articulațiilor. Ketoprofen este, de asemenea, un inhibitor puternic de bradikinină, un mediator chimic important în durere și inflamație. Stabilizează, de asemenea, membranele lizozomale și previne eliberarea enzimelor lizozomale care mediază distrugerea țesutului în reacțiile inflamatorii.

### **Utilizarea terapeutică**

Ketoprofen este utilizat pentru afecțiunile articulare și musculo-scheletale, cum ar fi spondilita anchilozantă, osteoartrita, artrita reumatoidă și, în tulburări peri-articulare, cum ar fi bursita și tendinită. Este, de asemenea, folosit pentru dureri postoperatorii, afecțiuni dureroase și inflamatorii, cum ar fi gută acută sau în tulburări ale țesuturilor moi și pentru a reduce febra. Este, de asemenea indicat în sindromul dureros acut al umărului și artrita reumatoidă juvenilă.

Ketoprofen este contraindicat în următoarele condiții medicale:

- Bronhospasm
- Ulcerații gastro-duodenale
- Insuficiență renală severă

### **Farmacologie**

Ketoprofen este în prezent comercializat în întreaga lume într-o varietate de forme: capsule, comprimate, soluții injectabile, supozitoare și geluri (Tabelul 19) [166].

Tabel 19. Formułații de ketoprofen

Calea de administrare	Forma de dozaj	Cantitatea	
Orală	Tablete	50mg	
	Drajeuri filmate	100mg	
	Capsule		100mg
			75mg
			50mg
	Cu eliberare controlata		100mg
		200mg	
Parenterală	Intramuscular	100mg/2ml	
Rectal	Supozitoare	100mg	
Topică	Gel	2,5g/100g	

În tratamentul tulburărilor reumatice doza zilnică de ketoprofen pe cale orală este de 100 - 200 mg, în 2-4 doze divizate, formulări cu eliberare controlată, o singură dată. Unii producători sugerează doze inițiale orale de 75 mg de trei ori pe zi sau 50 mg de patru ori pe zi, apoi este crescut după cum este necesar la un maxim de 300 mg pe zi în doze divizate.

Ketoprofenul poate fi administrat, de asemenea, pe cale rectală, ca supozitoare, într-o doză de 100 mg pe timp de noapte. Uneori sunt recomandate doze zilnice combinate (pe cale orală și rectală) să nu depășească 200 mg. Ketoprofenul poate fi administrat prin injecție intramusculară în mușchiul gluteal, în cazul patologiilor acute musculoscheletale, articulare și periarticulare, dar și post operator, în urma unei intervenții chirurgicale ortopedice. Dozele de 50-100 mg pot fi administrate la fiecare 4 ore, până la o doză maximă de 200 mg în 24 de ore, timp de până la 3 zile. Ketoprofen poate fi aplicat ca gel de 2,5% (m/m) pentru ameliorarea durerii locale. Dozele variază ușor între preparate; un regim terapeutic tipic constă în administrarea de 2 sau 3 ori pe zi timp de până la 10 zile.

## **VI.2. Studii cinetice privind difuzia unor substanțe biologice active în hidrogeluri**

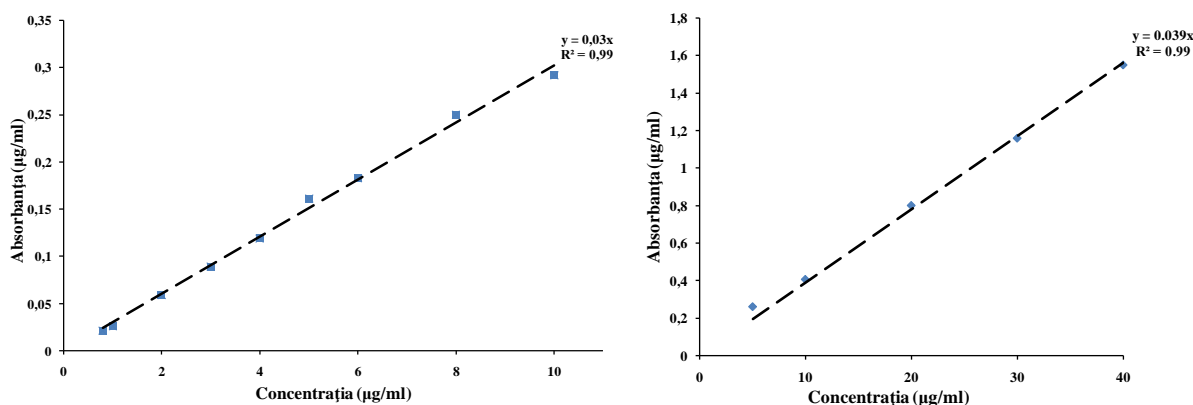
### **VI.2.1. Caracterizarea hidrogelurilor încărcate cu principii active**

#### **Stabilirea curbelor de etalonare**

S-a preparat o soluție de 2% ibuprofen sau ketoprofen în apă:etanol (1:1 v/v), atât pentru încărcarea cu medicament a hidrogelurilor cât și pentru trasarea curbei de etalonare pentru a stabili cantitatea de medicament încărcată. Ca mediu de eliberare s-a folosit soluția

tampon, TRIS 15mM pH 7,4+150 mM NaCl. Pentru curba de etalonare a ketoprofenului sau ibuprofenului în mediu de eliberare au fost preparate soluții cu concentrații între 0,8-10  $\mu\text{g/ml}$ , prin diluții succesive pornind de la 0,8  $\mu\text{g/ml}$  pentru ketoprofen, respectiv 0-40  $\mu\text{g/ml}$  pentru ibuprofen, pornind de la o concentrație de 5  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 111). Curba de etalonare sunt prezentate în figura 109 și au fost liniare pentru intervalul de concentrații studiat, cu  $r^2$  este 0,99.

Ecuția liniei de regresie este, pentru ibuprofen,  $y$  este  $0,039x$  și pentru ketoprofen,  $y$  este  $0,03x$ .



a)

b)

Figura 111. Curbele de etalonare pentru:

a) ketoprofen

b) ibuprofen

## Optimizarea condițiilor de măsurare

### Solventul

Alegerea de solvent este legată de solubilitatea substanței și de absorbția solventului la lungimea de undă analitică. Deși apa este un solvent ideal, pentru că este transparentă la toate lungimile de undă în regiunile spectrului vizibil și ultraviolet, nu poate fi folosită ca solvent pentru motivul că atât ketoprofenul cât și ibuprofenul nu sunt solubili în apă. Solvenții organici pe de altă parte sunt limitați la anumite lungimi de undă, în cazul în care solvenții sunt destul de transparenți. Alegerea solventului s-a bazat pe solubilitatea ketoprofenului sau ibuprofenului în soluții de apă:etanol (1 :1 v/v). În acest solvent maximul absorbantei este la lungimea de undă de 255 nm pentru ketoprofen și respectiv 226 nm pentru ibuprofen.

### VI.2.1.1. Încărcarea medicamentului în hidrogelurile pe baza de p(HEMA)

Hidrogelurile pe baza de HEMA și comonomer AA în stare uscată cu o masă între 0,5-1 g au fost imersate într-o soluție de medicament ketoprofen sau ibuprofen unde au fost menținute 48h. După acest interval de timp, hidrogelurile încărcate cu medicament au fost uscate, la etuvă, la 37°C, timp de 72 h. În figura 112 este prezentat schematizat procesul de încorporare a medicamentului în hidrogeluri.

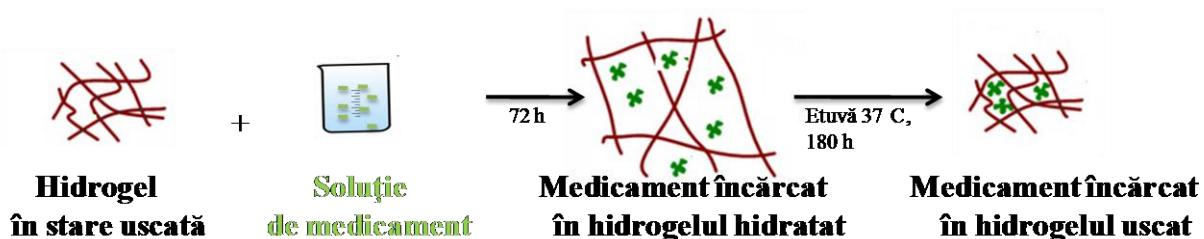


Figura 112. Schema simplificată de încorporare a medicamentului în hidrogeluri

Mecanismul de încorporare a fost unul fizic, pentru a nu schimba proprietățile mecanice ale hidrogelurilor prin modificarea gradului de reticulare sau schimbări esențiate ale proprietăților de umflare. Astfel, hidrogelurile pot fi încărcate cu medicamentele considerate, gradul de încărcare fiind dependent de solubilitatea medicamentului în mediu respectiv.

Gradul de umflare în soluția de medicament a fost dependent de concentrația de acid acrilic din hidrogeluri, crescând odată cu creșterea concentrației de acid acrilic iar cantitatea maximă de ibuprofen sau ketoprofen încorporată a fost determinată pe baza curbei de etalonare (Figurile 113 și 114).

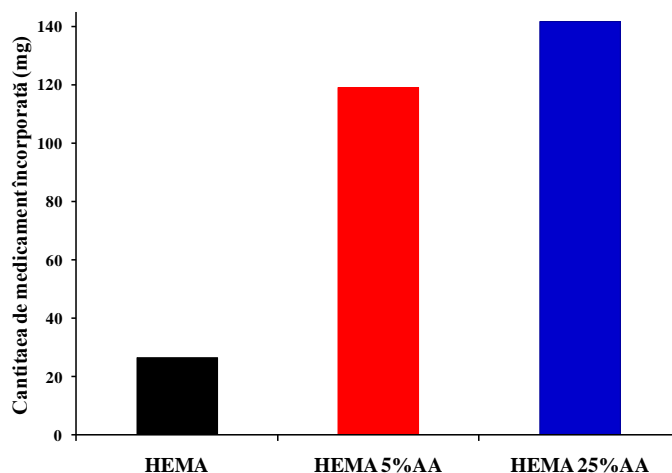


Figura 113. Gradul de încărcare maxim cu ketoprofen

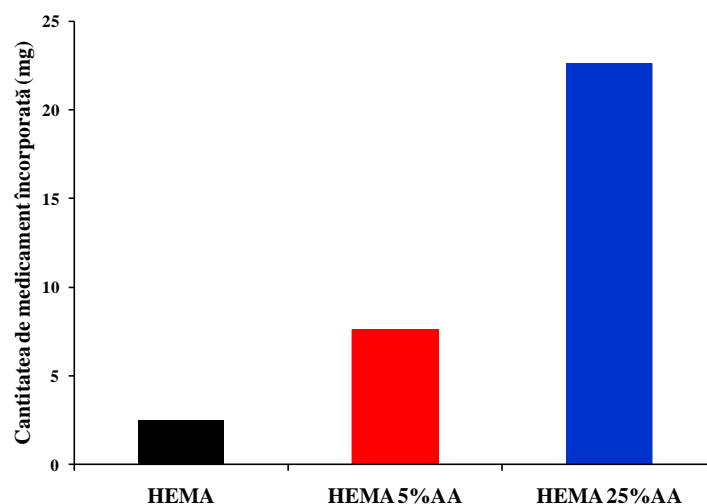


Figura 114. Gradul de încărcare maxim cu ibuprofen

### VI.3. Studii cinetice privind difuzia unor substanțe biologic active din hidrogelurile sintetizate. Model teoretic de difuzie

Schema generală de eliberare a medicamentelor încorporate în hidrogeluri este prezentată în figura 115.

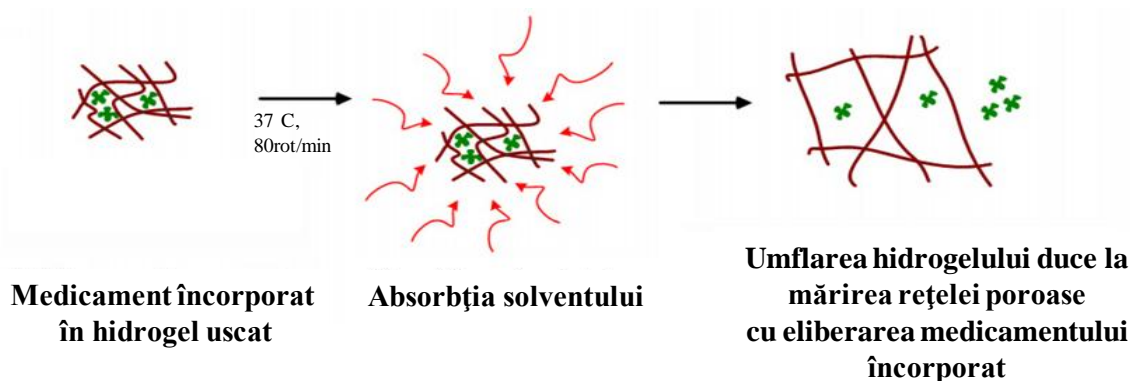


Figura 115. Schema de eliberare a medicamentului din hidrogeluri

Cinetica de eliberare a principiilor active depinde de procentul de comonomer AA din hidrogeluri, volumul molecular al medicamentului și caracteristicile de solubilitate a medicamentului în mediul de difuzie. Astfel, hidrogeluri cu o cantitate mare de AA au eliberat o cantitate mai mare de medicament. Cantitatea de medicament eliberată a fost în concordanță cu cea înglobată. Curbele cinetice de eliberare a medicamentului sunt prezentate în figurile 116 și 117.



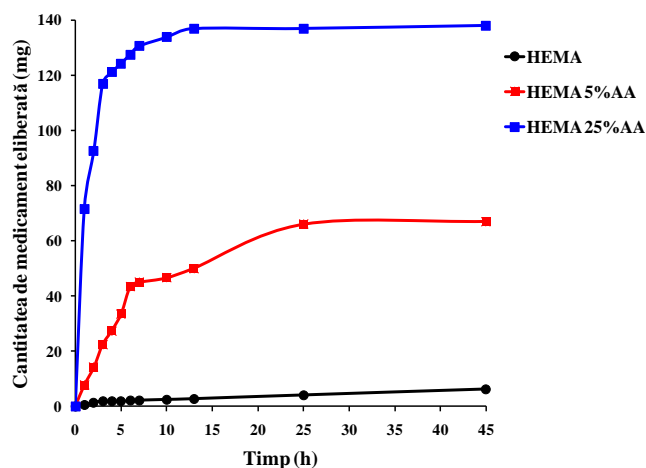


Figura 116. Curbele cinetice de eliberare a medicamentului eliberat în cazul ketoprofenului

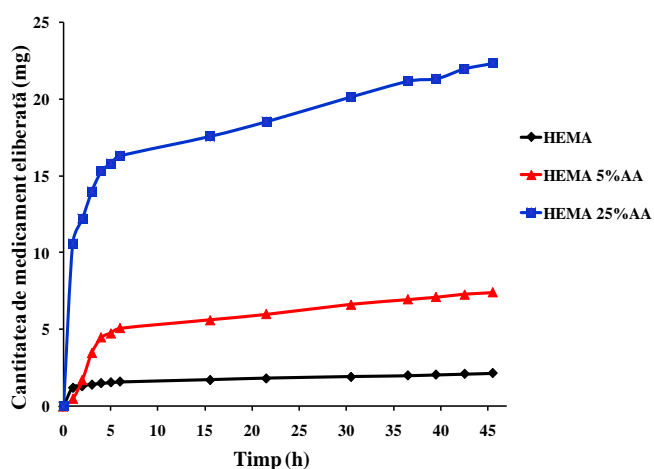


Figura 117. Curbele cinetice de eliberare a medicamentului eliberat în cazul ibuprofenului

În cazul ketoprofenului eliberarea s-a realizat în aproximativ 15 ore pentru HEMA 25%AA și 25 de ore pentru HEMA 5%AA. În cazul ibuprofenului, eliberarea s-a realizat în aproximativ 45 de ore, pentru toate hidrogelurile testate (tabelul 20).

Tabelul 20. Cantitatea de ibuprofen sau ketoprofen eliberată

Eșantion	Cantitatea de ibuprofen eliberată (mg)	Timpul (h)	Cantitatea de ketoprofen eliberată (mg)	Timpul (h)
HEMA	2,5	~45	26	~25
HEMA 5%AA	7,6	~45	118	~25
HEMA 25%AA	22,6	~45	141	~15

Hidrogelurile care conțin o cantitate mai mare de AA eliberează o cantitate mai mare de medicament. Eliberarea este corelată cu gradul de umflare la echilibru.

### VI.3.1. Modelul teoretic de difuzie

Pentru analiza eliberării *in vitro* de principii active (medicamente), se folosesc anumite modele matematice utilizate la descrierea cineticii de eliberare. Pentru acest studiu s-a ales aplicarea modelului Korsmeyer-Peppas, care, descrie eliberarea de medicamente din sistemele polimerice. Alte modele matematice ca, cinetica de ordin zero, cinetica de ordin unu, modelul Higuchi și Hixon Crowell, descriu de obicei sistemele de eliberare în care viteza de eliberare depinde de concentrația medicamentului, descrierea eliberării din matrici insolubile bazate pe un transport tip Fikian, sau, eliberarea ca rezultat al unei modificări de suprafață și a diamterului tabletelor sau particulelor [182, 183, 184, 185].

Pentru a putea afla mecanismul de eliberare, curbelor de eliberare li s-a aplicat acest model (conform ecuației descrise în capitolul II)(Figurile 116 și 117).

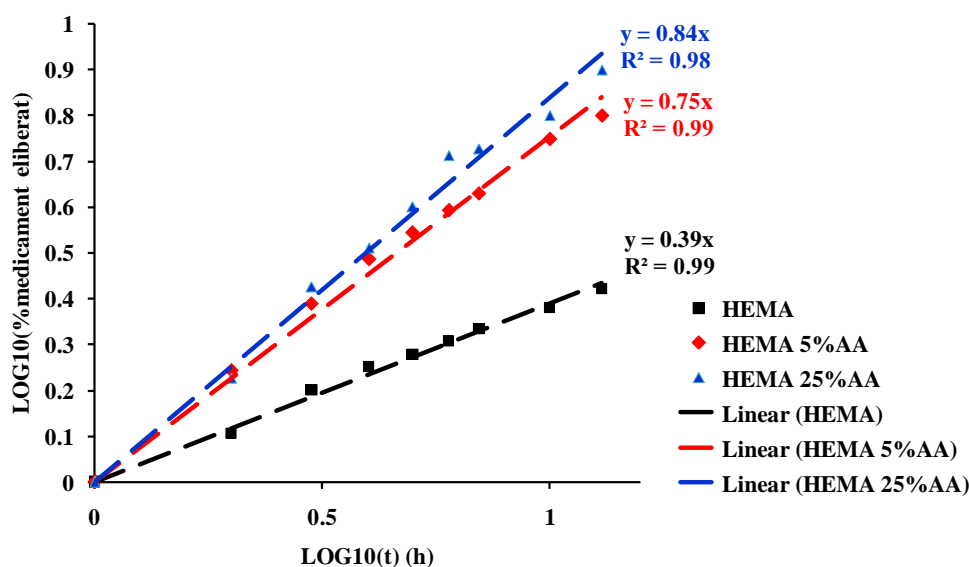


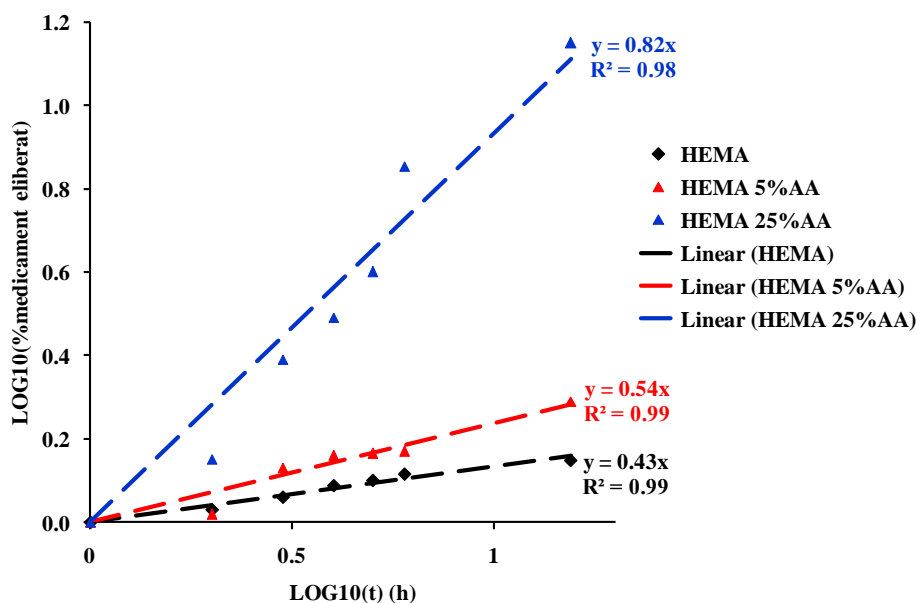
Figura 116. Modelul matematic Korsmeyer-Peppas pentru eliberarea de ketoprofen

182. Hadjiioannou T.P, Christian G.D, Koupparis M.A. and Macheras P.E., *Quantitative Calculations in Pharmaceutical Practice and Research*, VCH Publishers Inc., New York(1993), p. 345-348.

183. Bourne D.W.A., *Pharmacokinetics*, In: Banker GS, Rhodes CT, Modern Pharmaceutics, 4th ed., Marcel Dekker Inc., New York (2002), p. 67-92.

184. Higuchi T., *Mechanism of sustained action medication. Theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices*, Journal of Pharmarmaceutical Science (1963), 52: 1145-1149.

185. Hixson A.W. and Crowell J.H., *Dependence of reaction velocity upon surface and agitation (I) theoretical consideration*, Industrial Engineering Chemistry (1931), 23: 923-931.



**Figura 117. Modelul matematic Korsmeyer-Peppas pentru eliberarea de ibuprofen**

Coefficienții ( $n$ ) obținuți sunt folosiți pentru caracterizarea mecanismului de difuzie al medicamentului din hidrogeluri, astfel:

**Tabel 21. Interpretarea tipului de difuzie funcție de coeficienții de difuzie**

Valoarea coeficientului ( $n$ )	Tipul de difuzie al medicamentului
0,45	Difuzie de tip Fikian-atunci când difuzia de medicament are loc printr-un porces de difuzie molecular al medicamentului datorită unui gradient de potențial chimic.
$0,45 < n < 0,89$	Difuzie de tip non-Fikian atunci când rata de eliberare este dependentă de umflarea hidrogelului respectiv, și difuzia medicamentului în mediu de eliberare.
0,89	Cazul de transport II este asociat cu un mecanism de de transport bazat pe relaxarea lanțurilor în cazul polimerilor hidrofili.
$n > 0,89$	Cazul de super-transport II este un sistem complex de eliberare.

Au fost obținuți indici în intervalul  $0,39 < n < 0,89$ , ceea ce indică o difuzie de tip non-Fikian. Difuzia medicamentului din matricea hidrogelurilor a fost în strânsă relație cu umflarea hidrogelurilor în mediul de eliberare (Tabelul 22).

Tabelul 22. Coeficientii obtinuti în urma aplicarii modelului matematic Korsmeyer-Peppas

Proba	Ibuprofen	Ketoprofen
HEMA	0,43; r <sup>2</sup> ~0,99	0,39; r <sup>2</sup> ~0,99
HEMA 5%AA	0,54; r <sup>2</sup> ~0,99	0,75; r <sup>2</sup> ~0,99
HEMA 25%AA	0,82; r <sup>2</sup> ~0,98	0,84; r <sup>2</sup> ~0,98

## VI.4. CONCLUZII

1. Pentru a analiza caracteristicile de suport pentru eliberare controlată de medicamente, hidrogelurile pe bază de HEMA și AA s-au supus testelor de încărcare și eliberare de principii biologice active utilizate în tratamentul afecțiunilor cartilajului. Au fost realizate sisteme de eliberare controlată cu ketoprofen și ibuprofen din hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AA.

2. Caracteristicile de solubilitate a ketoprofenului și ibuprofenului a determinat adoptarea unei strategii pentru încărcarea cu medicament din amestec apă-etanol, gradul de încărcare obținut fiind în concordanță cu recomandările de concentrații descrise în specificațiile de tratament al afecțiunilor cartilajului.

3. Alegerea modelului de eliberare s-a realizat în funcție de tipul de material folosit, și anume materiale de tip polimeric, curbelor de eliberare fitându-se modelului tip putere, cu o eroare pătratică de ~0,99.

4. Difuzia medicamentului din hidrogeluri a fost datorată umflării acestora în mediul de eliberare, soluție tampon, pH 7. Eliberarea a fost dependentă de procentul de AA din hidrogeluri, iar modelul propus pentru cinetica de eliberare a fost cel descris de Korsmeyer-Peppas. Indicii obținuți, 0,39 < n < 0,89, descriu o difuzie de tip non-Fickian.

## CONCLUZII GENERALE

Proprietățile mecanice unice ale cartilajului ca suprafață portantă rezultă atât din proprietățile sale structurale cât și compoziția chimică a matricei extracelulare. Însă, numeroase patologii osteoarticulare afectează cartilajul articular, ducând la uzura acestuia. Metodele de tratament actuale (medicamente, implanturi) nu pot asigura reapararea cartilajului articular pe termen lung. Astfel, cercetătorii au găsit ca soluție ingineria tisulară. Scopul ingineriei tisulare a cartilajului articular este să se folosească celule, matrici, principii biologice active, singure sau în combinație unele cu altele, pentru a sintetiza *in vitro* un material care să fie echivalent cu cartilajul articular sănătos, atât din punct de vedere structural cât și funcțional.

Încadrându-se în contextul prezentat, lucrarea și-a propus să aducă contribuții în domeniul realizării de noi materiale polimerice pe bază de p(HEMA) cu aplicații în ingineria tisulară a cartilajului articular, cercetările efectuate permițând sistematizarea următoarelor concluzii generale:

1. Sinteza de noi hidrogelurile pe bază de p(HEMA) s-a realizat într-o singură etapă de polimerizare radicalică, într-un timp scurt, fără a necesita o aparatură complicată, precum și un cost redus. Hidrofilia a fost modificată utilizând diferiți co-monomeri cu caracter puternic hidrofil (acid acrilic-AA, acrilamidă-AAm) sau hidrofob (acrilat de etil - AE, acrilat de butil - AB), în prezența unui monomer bifuncțional cu rol de reticulant, tetraetilenglicol diacrilat (TEGDA).

2. Din analiza datelor de spectroscopie în infraroșu (spectrele FTIR) rezultă faptul că reacția de polimerizare s-a produs între componentele considerate pentru sinteză. Odată cu creșterea procentului de comonomer, se poate observa o creștere a intensității benzii –OH (~3440 cm<sup>-1</sup>), benzii corespunzătoare legăturii C este O (~1640) și a benzii caracteristice grupării metil, ceea ce confirmă faptul că copolimerul este bine prezent în structura hidrogelurile sintetizate.

3. Din rezultatele TG obținute se poate observa că hidrogelurile sintetizate au o stabilitate termică mai mare decât pentru hidrogelului p(HEMA), iar această stabilitate în general crește odată cu creșterea procentului de comonomer folosit la sinteză. Aceste rezultate sunt în concordanță cu spectrele FTIR, în care intensitatea domeniului grupelor -OH crește odată cu creșterea procentului de comonomer. Energia de activare în general crește odată cu creșterea procentului de copolimer adăugat, sugerând o îmbunătățire a stabilității termice a

hidrogelurilor. Valoarea mică a ordinului de reacție sugerează faptul că la descompunerea termică este un proces dominant fizic. Din datele de DSC s-a putut calcula valoarea  $T_g$  a hidrogelurilor. Aceasta a crescut cu adăugarea de comonomer, ceea ce ne confirmă îmbunătățirea proprietăților termice odată cu creșterea cantității de comonomer.

4. Din micrografiile ESEM se poate observa că prin copolimerizare se obține o structură poroasă bine definită față de hidrogelul HEMA. Din micrografiile SEM se poate observa o structură mai netedă odată cu adăugarea de comonomer, însă, hidrogelurile sunt sensibile la fascicolul de electroni.

5. În toate cazurile, gradul de umflare al hidrogelurilor crește cu creșterea pH-ului mediului, datorită repulsiilor electrostatice dintre formele ionizate ale grupelor carboxilice. În cazul aplicațiilor lor ca substitut de cartilaj articular, pH-ul este 7. Se observă o creștere a gradului de umflare odată cu creșterea procentului de comonomer. În cazul monomerilor hidrofobi AE și AB, datorită hidrofobicității lor, se poate observa o scădere a gradului de umflare. Se observă de asemenea că hidrogelurile HEMA 5%AA, HEMA 15%AA și HEMA 5%AAm au un comportament asemănător cu cel al cartilajului articular, în ceea ce privește această proprietate.

6. Adăugarea de comonomer a dus la creșterea valorii tensiunii superficiale, deci a fost necesară o energie din ce în ce mai mare pentru a rupe legăturile din hidrogel. Acest lucru confirmă faptul că, cu adăugarea de comonomer, legăturile de hidrogen cresc în intensitate.

Valorile unghiului dinamic, dau informații cu privire la textura suprafeței testate, dacă este omogenă sau neomogă. O suprafață omogenă este atunci când lichidul va umple toate rugozitățile de suprafață, deci va avea un histerezis mare. Valorile histerezisului au scăzut cu adăugarea de comonomer, deci, omogenitatea de suprafață a hidrogelurilor sintetizate descrește în acest sens.

7. Testele de compresiune au fost realizate pentru a evalua proprietățile hidrogelurilor sintetizate comparativ cu cele ale cartilajului articular. Hidrogelurile HEMA și HEMA cu comonomerul AA au avut un comportament asemănător cu cel al cartilajului articular, în ceea ce privește modulul elastic aparent ( $E^*$ ).

O altă caracteristică importantă a cartilajului articular o constituie proprietățile de vâscoelasticitate. Hidrogelurile sintetizate și cartilajul articular au fost testate la forfecare, determinându-se astfel modulul de forfecare ( $G^*$ ).

8. Hidrogelurile sintetizate cu comonomerul AA au avut un comportament asemănător cu cel al cartilajului articular. De aceea, în continuare, au fost selectate pentru testele următoare, pentru trei formulări:

- hidrogelul HEMA, etalonul, pentru a vedea comparativ comportamentul hidrogelurilor obținute prin modificarea acestui hidrogel;
- hidrogelul HEMA 5%AA care are un răspuns mecanic la compresiune asemănător cu al cartilajului articular;
- Hidrogelul HEMA 25%AA care are un răspuns mecanic la forfecare asemănător cu al cartilajului articular.

9. Pentru hidrogelurile selectate, datorită faptului că sinteza a fost realizată prin polimerizare radicalică, s-a pus problema omogenității de suprafață. Pentru aceasta, au fost realizate teste la scară nano, folosind microscopia de forță atomică, în aceleași condiții ca cele realizate la scară macro. Din rezultatele obținute se poate sublinia faptul că valorile modulului de elasticitate aparent obținut la scară nano sunt comparabile cu cele obținute la scară macro, cu mici diferențe datorate neomogenităților care cresc odată cu adăugarea de comonomer AA.

10. Una din cele mai importante caracteristici mecanice ale cartilajului articular o reprezintă coeficientul de frecare foarte mic dar și uzura mică, ceea ce îl face un material performant din punct de vedere tribologic. Aceasta a făcut necesară analiza hidrogelurile sintetizate și din punct de vedere al proprietăților tribologice, optându-se pentru o evaluare atât la scară macro cât și la scară nanometrică.

Coeficienții de frecare obținuți au avut valori mici de ordinul  $10^{-2}$ , comparabili cu valoarea coeficientului de frecare al cartilajului articular. Valorile obținute au fost comparabile la cele două nivele testate, macro și nano. Coeficientului de frecare a variat în funcție de structura hidrogelurilor, astfel, valoarea sa a scăzut cu creșterea gradului de umflare, deci cu adăugarea de comonomer AA. De asemenea, așa cum era de așteptat, coeficientul de frecare a fost mai mic în cazul hidrogelurilor cu rugozitate mai mare.

11. Pentru a analiza caracteristicile de suport pentru eliberare controlată de medicamente, hidrogelurile pe bază de HEMA și AA au fost încărcate și eliberare de principii biologice active utilizate în tratamentul afecțiunilor cartilajului. Au fost realizate sisteme de eliberare controlată cu ketoprofen și ibuprofen din hidrogeluri pe bază de HEMA și comonomer AA.

Caracteristicile de solubilitate a ketoprofenului și ibuprofenului a determinat adoptarea unei strategii pentru încărcarea cu medicament din amestec apă-etanol, gradul de încărcare obținut fiind în concordanță cu recomandările de concentrații descrise în specificațiile de tratament al afecțiunilor cartilajului.

Difuzia medicamentului din hidrogeluri a fost datorată umflării acestora în mediul de eliberare, soluție tampon, pH 7. Eliberarea a fost dependentă de procentul de acid acrilic din hidrogeluri, iar modelul propus pentru cinetica de eliberare a fost cel descris de Korsmeyer-Peppas. Indicii obținuți,  $0,39 < n < 0,89$ , descriu o difuzie de tip non-Fikian.



FOLIO ADMINISTRATIFTHESE SOUTENUE DEVANT L'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES  
DE LYONNOM : **BOSTAN**DATE de SOUTENANCE : **11/02/11**

(avec précision du nom de jeune fille, le cas échéant)

Prénoms : **Luciana Elena**TITRE : **Matériaux polymères avec hydrophilie contrôlée. Applications en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire**

NATURE : Doctorat

Numéro d'ordre : **2011-ISAL-0017**Ecole doctorale : **MEGA**Spécialité : **Biomécanique**

Cote B.I.U. - Lyon : T 50/210/19 /

et

bis

CLASSE :

## RESUME :

Les maladies ostéoarticulaires représentent environ 10% de l'ensemble des pathologies identifiées en France chaque année. Ces maladies inflammatoires et dégénératives des articulations sont pour la plupart consécutives au vieillissement ou à un traumatisme et évoluent vers l'usure des cartilages, d'où un handicap sévère. Comme aucun traitement ne permet la réparation totale du tissu cartilagineux, la recherche médicale développe des techniques d'ingénierie tissulaire. Ces techniques utilisent des substrats polymériques et des cellules souches qui sont « contraints » de se développer pour former du tissu cartilagineux. Cependant, ces techniques ne peuvent pas encore être utilisées à l'échelle d'une articulation complète car il n'est pas possible de reproduire ex vivo à grande échelle la structure et les propriétés mécaniques et physicochimiques du cartilage articulaire.

Dans ce contexte, les travaux de cette thèse ont permis de développer des matériaux polymères capables d'être implantés à l'échelle macroscopique dans les articulations pathologiques afin de combler l'usure des cartilages. Pour se faire, de nouveaux biomatériaux - hydrogels p(HEMA) - ont été obtenus en contrôlant le caractère hydrophile des hydrogels p(HEMA) au cours de leur synthèse chimique en présence de différents co-monomères (acide acrylique, acrylamide, acrylate d'éthylène et acrylate de butyle). Partant de là, les propriétés physicochimiques, mécaniques et tribologiques de ces nouveaux hydrogels ont été optimisées afin d'obtenir des propriétés similaires à celles du cartilage articulaire sain. Ensuite, la libération contrôlée de médicaments par ces hydrogels a été étudiée afin de minimiser les risques inflammatoires lors de leur utilisation en ingénierie tissulaire du cartilage articulaire.

MOTS-CLES : Matériaux polymères, ingénierie tissulaire, cartilage articulaire, hydrophilie contrôlée, caractérisation physico-chimique, caractérisation mécanique, tribologie, nanomécanique, nanotribologie.

Laboratoire (s) de recherche : Laboratoire de Mécanique des Contacts et des Structures (LaMCoS, INSA de Lyon, France), Département de Chimie-Physique (UTI, Iasi, Roumanie), Département des Biopolymères (UMF Iasi, Roumanie),

Directeur de thèse: **BERTHIER Yves, POPA Ionel Marcel**

Président de jury : **CASCAVAL Dan**

Composition du jury : **BERTHIER Yves, POPA Marcel, CASCAVAL Dan, DESBRIERES Jacques, MELNIG Viorel, TRUNFIO-SFARGHIU Ana-Maria**