

Universitatea din Bucuresti

Teza de Doctorat

Studii de fizica suprafetei

**in camp intens de radiatie coerenta de mare intensitate:
straturi subtiri biomimetice pe baza de fosfati de calciu
pentru aplicatii in implantologia medicala**

Doctorand

Floralice Marimona MIROIU

Conducator Stiintific

Prof. Dr. Ion N. MIHAILESCU

Cuprins

1. Introducere: Motivatie si mijloace	1
2. Materiale biocompatibile studiate in teza	5
2.1 Fosfati de calciu - 5	
2.2 Hibrizi HA-polimer maleic - 22	
2.3 Hibrid HA-fibroina - 25	
3. Metode, instalatii si conditii experimentale	41
3.1 Metode de depunere - 41	
3.1.1 Tehnica PLD	
3.1.2 Tehnica MAPLE	
3.2 Instalatii PLD si MAPLE utilizeze - 67	
3.3 Conditii experimentale de obtinere a straturilor subtiri bioactive - 71	
3.3.1 Conditii experimentale de obtinere a fosfatilor de calciu	
3.3.2 Conditii experimentale de obtinere a hibrizilor HA-polimer maleic	
3.3.3 Conditii experimentale de obtinere a hibrizilor HA-fibroina	
3.4 Metode si instalatii de caracterizare a straturilor subtiri obtinute - 82	
3.4.1 Metode si instalatii de caracterizare a straturilor subtiri de fosfati de calciu	
3.4.1.1 Teste fizico-chimice	
3.4.1.2 Teste biologice	
3.4.1.2a <i>in vitro</i> ,	
3.4.1.2b <i>in vivo</i>	
3.4.2 Metode si instalatii de caracterizare a straturilor subtiri de hibrizi HA-polimer maleic	
3.4.3 Metode si instalatii de caracterizare a straturilor subtiri de hibrizi HA-fibroina	

4. Rezultate si discutii	98
4.1 Caracterizarea straturilor subtiri de fosfati de calciu -	98
4.1.1 Analize fizico-chimice	
4.1.2 Analize biologice	
4.1.2.1 <i>in vitro</i>	
4.1.2.2 <i>in vivo</i>	
4.2 Caracterizarea straturilor subtiri de HA-polimer maleic -	116
4.2.1 Analize fizico-chimice	
4.2.2 Analize biologice <i>in vitro</i>	
4.3 Caracterizarea straturilor subtiri de HA-fibroina -	133
4.3.1 Primul set de probe	
4.3.1.1 Analize fizico-chimice	
4.3.1. 2 Analize biologice <i>in vitro</i>	
4.3.2 Al doilea set de probe	
4.3.2.1 Analize fizico-chimice	
4.3.2. 2 Analize biologice <i>in vitro</i>	
5. Concluzii	150
5.1 Concluzii referitoare la straturile subtiri de fosfatii de calciu	
5.2 Concluzii referitoare la straturile subtiri de HA-polimer maleic	
5.3 Concluzii referitoare la straturile subtiri de HA-fibroina	
6. Bibliografie	154 - 172

Capitolul 1

INTRODUCERE: MOTIVATIE SI MIJLOACE

Studiile prezentate in aceasta lucrare abordeaza tratamentul cu laser al suprafetelor metalice de titan, facand parte din domeniul mai larg al cercetarilor avansate privind dezvoltarea in scop medical de tehnici, biomateriale si produse inovative pentru cresterea calitatii vietii. Acestea marcheaza trecerea, pe parcursul ultimelor decenii, de la simpla implantare de proteze medicale mecanice metalice la solutii biologice, biomimetice: implanturi metalice acoperite cu filme subtiri biofunctionale osteoinductive [1, 2].

Mai precis, lucrarea vizeaza sinteza si caracterizarea a trei tipuri de acoperiri biomimetice pe baza de compusi de fosfati de calciu pe substraturi de titan de calitate si puritate medicala, obtinute prin procedee laser, in vederea functionalizarii implanturilor metalice medicale. Similaritatea structurii si componetiei chimice a acoperirilor nanostructurate apatitice cu tesuturile dure si procesele de dizolvare (inorganica)-reorganizare (inorganica-organica) pe care le genereaza in fluidele biologice stau la baza comportamentului osteoinductiv.

Fosfatii de calciu, in particular hidroxiapatita, au demonstrat proprietati de osteoconductivitate si capacitatea de a forma contact intim cu tesutul viu din oase si dinti [1-5]. Principalele limitari constau in dificultatea de procesare si in proprietatile mecanice slabe, ce conduc la sfaramare. A derivat de aici solutia folosirii acestor compusi in forma de straturi subtiri ce acopera suporturi de implanturi metalice, stabile si rezistente mecanic [2]. Astfel, cresterea coeziunii dintre tesutul osos si implant cu ajutorul acoperirii implanturilor cu straturi de fosfati de calciu a fost demonstrata pe deplin in ultimii ani.

Prin tehnica **depunerii cu laser in pulsuri (PLD)** au fost depuse acoperiri din fosfati de calciu biocompatibile si bioactive: **hidroxiapatita, $\text{Ca}_{10}(\text{OH})_2(\text{PO}_4)_6$** , (abr. HA), **octocalciu fosfat, $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$** (abr. OCP) sau **hidroxiapatita**

carbonatata dopata cu mangan (abr.Mn:CHA) - pe substraturi de titan de calitate si puritate medicala.

Tehnica PLD, inalt competitiva din punct de vedere al proprietatilor fizico-chimice (mecanice, de structura, stoechiometrie), dar inca neimplementata comercial, a fost permanent imbunatatita pe plan international si national [6-9]. In PLD, substanta este evaporata si transferata, prin actiunea unor pulsuri laser de energie inalta si durata scurta, (nanosecunde) dintr-o proba solidă sau lichida (tinta) pe materialul suport de interes (substrat), unde formeaza un strat subtire.

Oasele decalcificate devin flexibile, iar cele fara colagen, casante. Nanocristalele anorganice de apatita biologica sunt responsabile pentru duritate si rigiditate, iar fibrele bioorganice, aliniate de-a lungul directiilor de stres, pentru elasticitate si rezistenta [10-13]. Functionalitatea complexa a diferitelor tesuturi se sprijina pe formarea structurilor ierarhice, pe schimbarea continua de la un tip de structura sau de compositie la alta. Modelul tesutului osos cu o trecere de la o structura exterioara densa, rigida, la una interna, poroasa, demonstreaza ca adaptarea biologica se bazeaza pe gradarea functionala. Aceasta structura optimizeaza raspunsul materialului la incarcarea (tensiunea si greutatea) externa. Biomaterialele hibride din ortofosfati de calciu relevanti biologic si polimeri biocompatibili si bioresorbabili vizeaza imbunatatirea implanturilor osoase conventionale prin imitarea structurii tesuturilor calcificate si depasirea limitarilor materialelor individuale [10, 11, 14, 15].

Compozitele fosfat de calciu-polimer vizeaza in special modificarea proprietatilor mecanice in sensul intaririi structurii matriceale polimerice prin incorporarea de fosfat de calciu si au aplicatii in inlocuirea si/sau reconstructia de tesuturi [10, 11]. Aici se propune inglobarea unui procent optim de polimer intr-o matrice de fosfat de calciu (HA, in acest caz) si procesarea acestui composit in forma de film subtire (acoperiri medicale pentru implanturi inlocuind tesuturi dure).

In lucrare, accentul este pus pe **acoperirile hibride hidroxiapatita-polimer** realizate si analizate de autoare, ce constituie principalul subiect si element de noutate. Compozitele polimer-ceramica alese ca filme osteoinductive pentru acoperirea implanturilor de titan contin majoritar hidroxiapatita, principala componenta anorganica din tesutul osos. S-au adaugat polimeri biocompatibili si biodegradabili, sintetici sau naturali, precum un **copolimer al anhidridei maleice cu acetat de vinil** sau **fibroina** (principala proteina din matase), in scopul biofunctionalizarii acoperirilor si al imbunatatirii proprietatilor mecanice (in special,

de elasticitate).

Acoperirile bioactive hibride au fost obtinute prin tehnica **Depunerii cu Laser Pulsat Asistate de o Matrice, MAPLE**. MAPLE este o tehnica de depunere de filme subtiri a ultimului deceniu, care permite transferul „delicat”, cu inalta fidelitate structurala al polimerilor sau biomoleculelor [16-18]. Metoda a fost dezvoltata din PLD pentru a depasi si/sau preveni obstacolele intalnite de aceasta: descompunerea ireversibila, distrugerea sau modificarea partiala a substantelor organice (de ex. moleculele de polimeri organici). Se stie ca nu numai compozitia chimica, dar si masa, forma si dimensiunile moleculelor biomaterialelor sunt esentiale pentru conservarea functionalitatii acestora.

Studiile privind obtinerea prin tehniciile PLD si MAPLE de acoperiri osteointegratoare si osteoinductive au fost initiate in Romania, la Institutul National pentru Fizica Laserilor, Plasmei si Radiatiei (INFLPR), in Sectia Laseri, Laboratorul „Interactiuni Laser-Suprafata-Plasma“ (ILSP), de o echipa din care face parte autoarea acestei lucrari. Dupa identificarea regimurilor experimentale optime de sinteza pentru fiecare polimer, filmele subtiri depuse de fosfati de calciu bioactivi sau de composite hidroxiapatita-polimer au fost analizate din punct de vedere al proprietatilor chimice, fizice si mai ales al comportamentului biologic. Prin colaborare cu institute specializate s-au efectuat analize de culturi celulare *in vitro* si/sau *in vivo*, pentru a evalua performantele biofunctionale osteoinductive cu rol in obtinerea integritatii structurale a implanturilor si/sau a oaselor in reconstructie. A urmat selectia si evaluarea celor mai performante structuri.

Teza este structurata in cinci capitole:

- Aceasta “Introducere: Motivatie si mijloace”;
- Capitolul Doi, intitulat “ Materiale biocompatibile studiate in teza”, dedicat proprietatilor si aplicatiilor materialelor folosite in cercetarile experimentale: (orto)fosfati de calciu (hidroxiapatita, hidroxiapatita carbonatata dopata cu mangan, respectiv octocalciu fosfat) si comosite hidroxiapatita-polimer biocompatibil (HA-copolimer anhidrida maelica-acetat de vinil si HA-fibroina);
- Capitolul Trei, “Metode, instalatii si conditii experimentale” descrie metodele de sinteza si regimurile de lucru exploatate pentru realizarea

structurilor de tip implant metalic-acoperire biomimetica dezvoltate. Am introdus elemente de principiu ale metodelor de depunere cu laser in pulsuri, avantajele acestora, schemele instalatiilor. De asemenea, am enumerat succint, pentru fiecare caz in parte, metodele si instalatiile de caracterizare ale straturilor subtiri obtinute.

- Capitolul Patru, “Rezultate si Discutii”: prezinta principalele rezultate si caracteristici ale structurilor obtinute si corelarea acestora cu conditiile experimentale specifice fiecarui caz analizat;
- Capitolul final al tezei, “Concluzii”, ce cuprinde rezumatul contributiilor si realizarilor originale ale autoarei lucrarii.

Lucrarea contine anexate referinte bibliografice si copii ale articolelor relevante pentru subiectul tezei publicate de autoare.

Capitolul 2

MATERIALE BIOCOPATIBILE STUDIATE IN TEZA

2.1 Fosfati de calciu

In timp, coroziunea **implanturilor metalice**, inclusiv a celor de titan si din aliaje de titan, genereaza totusi reactii adverse locale prin eliberarea de ioni metalici [19-24]. Din acest motiv in aplicatiile medicale moderne implanturile metalice, robuste mecanic, dar ineficiente biologic pe termen indelungat, sunt **acoperite** cu straturi de substante biocompatibile sau bioactive, in special **cu fosfati de calciu**. **Fosfatii de calciu** sunt cei mai importanți constituenti ai tesuturilor dure ale vertebratelor — oase, dinti, tendoane, tesuturi cornoase — carora le ofera stabilitate, duritate si functionalitate [3, 4, 28-30].

Compozitia si structura osoasa.

Componenta anorganica majoritara a tesutului osos este **apatita biologica**, slab cristalina, aproape amorfa si nestoichiometrica, ingloband ioni substituenti, ca in CDHA, hidroxiapatita deficitara in calciu [2, 3, 12, 28-30, 44]. Ca material, osul poate fi considerat un ansamblu de nivele diferite a sapte unitati structurale ierarhice macro- micro- si nano-dimensionale [5, 12, 28-30, 45-48].

Adeseori osul este considerat un composit de origine biologica armat cu fibre, in care incluziunile dure de dimensiuni nanometrice sunt incorporate intr-o matrice moale de proteine [57]. Nanocompozitele naturale prezinta o structura mecanica generica in care nanoparticulele minerale asigura atat duritatea optima, cat si maximizarea tolerantei fata de defecte [60, 61]. **Structurarea nanodomeniilor in oase** este un proces de selectie naturala, deoarece materialele nanostructurate asigura o mai buna abilitate pentru interactiuni specifice cu proteinele [62].

2.1.3 Fosfati de calciu studiati in teza

In continuare sunt succint descrise materialele ceramice de fosfati de calciu utilizate in studiile noastre ca acoperiri cu rol de substitutie osoasa.

2.1.3.A Hidroxiapatita

Hidroxiapatita (HA) are formula chimica $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$, dar este scrisa in general ca $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ pentru a indica cele doua molecule din celula elementara [4, 26]. HA este cea mai putin solubila dintre fosfatii de calciu utilizati in medicina, asa cum reiese din scala descrescatoare a solubilizarii: MCP > TTCP > α -TCP > DCPD > DCP > OCP > β -TCP > CDHA > HA > FA [2, 4, 5]. HA este folosita ca model pentru componenta anorganica majoritara din oase si dinti. HA este larg utilizata in stomatologie si ortopedie, pentru a repara defectele osoase si ca acoperire pentru implanturile metalice [4, 5, 25, 31, 34].

2.1.3B Apatitele biologice. HA nestoichiometrica

➤ a. HA-carbonatata, HA cu alti substituenti

Conform abordarii biomimetice, un material destinat repararii sistemului scheletal trebuie sa semene cu cel natural in compositie, structura, morfologie si functionalitate.

Compozitia osoasa a majoritatii vertebratelor, indiferent de varsta, este reprezentata de formula [91] :



Cea mai importanta grupare de substitutie este carbonatul CO_3^{2-} .

HA carbonatata. Procesele de mineralizare si demineralizare ale tesuturilor dure ale vertebratelor sunt in mare masura influentate de incorporarea ionilor alcalini Na^+ si CO_3^{2-} in faza HA ce intra in componenta lor. Apatitele carbonatate prezinta un interes aparte in sistemele biologice prin componenta anorganica din oase si dinți. Concentratia masica a ionilor carbonat in tesuturile dure din corpul uman ajunge la 3-6 %.

In procesul de imbatranire, ionii carbonat, aflati in proportie redusa in tesuturile tinere, substituie ionii $(\text{HPO}_4)^{2-}$, raportul de substituire al ionilor PO_4^{3-} de catre ioni bivalenti, ramand constant [91].

➤ b HA carbonatata dopata cu mangan Mn:CHA

In studiile noastre am optat pentru doparea HA carbonatate cu mangan ca ion cu rol activ biologic. Corpul uman adult contine intre 10 si 20 miligrame de Mn, concentrat in pancreas, oase, ficat si rinichi. Manganul joaca un important rol de activator enzimatic, este

necesar pentru dezvoltarea osoasa si mentinerea oaselor puternice si flexibile, ajuta la absorbtia vitaminei B1. Mai specific, manganul divalent activeaza integrinele, receptorii care mediaza interactiunile celulelor cu matricea extracelulara si cu liganzii de suprafata [92].

In plus, compusul s-a dovedit stabil in implanturi, iar cercetari anterioare au stabilit ca o dopare cu Mn a HA conduce la o mai buna absorbtie a radiatiei laser si la imbunatatirea morfologiei suprafetei filmelor obtinute. Formarea conglomeratelor este un efect al coeficientului de absorbtie scazut al radiatiei UV de catre fosfatii de calciu. Doparea cu Mn creeaza nivele de energie in banda interzisa, formand astfel o banda de absorbtie mai larga pentru aceste lungimi de unda ale radiatiei incidente [93].

2.1.3C Octocalciul Fosfat, OCP

Alegerea **octocalciului fosfat OCP, $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$** , ca material de acoperire a implanturilor ortopedice de titan medical se datoreaza in primul rand faptului ca este un fosfat de calciu biologic. Se considera ca forma sa de sinteza, introdusa in corpul uman, ar putea da rezultate extrem de incurajatoare pentru unele clase de implanturi, cu atat mai mult cu cat este si usor resorbabil in tesuturi. In plus, *in vivo* sau in timpul depunerii prin ablatie laser, prin pierderea moleculelor de apa, OCP se poate transforma in HA, deja cunoscuta ca reprezentand o solutie bioactiva pentru implanturi.

Structura OCP consta in straturi apatitice si straturi hidratate care alterneaza. Cel mai adesea OCP se intalneste sub forma de faza intermediara in procesul de precipitare al HA si al altor apatite biologice [42] pentru ca OCP nucleaza si creste mai usor decat HA. In multe apatite biologice si in cateva HA precipitate de sinteza [4, 95-97] s-a pus in evidenta prin microscopie electronica de transmisie o incluziune centrala de OCP.

Important din punct de vedere fiziologic si patologic, OCP este prezent in tesuturile osoase premature sau in calcificari patologice, de exemplu, in calculi renali sau dentali [42, 98, 99, 101, 102].

OCP prezinta o solubilitate mai mare decat HA, care este mai stabila din punct de vedere termodinamic. O componitie suprasaturata a mediului de crestere are ca efect dizolvarea OCP ce favorizeaza precipitarea fiziologica producand HA. Descompunerea termica a OCP este foarte complexa. Durata incalzirii influenteaza adesea produsii de descompunere ai OCP.

In chirurgie OCP este utilizat in umplerea defectelor osoase [4; 103-107]. Alte date despre OCP exista in monografia [42].

In studiile noastre am urmarit crearea de implanturi funktionale biomimetice ce constau din acoperiri bioactive multistrat ale implanturilor metalice. In mod concret am vizat realizarea de straturi subtiri de fosfati de calciu resorbabili expusi contactului cu tesutul osos adjacent sau cu lichidele fiziologice si straturile subtiri de fosfati de calciu stabili (neresorbabili) sau foarte lent resorbabili plasati pe suprafata metalica a implantului (Fig 2.4).

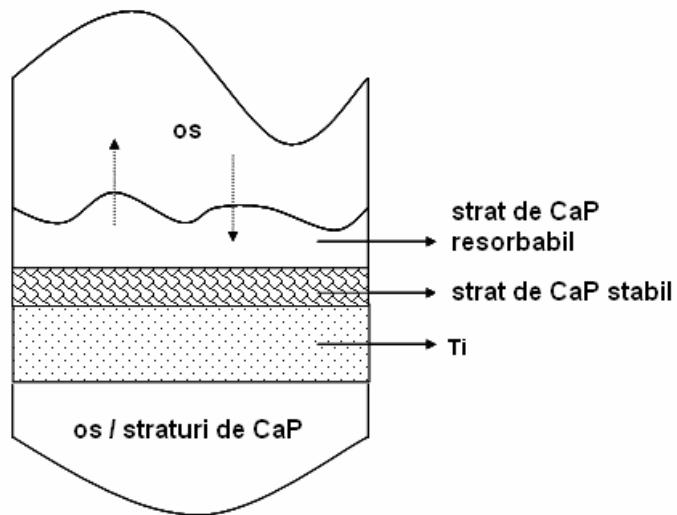


Fig 2.4 Model de implant biomimetic pe baza de titan si acoperiri de fosfati de calciu

2.1.4 Filme subtiri de fosfati de calciu – metode de obtinere

In prezent metoda comerciala de producere a acoperirilor de HA sau altor fosfati de calciu este **pulverizarea in plasma (plasma spraying)**. Aceasta tehnica este ieftina, cu rate mari de depunere si permite obtinerea de filme cu grosimea de peste 20 μm .

Principalele limitari ale metodei comerciale de pulverizare in plasma deriva din temperaturi foarte ridicate de procesare (20 000 - 30 000 K). Acestea induc descompunerea partiala a substantei (aparitia fazelor parazite) si diminuarea gradului cristalinitatii, prin topire, imposibilitatea de a adauga substantei de baza (aici, HA) dopanti organici (proteine, factori de crestere), stres rezidual la interfata film-substrat. Metoda plasma-spraying asigura grosimi ale filmelor de HA de peste 50 μm , adesea asociate cu delaminarea [1].

Diferite studii biologice pe termen scurt sau lung au indicat o osteointegrare a implanturilor acoperite prin pulverizare in plasma superioara celei specifice implanturilor neacoperite [125, 128-139]. Alte studii, semnaleaza aparitia de efecte adverse puse pe seama disparitiei partiale a acoperirii de HA [125, 140].

Există tehnici alternative de depunere de straturi subțiri de fosfati de calciu: depunerea electroforetică [141], depunerea cu fascicul ionic (ion beam deposition) [142], pulverizare magnetron de radio-frecvență (radiofrequency magnetron sputtering) [143-148], presare izostatică la temperatură înaltă [149], metode biomimetice [150], depunerea laser pulsată PLD [2 p.101-155; 151, 152], unele permitând producerea de filme mai subțiri decât cele obținute prin pulverizare în plasma. Principalele lor avantaje și dezavantaje sunt discutate în referințele [4, 152- 154].

2.1.5 Acoperiri PLD de fosfati de calciu

Metoda PLD prezintă câteva **avantaje importante pentru sinteza filmelor de fosfati de calciu**, printre care se remarcă următoarele [2. p.103]:

- Compozitie omogena si controlata. Filmele PLD se preteaza obtinerii unor gradienti de compozitie, fiind adecvate ajustarii bioactivitatii sau resorbției, pentru o potrivire cat mai buna cu dinamica cresterii osoase;
- Nu conditioneaza prelucrarea anterioara a substraturilor prin sablare pentru a asigura o buna aderență;
- Morfologia acoperirilor o urmează pe cea a substraturilor, conservand astfel o texturare sau o eventuală etapa anterioara de structurare;
- Straturile acopera uniform substraturile de titan pentru a preveni eliberarea ionilor din implant în corp. Reducerea grosimii (fata de plasma spraying), caracteristica acestor straturi, scade riscul delaminării.
- Permite depunerea de filme de fosfati de calciu pe substraturi mai sensibile termic, cum ar fi cele polimerice [2 p.150; 163, 164].

Numerosi autori au studiat depunerea filmelor de fosfati de calciu și caracteristicile acestora, fizice, chimice și mai puțin, biologice [2 p.101-155; 151, 152]. Testele *in vitro* și *in vivo* au demonstrat că PLD este capabilă să producă acoperiri aderente și să îmbunătățească osteointegrarea implanturilor în contact cu osul [159]. Avantajul filmelor subțiri ar consta în atasarea osoasă sau atasarea de suprafața metalică timpuriu, chiar dacă ulterior, în timp, acoperirea de fosfat de calciu se resorbe și efectul pozitiv se estompează [2]. În general, rezultatele testelor de evaluare *in vivo* sunt obținute după metodologii diverse și pe diferite modele animale [2, 151, 152]. Rezultatele testelor variază și în funcție de tesutul osos implicat sau de timpul de conservare a implantului, de la câteva zile, până la cîteva ani. În aceste condiții, rezultatele diferitelor studii sunt puțin convergente.

Unii specialisti consideră tehnica PLD suficient de evoluată și rodată pentru obținerea de filme subțiri de fosfati de calciu dense, aderente, cu stoichiometrie și grad de cristalinitate

bine controlate, in vederea trecerii la scara industriala, pe de o parte, si la studii clinice cu implanturi reale, pe de alta parte. Pentru a acoperi arii mai extinse sau complexe, implantul poate fi rotit sau/si translatat in interiorul unei camere de depunere industriala. Pretul in scadere al laserilor pulsati cu emisie in UV si complexitatea crescanda a instalatiilor de producere a dispozitivelor medicale, ar putea contribui la dezvoltarea acestei directii [2 p.150]. In plus, tehnica PLD permite depunerea de filme de fosfati de calciu pe substraturi mai sensibile termic, cum ar fi cele polimerice [2 p.150; 163, 164].

In Romania, in echipa din care fac parte, exista o experienta de peste 10 ani in realizarea acoperirilor de fosfati de calciu, in special HA, simpla sau dopata cu diversi ioni cu rol biologic activ sau substantive medicamentoase, pe diferite suporturi, prin **tehnici laser (PLD si MAPLE)** si studierea comportamentului *in vitro* [151-152, 164-170]. Odata stabilite regimurile experimentale de obtinere a acoperirilor bioactive de HA, studiile s-au deplasat pe optimizarea acestora cu dopanti cu rol de crestere a bioactivitatii si functionalitatii [168-170]. In capitolul urmator voi prezenta regimurile experimentale de depunere cu laser pulsat a celor doi noi compusi pe baza de fosfati de calciu, apropiati hidroxiapatitei, descrisi anterior: hidroxiapatita carbonatata dopata cu mangan si octocalciu fosfat.

2.2 Hibrizi HA-polimer maleic

Metoda de depunere MAPLE, descoperita la Naval Research Laboratory, Washington, in 1998, a fost testata prima data in Romania pentru un composit anorganic-organic, si anume HA – polimer maleic, in Laboratorul ILSP. Materialele hibride alese reprezinta o formula noua.

Copolimeri maleici

Interesul pentru **copolimerii anhidridei maleice** este intr-o continua crestere, datorita bioactivitatii si aplicatiilor de succes in diverse procese industriale [173-177] sau in medicina si farmacie, ca suport pentru eliberarea controlata de substanta bioactiva (antibiotice, anestezice si analgezice, anticancerigene [178-180, 182].

Un prim avantaj al copolimerilor anhidridei maleice $C_4H_2O_3$ ($C=OCH=CHC=O_2$) consta in sinteza lor prin tehnici convenabile din monomeri disponibili si ieftini. Acestia au structura chimica regulata, reproductibila, prezinta abilitatea de a se lega cu o varietate de compusi moleculari prin reactii blande la temperaturi scazute fara cataliza, sunt

biocompatibili, au solvabilitatea legata de pH si caracter hidrofobic variabil, depinzand de comonomer.

Copolimerul de anhidrida maleica (AM) cu acetat de vinil (AV) (Fig. 2.5) a fost propus ca material multifunctional pentru aplicatii avansate in optica si medicina [187, 188].

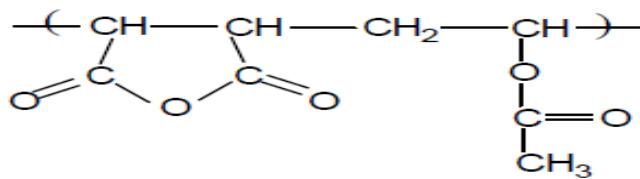


Fig. 2.5: Structura chimica a copolimerului pe baza de sare de sodiu a acidului maleic si acetat de vinil

Deoarece s-a demonstrat si rolul de modulator pentru forma si dimensiunea cristalitelor de HA [183, 194, 205] am ales copolimerul anhidridei maleice cu acetat de vinil ca partener organic in compozitul cu HA.

Hibridul HA-AM-AV a fost sintetizat hidrotermal [194] pornind de la saruri solubile de calciu si fosfat de amoniu, conform procedurii de sinteza descrise de Piticescu si colab. [203], in scopul functionalizarii *in situ* a HA.

2.3. Hibrid HA-fibroina

2.3.1. Fibroina

Proprietati, structura si compositie

Proteinele componente ale matasii formeaza matricei relativ elastice (cu structura de elice- α si/sau spirale β -turn) durificate cu inclusiuni anizotrope de nanoparticule (constituite din aglomerari de straturi- β) [207]. In acest sens, matasea naturala constituie un exemplu reprezentativ sau chiar un model pentru materialele compozite durificate cu nanoparticule.

Matasea este insolubila in majoritatea solventilor, inclusiv in apa, acizi sau baze diluate.

Matasea *Bombyx mori* e compusa din doua microfilamente de fibroina invelite de o serie de proteine hidrofile, lipicioase, toate din aceeasi familie, denumite sericine (20-310 kDa).

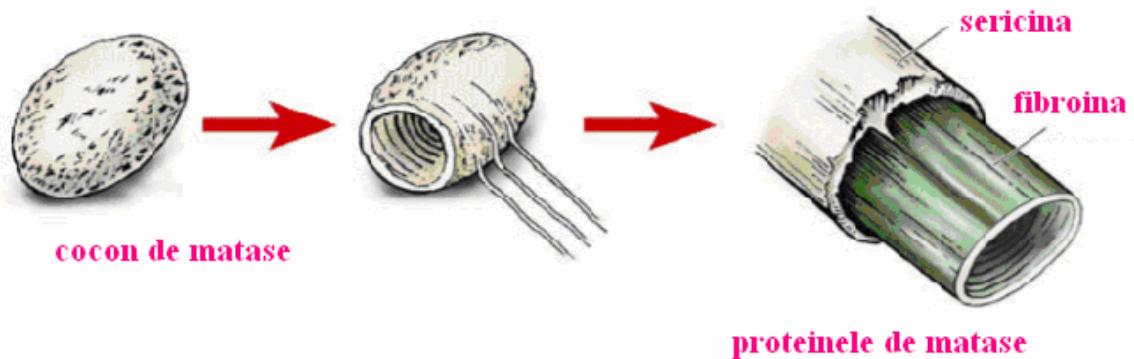


Fig. 2.6 Principalele componente ale matasii: fibroina si sericina [224]

Fibroina (in literatura engleza silk fibroin, SF), principala componenta a matasii naturale (in proportie de 70-80 %), absoarbe apa, are proprietati izolatoare, afinitate pentru vopsele, toleranta termica, abilitate de fixare a enzimelor, permeabilitate la oxigen si vaporii de apa si este bine tolerata de tesuturile biologice [209-212].

Fibroina este o proteina dura, puternic insolubila, extrasa din coconul de matase. Ea este compusa din 17 aminoacizi (Tabel 2.2). Aproximativ 90 % din componititia fibroinei o constituie aminoacizi ca glicina, alanina si serina, care prin repetitie formeaza sevenita majoritara GAGAGSGAAG[SGAGAG]₈Y (G = glicina, A = alanina, S = serina si Y = tirozina) [213, 214]. Continutul ridicat de glicina (43 %), un aminoacid de mici dimensiuni, permite impachetarea compacta, astfel incat fibrele sa fie rezistente la intindere [216].

Fibroina, filamentul interior al firului de matase, este compusa din regiuni cristaline de straturi- β inalt organizate, care contribuie la rezistenta si rigiditate [217] si regiuni semicristaline sau amorf, responsabile pentru elasticitatea matasii. Rezistenta la intindere se datoreaza interpunerii multiplelor legaturi de hidrogen. Data fiind structura de strat- β a proteinei (Figura 2.7), forta de intindere se aplica acestor legaturi de hidrogen, care nu se rup.

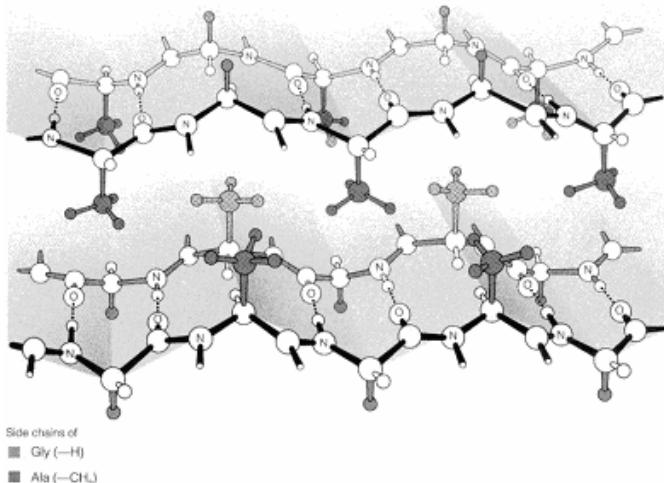


Figura 2.7 Structura de strat- β a proteinei polimer fibroina

S-au propus cateva modele pentru structura secundara a fibroinei: matase de tip I, II si III.

Tipul I contine faze elice- α (α -helix) si spirala dezordonata (random coil, r. c.) [217, 218]. Matasea de tip II are structura in strat- β antiparalel, in care lanturile polipeptidice sunt aliniate si lanturile adiacente sunt conectate prin legaturi de hidrogen ($>\text{C=O} \cdots \text{HN}<$) [218]. Gradul de cristalinitate de tip β in fibroina solida *B. mori* a fost estimat la 30-50 %. Este imposibila obtinerea de fibroina solida numai sub forma cristalizata β , din cauza prezentei in lanturile polipeptidice a aminoacizilor aromatici (tirozina, triptofan, si fenilalanina) [212]. Prin perturbatii externe ca elongatia sau incalzirea, matasea metastabila de tip I si structura de spirala dezordonata se transforma in matasea mai stabila de tip II [218, 220]. O noua forma cristalina a fibroinei *B. mori*, numita matase de tip III [218, 221] a fost constatata si identificata la interfata aer-apa, ca o structura trigonală (conformatie de lant de elice tripla).

Fibroina de matase e caracterizata de dimorfism cristalin [217]. Conformatia antiparalela cu strat- β revine fibroinei din fibrele coconului, in timp ce structura de elice- α este prezenta in solutiile apoase si in materialele de matase regenerate, cum ar fi membranele si filmele [217]. Tranzitia intre fazele α si β poate avea loc in urma diverselor tipuri de tratamente (in special termice sau in solutie de apa cu metanol) [218].

Reteaua moleculara 3D a fibroinei depinde de pastrarea unei componente de structura β (in solutia/filmul de fibroina). In functie de aplicatiile vizate, acest aspect constituie un avantaj sau un dezavantaj, prin faptul ca regiunile cristaline (strat- β) se degradeaza foarte lent [206]. Conform literaturii, *in vivo*, fibroina isi pierde majoritatea rezistentei la intindere in decurs de aproximativ un an, iar in doi ani nu mai este regasita in organism [206].

Componenta de sericina poate provoca dificultati legate de biocompatibilitate (raspuns alergic de tip I) si hipersensibilitate la matase, fiind un alergen [206, 224]. Dupa indepartarea acesteia din matase, fibroina pura nu provoaca insa reactii adverse [206, 225-228].

In concluzie, fibroina din matase detine o excelenta biocompatibilitate, bioresorbabilitate si potential inflamator foarte scazut, fiind adevarata includerii in structuri de tip schelet sau substitut in ingineria tisulara.

Din aceste motive, un material compozit HA-FIB este de asteptat sa intruneasca proprietati de bioafinitate, osteoinductivitate crescuta, suficienta rezistenta mecanica si flexibilitate.

Aplicatii ale fibroinei

Biopolimerul fibroina a inceput sa fie folosit ca biomaterial si matrice pentru aplicatii biomedicale incluzand matrici de culturi celulare [230], datorita proprietatilor mecanice neobișnuite [230], dar si ratelor mici de degradare *in vitro* si *in vivo*. Prezentand bioafinitate si permeabilitate la oxigen, fibroina cu structura in foi β (β -sheet structure) este deja utilizata ca piele artificiala, in domeniul vindecarilor ranilor si cicatricelor, pentru ligamente sau tendoane artificiale, substraturi pentru crestere celulara, tipare pentru mimarea biominalizarii [231-235].

Rezistenta la intindere, rezistenta nodurilor, elasticitatea, degradabilitatea si raspunsul imun favorabile fac ca matasea sa fie folosita cu succes pentru **suturi in chirurgia oftalmologica, neuronala, cardiovasculara**, devenind cea mai folosita fibra naturala in astfel de aplicatii [206, 236]. In cazul **ligamentelor**, rezistenta ridicata la intindere a matasii furnizeaza un avantaj important in restaurarea rapida a functiei genunchiului, o performanta greu de realizat cu fibre sintetice de colagen [237]. Si in cazul **oaselor**, sunt avantajoase biomaterialele care furnizeaza suport robust pe durata compresiei si degradabilitate lenta (pe termen lung). S-a studiat introducerea matasii in materialele pentru substituirea tesuturilor dure, fiind cunoscuta calitatea de a suporta bine compresia, generand putine crăpături, in aceleasi conditii in care alte fibre sintetice esueaza [229; 231, 232].

Fibroina poate fi procesata in forma de fibre, spuma, **filme** sau mese.

Filme subtiri

Printre metodele uzuale de obtinere de filme de proteine prin solutii se numara: simpla adsorbție [244, 245] tehnici Langmuir-Blodgett [246, 247] sau spin coating (depunere prin

centrifugare) [248], de obicei din medii apoase, atat timp cat proteinele sunt hidrosolubile. Din cauza solubilitatii reduse in majoritatea solventilor, metodele conventionale ca spin coating sau casting sunt greu aplicabile pentru prepararea filmelor subtiri de fibroina pe substraturi hidrofobe [212]. Unii autori considera tehnica PLD in particular potrivita pentru proteinele insolubile, ca fibroina de matase, care nu permit utilizarea unor metode de depunere conventionale, cum ar fi cele coloidale [249].

Studii de ablatie laser pentru depunerea de fibroina

Tsuboi si colab au realizat studii de pionierat in aplicarea PLD pentru depunerea de fibroina. [212, 250-252].

In experimentele PLD la 351 nm, structura primara a fibroinei a fost mentinuta in filmele depuse, nu si in Cele crescute cu iradiere la 248 nm. Chiar si la 351 nm structura secundara in filmele de fibroina a fost cea de tip spirala dezordonata (forma amorfă), in ciuda faptului ca tintele au constat dintr-o cantitate substantiala de fibroina aranjata in tiparul de straturi- β plasate antiparalel (forma cristalina).

Astfel, PLD in varianta clasica se dovedeste a nu fi aplicabila in prepararea filmelor de fibroina de matase cu structura cristalina β , faza preferata pentru aplicatiile in implanturile medicale si in dispozitivele bioelectronice, datorita insolubilitatii accentuate.

Ulterior, folosind faptul ca ablatia poate fi indusa eficient prin doparea cu fotosensibilizatori [253, 254] si incurajati de rezultatele anterioare in producerea de filme de polimeri (polistiren) [251], aceiasi autori au demonstrat abilitatea PLD de a depune filme proteice de fibroina continand structuri de tip straturi- β , din tinte de fibroina β dopate cu antracen [212]. Aceste studii au fost realizate, alternativ, cu un laser cu excimeri XeF ($\lambda = 351$ nm, $\tau_{FWHM} = 20$ ns), sau cu emisia corespunzatoare armonicii a treia a unui laser solid cu Nd:YAG ($\lambda = 355$ nm, $\tau_{FWHM} = 8$ ns).

Antracenul a fost introdus ca aditiv in tinta, fara a-i modifica structura cristalina- β , in proportii variabile intre 0,1 si 5 % in greutate. Aditivul are rolul de a absorbi cea mai mare parte a radiatiei laser si a o converti in energie termica, in scopul vaporizarii tintei fara a induce excitarea lanturilor peptidice (legaturile amino) din fibroina, ceea ce ar avea ca rezultat distrugerea structurii de straturi- β . Filmele subtiri de fibroina depuse prin aceasta metoda prezinta ambele structuri: spirala dezordonata si straturi- β .

Iridierea cu un fascicul laser IR poate induce degradarea fotochimica a structurii proteice intr-o masura mult mai redusa decat lumina UV sau cea vizibila. Din acest motiv Nakayama si colab. au studiat microstructura filmelor de fibroina depuse prin ablatie laser IR

(1064 nm, Nd:YAG, 5 ns, 10 Hz) [249]. Au rezultat filme subtiri de fibroina relativ uniforme ca grosime si ca dimensiune medie a unitatilor de tip insula (cele mai mici unitati proteice), sub 20 nm.

Spectrele FTIR ale filmelor prezinta maxime specifice atat structurii cristaline β , cat si celei amorse de spirala dezordonata. Pentru fluente mai mici, de 2 J/cm^2 , predomina structura cristalina β , pentru 5 J/cm^2 , structura majoritara devine cea de spirala dezordonata. Pornind de la faptul ca in filmele obtinute cu regim de lucru optimizat proportia de faza cristalina β este superioara celei din tinta, autorii presupun ca in timpul procesului PLD are loc o reconstituire a legaturilor de hidrogen.

Intr-o alta lucrare a aceluiasi grup s-a aratat ca structura secundara originala a fibroinei, de straturi- β , a fost mai bine conservata in filmele PLD depuse la 1064 nm fata de cele obtinute prin metoda chimica coloidală [257]. Tratamentul post-depunere cu metanol functioneaza pozitiv in ambele situatii, restaurand continutul structurii tip strat- β in filmele tratate.

Meritele iradierii laser IR in ingineria filmelor proteice constau in evitarea ruperii legaturilor principale din proteine si in folosirea surselor laser de tip Nd:YAG, relativ compacte si mai putin costisitoare.

2.3.2 Material Compozit hidroxiapatita-fibroina

Biocompozitul nanoHA-fibroina ca material de schelet suport pentru ingineria tisulara a fost obtinut prin liofilizare [259]. Nanocristalele aciculare de HA, preparate prin coprecipitare, au fost uniform distribuite in schelete suport poroase nano-HA/SF. Fibroina a fost prezenta in starea cristalina de straturi- β , cea care confera proprietati mecanice superioare. Testarea compatibilitatii celulare, a indicat folosirea acestor materiale pentru schelete suport nano-HA/SF ca promitatoare in ingineria tesuturilor osoase.

Alta structura de suport (scaffold) 3-D a fost dezvoltata pe baza unui compozit format din nano-apatita intr-o retea de fibroina netesuta si poroasa [260]. Reteaua de fibroina a fost mineralizata cu apatita prin scufundare alternativa in solutii de calciu si fosfat.

Bazat pe ideea unei aplicatii ca implant in inlocuirea de ligamente sau de tesut osos, matasea si hidroxiapatita au stat la baza unui biomaterial cu gradient functional biologic si mecanic [261]. O multistructura de HA-fibroina (1,6 mm, diametru 15 mm) cu gradient compozitional a fost fabricata prin sinterizare cu curent electric in pulsuri. Gradarea functionala a permis un raspuns optimizat in raport cu incarcarea externa, atat filmul de matase de la baza multistructurii, cat si cele intermediare avand rolul de a opri dezvoltarea

crapaturilor, astfel incat fracturarea materialului sa fie intarziata sau oprita. La finalul testarii, multistructura a fost capabila inca sa suporte o sarcina suplimentara peste cea maxima.

Grupuri de cercetare japoneze au obtinut cristale de HA autoaranjate de-a lungul axelor *c* formand o retea 3D cu microuritate crescuta impreuna cu fibrele de fibroina SF prin crosslinkage (legatura chimica complexa a lanturilor paralele) [262]. Legatura intre faza minerala (HA) minoritara si matricea organica (SF) a fost realizata prin modificarea chimica a suprafetei fibrelor SF cu o solutie alcalina inaintea sintezei hibridului HA-SF [263].

Prin laminare alternativa s-au depus pentru membrane bioresorbabile cu utilizari in regenerarea osoasa ghidata (GBR) filme groase, dispuse alternativ, de HA si fibroina. Multistructurile HA (3-5 μm)-SF (40-70 μm) rezultate, au fost uniforme si au prezentat compatibilitate osoasa.

Este de remarcat faptul ca nici unul dintre aceste studii referitoare la compozitele HA-SF nu se refera la filme subtiri sau acoperiri de hibrid.

In capitolele 3 si 4 se descriu experimentele noastre de depunere de filme subtiri compozite HA-FIB prin metoda MAPLE si rezultatele obtinute.

Capitolul 3

METODE, INSTALATII SI CONDITII EXPERIMENTALE

3.1 Metode de depunere, filme subtiri.

3.1.1 Tehnica depunerii cu laser pulsat (PLD)

Termenul frecvent folosit pentru expulzarea substantei sub actiunea radiatiei laser intense (fig. 3.1a) este “ablatie laser”. Acesta isi are originea in cuvantul latin “ablatum” – „luat din ceva, indepartat, plecat”. Notiunea de ablatie laser este folosit in sens larg pentru descrierea evacuarii de material provocate cu laser.

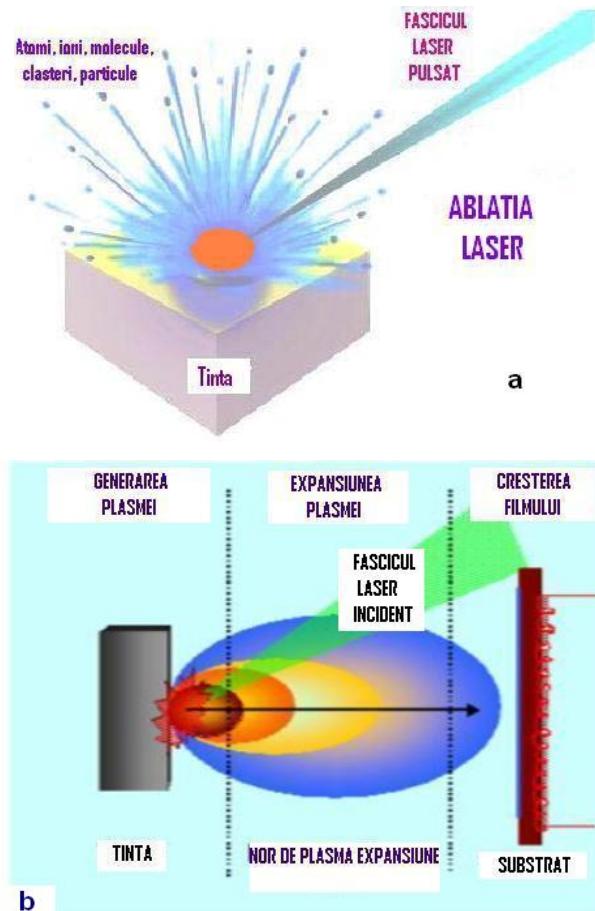


Fig. 3.1 a) Expulzarea de material prin ablatie laser b) Etapele depunerii de filme subtiri prin ablatie laser

Depunerea prin ablatie laser este o tehnica de vaporizare ce foloseste pulsuri laser de putere inalta care inlatura si transporta materialul ablat intr-o plasma luminoasa de temperatura ridicata, alungita preferential pe directia perpendiculara la suprafata (Fig. 3.1) [6-8, 267]. Plasma joaca un rol esential in metoda depunerii cu laser pulsat sau prin ablatie laser, actionand ca un “piston” care impinge substanta ablata de la tinta la colector, avand ca rezultat formarea de straturi depuse foarte aderente (Fig. 3.1b). [267].

Ablatia laser poate fi definita ca un proces de imprastiere ce conduce la ejectia de ioni, atomi, molecule si chiar clusteri de pe o suprafata (Fig. 3.1a) si care are ca efect conversia prin fotoexcitari electronice sau vibrationale in energie cinetica a particulelor [16, 268].

Acest proces este caracterizat de obicei de o *fluenta de prag* sau *prag de ablatie* F_p (J/cm^2) la depasirea caruia in material se produc modificari macroscopice [269]. Acest prag de fluanta, ca si timpul de termalizare depend de caracteristicile de material si parametrii de procesare (durata pulsului, lungimea de unda a radiatiei, etc).

Ca urmare a interactiunii laser-material, procesul de ablatie cuprinde sevante de incalzire, topire, vaporizare si ionizare a tintei; urmate de generare, absorbtie, emisie si reglare optica a plasmei [267].

Vaporizarea probei si expansiunea dinamica a plasmei se produc la o scala de timp de ordinul nanosecundelor [271-273]. Alte procese de expulzare a materialului ca exfolierea sau ejectarea de picaturi au loc intr-un interval de timp substantial mai indelungat.

In functie de procesele fizice de interactiune dintre radiatia laser si materie, se pot identifica patru clase mari de mecanisme de ablatie laser:

- i. Ablatie termica,
- ii. Ablatie electronica,
- iii. Ablatie hidrodinamica si
- iv. Ablatie prin exfoliere [274].

Depinzand de conditiile concrete de lucru, intr-un proces de ablatie laser unul sau altul dintre aceste mecanisme poate fi dominant, coexistand insa cu celelalte mecanisme care apar la o scala corespunzator mai mica.

Procesele caracteristice ablatiei laser au loc in intervale de timp esalonate pe durata mai multor ordine de marime. Ablatia incepe cu absorbtia electronica a radiatiei laser (10^{-15} s) si continua cu ejectarea de particule (10^{-6} s) pana la terminarea pulsului laser. Retinem ca:

- Timpul caracteristic de ciocniri electron-electron τ_{e-e} este de ($10^{-14} - 10^{-12}$) s;
- Timpii de relaxare electron-fonon, cu $10^{-12} \leq \tau_{e-ph} \leq 10^{-10}$ s, sunt mai mari datorita diferentelor de mase dintre ioni si electroni;
- Timpii de excitare electronica interbanda in dielectrici sunt mult mai lungi, de

10^{-12} pana la 10^{-6} s;

- Excitarile electronice localizate asociate defectelor, impuritatilor sau suprafetei pot avea timpi de viata mult mai lungi decat 10^{-6} s.

Sintetiza straturilor subtiri prin metode de depunere laser pulsata

Metoda de depunere cu laser pulsat sau depunere laser pulsata (Pulsed Laser Deposition, PLD) este larg folosita in domeniul producerii de straturi subtiri in particular din materiale si combinatii de materiale care nu pot fi procesate decat cu mari dificultati prin alte metode [9, 267]. Prin PLD au fost obtinute acoperiri de calitate inalta cu o mare varietate de proprietati speciale [6]. Principalul motiv al progresului PLD este faptul ca materialele cu componozitie oricar de complicata se pot transfera pe un substrat fara modificarea stoichiometriei (*ablatie congruenta*). Se poate asigura controlul stoichiometriei materialului depus atat in vid cat si in gaze inerte sau reactive. Se pot de asemenea obtine usor multistructuri, iar grosimea straturilor poate fi controlata cu o precizie foarte buna (0,1 nm).

Procesul de crestere al stratului subtire prin PLD se desfasoara in patru etape successive (Fig. 3.1b):

1. Actiunea radiatiei laser asupra tintei.
2. Dinamica materialului ablat – expansiunea plasmei.
3. Interactia materialului ablat cu un substrat aflat la o temperatura controlata.
4. Nucleatia si cresterea stratului pe suprafata colectorului.

Fiecare etapa este importanta pentru controlarea parametrilor acoperirilor precum stoichiometria, densitatea, cristalinitatea, uniformitatea si rugozitatea.

Datorita posibilitatilor de varietate independenta a unui numar mare de parametri, PLD este o tehnica versatila de obtinere a straturilor subtiri cu mare diversitate de caracteristici morfologice si structurale [9, 267, 293-297]. Toti parametrii pot fi controlati si variati in vederea identificarii regimului optim de obtinere a straturilor subtiri si multistructurilor. Printre principalii parametri de depunere mentionam: lungimea de unda, fluanta, frecventa laserului, durata pulsului, energia pe puls, prepararea tintei, distanta tinta-colector, temperatura substratului, aria spotului laser, geometria de depunere, natura si presiunea gazului ambiant in camera de depunere.

Atunci cand materialul ablat reactioneaza cu gazul ambiant componozitia stratului subtire depus poate fi diferita de cea a tintei. Acest caz este cunoscut in literatura ca depunerea laser pulsata reactiva (RPLD, Reactive Pulsed Laser Deposition) [267].

Pentru varierea graduala pe acelasi film a componozitiei chimice si crearea unor filme biblioteci cu gradienti de concentratie laterali si verticali, exista o noua varianta a metodei, numita PLD-

Combinatorial [9 Cap.7]. Conceptia de combinatorial in cazul materialelor reușeste o creștere impresionanta a eficienței cu care sunt descoperiti și imbunatatiti noi compusi. Într-un singur experiment pot fi sintetizate și studiate câteva mii de componențe diferite pentru obținerea proprietăților fizice dorite.

În regim de laser pulsat cu pulsuri de durată femtosecundelor, ablația laser poate fi o metodă de obținere de nanoparticule din diverse materiale [296, 297].

Creșterea straturilor subtiri prin PLD/RPLD prezintă numeroase avantaje față de alte metode:

- i) sursa de radiatie laser este exterioara incintei de depunere, oferind un grad de flexibilitate extins în folosirea materialului, în geometria aranjamentului și ajustarea parametrilor de depunere;
- ii) mare majoritate a materialelor solide pot fi ablăte și depuse prin PLD;
- iii) datorita functionarii in pulsuri a laserului, rata de crestere a stratului se poate controla cu un grad mare de precizie (de câteva fractiuni de nm);
- iv) cantitatea de material ablăt din tinta este confinată numai în volumul plasmei generate sub acțiunea pulsului laser;
- v) sub condiții optime de depunere stoichiometria stratului depus coincide cu cea a tintei chiar și pentru materiale foarte complexe și cu un grad mare de instabilitate;
- vi) energia ridicată a speciilor ablăte are ca efect obținerea unor straturi aderente, și
- vii) se pot obține specii cu stări electronice diferite de cele de echilibru și faze noi sau metastabile a materialului.

Dezavantajele metodei constau în rata mică de depunere, prezenta picaturilor și aria restrânsă de depunere (în general, de ordinul cm^2). Ultimele două inconveniente se pot diminua sau chiar elimina prin eforturi suplimentare montaje complicate [9 Cap. 9, 267, 293]. Majoritatea materialelor organice se deteriorează pe durata procesării prin expunere la radiatie UV.

3.1.2 Tehnica MAPLE

Interacțiunea laser-material și timpul de relaxare corespunzător excitării în cazul fiecarui material sunt elementele esențiale aflate la baza tehnicielor de depunere de filme subtiri cu ajutorul radiatiei laser. În principiu, există doar trei moduri de a modifica aceste fenomene/procese: prin varierea parametrilor lungimii de undă laser, a materialului sau a amandurora [16-18]. În raport cu PLD, Evaporarea Laser Pulsată Asistată de o Matrice (Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation, MAPLE) reprezintă o astfel de abordare, prin care componenția materialului tinta (de bază) este schimbată într-o manieră care să permită un proces de desorbtie bland, adecvat moleculelor fragile sau complexe, ca polimerii sau substanțe organice.

In prezenta lucrare am recurs la depunerea prin Evaporare Laser Pulsata Asistata de o Matrice ca metoda de obtinere a filmelor hibride HA-polimer si respectiv de polimer.

Generalitati

MAPLE este o tehnica de depunere de filme subtiri, dezvoltata pe parcursul ultimului deceniu, care permite transferul riguros si delicat, cu fidelitate structurala inalta, al polimerilor sau biomoleculelor. Metoda deriva din PLD pentru a depasi si/sau preveni obstacolele inerente aceasteia: descompunerea ireversibila, distrugerea sau modificarea partiala a substancelor organice/foarte complexe (precum molecule de polimeri organici) [16-18, 293, 298, 299].

Ca si in PLD, substanta este evaporata si transferata, prin actiunea unor pulsuri laser scurte de energie inalta (in general ns, dar si ps si fs), dintr-o proba solida (tinta) pe materialul suport de interes (substrat), unde formeaza un strat subtire [17, 293, 298, 299]. Fidelitatea structurala si functionala a materialului transferat este mentinuta prin intermediul unei interactii indirekte laser-material, in interiorul unei incinte vivate. Mai concret, in cazul MAPLE, la iradierea cu pulsuri laser, clusterii formati din molecule organice inconjurate de moleculele de solvent sunt expulzati catre substrat. Solventul volatil chimic inert absoarbe majoritatea energiei pulsului laser, se desoarbe treptat din amestecul ablat si este evacuat de catre sistemul de vid. Prin ciocniri cu alte molecule, moleculele organice ajung intacte pe suprafata substratului, unde formeaza un film uniform.

Principii, Mecanisme Fizice, Instalatia experimentală

Principii. Deosebirile fundamentale dintre MAPLE si PLD constau in prepararea tintei si, ca o consecinta, in mecanismele de interactie laser-substanta.

Cum am mai mentionat, in PLD din cauza distrugerii legaturilor chimice prin interactia directa laser-material, identitatea chimica a speciilor transferate este adesea pierduta si filmul este compus din specii cu greutate moleculara medie mai mica decat materialul originar. Maniera indirecta prin care procesul MAPLE transfeera energie macromoleculelor este cheia depunerii de succes, nedestructive a materialelor organice ca polimerii si biomoleculele. Contributia criogenica a prepararii tintei, pentru a asigura transferul protejat al substantei de interes.

Materialul solid (pulbere), in proportie de doar pana la 5 % procente de greutate, este dizolvat intr-un solvent (materialul matrice), iar amestecul este inghetat si mentinut la temperatura joasa (sub temperatura de topire) cu ajutorul unui dispozitiv de racire (cooler). La limita, tinta supusa iradierii laser poate fi un material compozit inghetat obtinut prin punerea in suspensie a materialului intr-un solvent volatil cu presiune mare de vaporii.

Moleculele complexe, usor destruitibile, de depus sunt inconjurate si protejate de o cantitate insemnata de matrice (solvent inghetat) (Fig. 3.4). La iradierea laser, energia fotonilor absorbita preponderent de catre solventul volatil inert se transforma in energie termica. O parte din solvent se desoarbe treptat, iar complexii formati din molecule organice inconjurate si protejate de moleculele de solvent sunt expulzati catre substrat, pe o directie normala la suprafata iradiata a tintei [17, 300]. Astfel, materialul polimeric/organic/biologic este propulsat sub protectia solventului inghetat, care este treptat vaporizat si apoi evacuat de catre sistemul de vid. Moleculele de material “fragil” primesc suficienta energie cinetica prin ciocnirile colective cu moleculele de solvent evaporate astfel incat sa poata fi transferate in faza gazoasa pe suprafata unui substrat plasat in apropierea tintei, in general paralel cu aceasta, unde prin condensare formeaza un film (cvasi)uniform. Distrugerea lor prin mecanisme termice si fotonice este astfel evitata pe durata evaporarii induse cu laser.

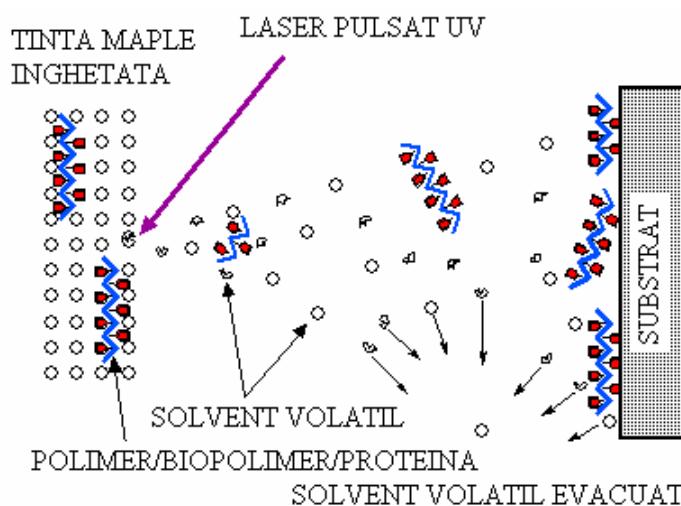


Figura 3.4 Schema mecanismelor MAPLE

Solventul trebuie riguros ales astfel incat sa indeplineasca urmatoarele conditii:

- sa absoarba puternic lungimea de unda laser;
- sa aiba un punct de inghetare cat mai ridicat;
- sa aiba presiune de vapori ridicata si volatilitate mare la temperatura camerei (pentru a fi repede evacuat din camera de depunere);
- sa nu fie chimic activ la expunerea laser;
- de maxima importanta este ca materialul activ (polimeric, organic, biologic) sa prezinte o solubilitate buna in solvent;

Intensitatatile pulsurilor laser incidente sunt ajustate in scopul reducerii, pana la eliminarea completa, a riscului de distrugere a moleculelor “fragile”. Fluenta laserilor cu emisie in UV poate fi

variata in general intre 0,1 si 1 J/cm² [18], desi pentru anumiti polimeri au fost realizate si studii cu fluente mai ridicate [301, 302].

Faptul ca substratul colector este mentinut in general la temperatura camerei face ca si coeficientul de adeziune al solventului sa fie aproape nul, determinand evaporarea si pomparea facilă a acestuia, in cazul in care ar ajunge pe substrat [17].

Ca si in PLD, procesul de depunere prin MAPLE, are loc strat cu strat, consumand solventul si solutul din tinta in aceeasi proportie a concentratiilor ca si cea a solutiei inghetate (initiale) [16, 18].

Compozitia si structura filmelor MAPLE depind puternic de solventul (matricea) ales la prepararea tintei, de concentratia substantei active, lungimea de unda a radiatiei laser folosite, de energia fasciculului laser, frecventa de repetitie, de temperatura tintei si a substratului, tipul si presiunea gazului ambiant, distanta tinta-substrat. Valoarea fluentei laser este in mod particular importanta pentru evitarea fragmentarii lanturilor polimerice. Determinarea exacta a acestei combinatii de parametri determina succesul experimentelor de sinteza MAPLE.

Performante, avantaje, aplicatii

Se pot depune filme biomoleculare active de grosimi variabile (10 nm – peste 1 µm) [17], cu control precis al grosimii de 0,1 nm/puls laser.

Rata de crestere a filmelor MAPLE poate fi variata pe intervalul a trei ordine de marime prin reglarea frecventei pulsurilor laser, a distantei tinta-substat (de obicei intre 3-7 cm), a fluentei laser, a temperaturii tintei sau a concentratiei moleculare din tinta. Alti factori care modifica rata de depunere sunt compozitia si temperatura tintei MAPLE [18].

Un aspect important il reprezinta morfologia de suprafata a filmelor obtinute prin MAPLE. In anumite conditii, ca de exemplu la rate de repetitie si fluente laser scazute, concentratii mici ale solutului in tinta si/sau temperaturi mai scazute ale tintei (matricii) este posibila producerea acoperirilor MAPLE foarte netede si uniforme [17, 18].

Metoda este unica datorita abilitatii de a imbina toate aceste atribute intr-un singur dispozitiv/procedeu/ o singura instalatie de procesare pentru fabricarea de structuri de neobtinut prin alte tehnologii.

Dezavantaje

In cele mai multe cazuri totusi morfologia de suprafata a filmelor tinde sa aiba aspect rugos si uneori pot fi prezente chiar picaturi de material. Rugozitatea filmelor nu depinde numai de conditiile de procesare, ci si de tipul de substanta polimerica sau organica ce se doreste de depus. In cazul multor biomateriale, aceasta rugozitate nu poate fi modificata din cauza aranjamentelor specifice lanturilor moleculare. Pentru unele aplicatii, cum ar fi biosenzorii, ariile extinse de suprafata rezultand dintr-o morfologie cu rugozitati pot fi favorabile datorita extinderii ariei de prindere/legare a analitului/substantei

de analizat. Aceeasi situatie se regaseste in cazul acoperirilor bioactive compozite fosfati de calciu-polimer pentru protezele ortopedice sau stomatologice metalice, dat fiind ca o suprafata usor rugoasa este recunoscuta si acceptata mai usor de celulele tesuturilor vii vecine [304].

Unele studii si simulari pretind ca depunerea de filme subtiri perfect netede si uniforme prin tehnica MAPLE este dificil de obtinut, data fiind existenta unor clastere mixte de molecule de solvent si solut ejectate in faza initiala a interactiunii laser-tinta. Aceste simulari indica de asemenea ca nu este posibila ejectarea numai a moleculelor de solut [17].

Rata de depunere este destul de mica, cu un ordin de marime mai mica decat in PLD.

Experimente MAPLE pe plan international si in Romania

Mentionam cateva exemple de transfer reusit de biomateriale in straturi subtiri prin MAPLE: fluoroalcoholpolysiloxane (SXFA), polimeri chimicoselectivi, polimeri biocompatibili (*d*- ,*l*- *lactic co-glicolid*, PGA si PLA), proteine active (insulina si HRP), nanotuburi simple (cu un singur perete, SWN), filme cu modele si structuri prestabilite (*biotinylated bovine serum albumin*, BSA), acoperiri impotriva poluarii biologice (*polimer fosfolipidic*) [17]. Cercetatorii americani de la Naval Research Laboratory au raportat transferul si depunerea de celule neuronale individuale vii si, respectiv, de structuri prestabilite din bacterii Escherichia Coli, prin MAPLE-DW [306, 307]. O serie importanta de reusite MAPLE este rezumata in Tabelul 3.1.

Incepand din 2003, experimentele MAPLE din Laboratorul “Interactii Laser-Suprafata-Plasma” din Sectia Laseri a Institutului National de Cercetare-Dezvoltare pentru Fizica Laserilor, Plasmei si Radiatiei (INFLPR), o premiera in Romania si printre primele in Europa au avut ca rezultat depunerile reusite de filme subtiri de polimeri si alte biomateriale [308]. Au fost transferate Pullulan (o polizaharida folosita in aplicatiile de cedare controlata de medicamente), nanofibre de colagen, proteine sangvine - fibrinogen si crioglobulina -, copolimeri analogi proteinelor adezive din anumite tipuri de scoici, azopoliuretan, policaprolactona, derivati de polietilen glicol, porfirina, materiale hibride biofunctionale ca hidroxiapatita cu porfirina s. a. [169, 309-326, 330] (Tabel 3.2). Si alte grupuri din INFLPR au realizat depunerile de acoperiri polimerice pentru diferite aplicatii, in special biologice [327 - 329] (Tabel 3.2).

3.2 Instalatii PLD si MAPLE utilizate

Instalatia si procedura de lucru PLD din laboratorul ILSP

Procesul si montajul general folosit in experimentele noastre **PLD** (vezi Figurile 3.6 si 3.7) sunt descrise in cele ce urmeaza:

Pentru generarea pulsurilor laser de mare stralucire s-au utilizat doua surse laser cu excimer, KrF*:



Fig. 3.6: Instalatia PLD si MAPLE din Laboratorul ILSP

- I) laser pulsat tip M 1071 ($\lambda = 248$ nm, $E < 150$ mJ, $\tau_{FWHM} \geq 7$ ns si $v < 20$ Hz);
- II) laser pulsat Lambda Physics Coherent, model COMPExPro 205 ($\lambda = 248$ nm, $E < 750$ mJ, $\tau_{FWHM} \approx 25$ ns si $v < 50$ Hz).

Fasciculul laser pulsat patrunde dupa focalizare cu o lentila de MgF_2 , printr-o fereastra de quart in camera de reactie.

Energia pulsului laser se poate regla in domeniul (50-750) mJ. Duratele pulsurilor laser au fost masurate cu ajutorul unui detector pe Si DET210 de la THORLABS si vizualizate cu un osciloscop Tektronix 350D.

Lentila cilindrica de MgF_2 depusa antireflex, avand distanta focala de 300 mm si situata in exteriorul camerei de depunere, focalizeaza fasciculul laser pe suprafata tintei. Unghiul de incidenta al fasciculului laser pe suprafata tintei a fost de 45^0 . Anterior introducerii in camera de depunere, substraturile au fost curatare cu acetona, alcool etilic si apa deionizata in baie cu ultrasunete. Procesele de incalzire si racire a substratului sunt controlate cu o panta constanta. Pentru a elimina posibilitatea oricarei contaminari si a garanta astfel puritatea gazului in timpul procesului de depunere, camera de reactie este vidata pana la o presiune reziduala de 10^{-4} Pa, cu un sistem de pompaj de vid inalt. Presiunea dinamica a gazului ambiant/reactiv a fost mentinuta constanta pe durata depunerii folosind un debitmetru de monitorizare a curgerii gazelor in conexiune cu un controler.

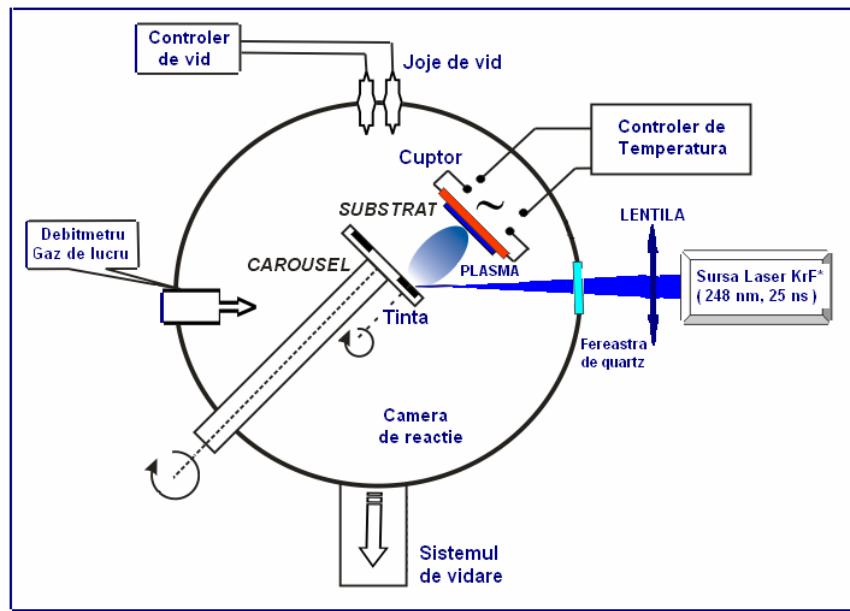


Fig. 3.7 Montajul general PLD folosit în cercetările experimentale raportate în aceasta teză

Instalatia si procedura de lucru MAPLE din laboratorul ILSP

Schema instalatiei experimentale MAPLE (Fig. 3.6) este prezentata in Figura 3.9.

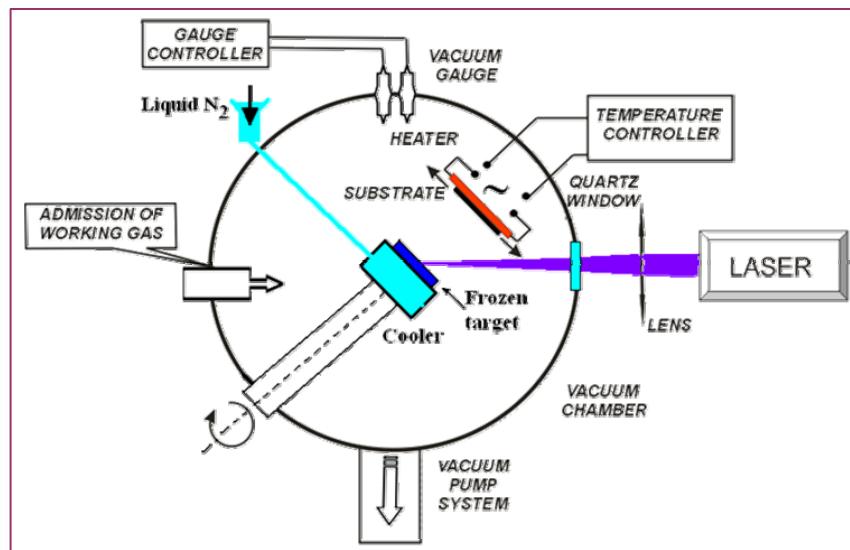


Figura 3.9 Reprezentare schematică a instalației experimentale MAPLE din laboratorul ILSP

Metodologia depunerilor MAPLE este aceeasi ca cea descrisa anterior pentru acoperirile PLD. Directionarea fasciculului laser UV pulsat se face insa catre tinta compozita criogenica. Tinta consta din substanta de interes biologic de transferat (polimer, proteina) dizolvata in matricea de solvent corespunzator.

. Solutia rezultata este turnata in suporturi speciale de otel (cu diametrul interior de ordinul cm-ilor (in cazul nostru, 50 mm) si inaltimea de ordinul mm-ilor (6 mm)) si este transformata prin inghetare in tinta MAPLE solida. Procesul criogenic este indus prin imersarea in azot lichid (77 K) si este mentinut prin contact direct cu un dispozitiv de racire (cooler). In acest fel vaporizarea rapida a tintei MAPLE in interiorul camerei de depunere este mult incetinita.

Colectorii pe care sunt depuse filmele subtiri sunt placute de dimensiuni, forme si compositii adecvate fiecarei aplicatii/analize (de exemplu, titan, siliciu, quart) montate pe suporturi de molibden situate paralel in fata tintei, la distante reglabile (de cativa cm), cu sau fara masca plasata in fata substratului. Masca sau diafragma de molibden folosita pentru centrarea depunerii poate fi in contact sau nu cu substratul ce urmeaza a fi acoperit.

Inainte de a initia depunerea laser propriu-zisa, camera de iradiere este evacuata la o presiune reziduala in jur de 10^{-4} Pa. Dupa stabilizarea acestui regim de vidare, in camera de depunere se poate asigura un vid slab de ordinul a cativa Pa sau circulatia unui flux de azot cu o presiune dinamica de (15 – 30) Pa, cu rol de termalizare a particulelor/moleculelor ablative, in scopul obtinerii unor filme cat mai omogene.

3.3 Conditii experimentale de obtinere a straturilor subtiri bioactive

Toate straturile subtiri sintetizate in experimentele prezentate in teza in subcapitolul 3.3 au fost obtinute utilizand facilitatile de depunere laser pulsata din laboratorul ILSP, INFLPR (descrise in sectiunea 3.2 si prezentate in figurile 3.6, 3.7, 3.9).

Prin testari succesive s-a obtinut optimizarea acoperirilor astfel incat acestea sa fie adaptate studiilor biologice. Regimurile de depunere si de tratamente post-depunere sunt rezumate in tabele.

3.3.1 Conditii experimentale de obtinere a fosfatilor de calciu

Ca substraturi am utilizat placete de Si monocristalin (100), pentru unele analize, si discuri de titan medical (puritate inalta 99,7%), polisate mecanic sau corodate chimic, pentru depunerile propriu-zise si restul analizelor. Fiecare colector a fost curatat intr-o baie cu ultrasunete.

Am utilizat sursa laser excimer UV KrF* cu pulsuri laser $\tau_{FWHM} = 7$ ns, $\lambda = 248$ nm, succedute cu o frecventa de repetitie de 2 Hz. Initial incinta de depunere a fost vidata pana la 10^{-4} Pa. Colectorii au fost plasati paralel cu tinta la o distanta de 4-5 cm (Fig. 3.1, 3.7, 3.10).

Structurile OCP au fost depuse in flux de vapori de apa la diferite presiuni in domeniul (3 - 8) $\times 10^{-3}$ Pa. Vaporii de apa s-au introdus pe toata durata depunerii, in vederea compensarii pierderii moleculelor de apa caracteristice structurii OCP. Pe durata depunerii, temperatura substratului a fost

mentinuta la una din valorile de 200°C, 180 °C, 150 °C, 100 °C, si respectiv la temperatura camerei, iar tintele au fost permanent rotite cu 0,04 Hz.

Depunerile de Mn:CHA au fost optimizate in atmosfera imbogatita cu O₂ la o presiune de 13,3 Pa (0,1 torr). Fluenta laser incidenta a fost variata intre 1,5 - 2 J/cm². Pe toata durata depunerii tintele au fost rotite cu o frecventa de 0,4 Hz pentru a se evita perforarea. Temperatura de incalzire a substratului a fost mentinuta pe toata durata depunerii la 300 °C, 400 °C si respectiv 450 °C.

Pentru toate tipurile de fosfati de calciu, probele au fost racite treptat cu o panta de 6°/ min, meninand constanta presiunea in camera.

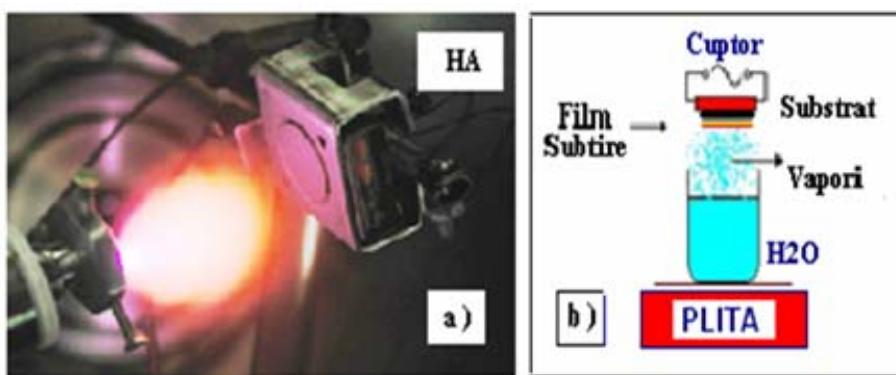


Fig. 3.10 Imagine a plasmei de ablatie in timpul depunerii (a); Schema montajului tratamentului termic postdepunere (b)

Dupa depunere, am efectuat un tratament termic timp de 6 ore in flux de vapori de apa fierbinti (Tabel 3.3 si Figura 3.10 b). Pe durata tratamentului colectorul acoperit cu OCP a fost mentinut la 200°C, 180°C, 150°C, 100°C sau la temperatura camerei (RT), aceeasi ca pe durata depunerii filmului.

Toate structurile obtinute au fost supuse tratamentelor termice post-depunere, la aceeasi temperatura ca pe durata cresterii filmului, timp de 6 h in flux de vapori de H₂O, in scopul reconstituirii moleculelor H₂O / OH si al imbunatatirii cristalinitatii.

In aceleasi conditii experimentale ca cele ale acoperirilor de Mn:CHA s-au depus, pentru comparatie, acoperiri de HA pura (comerciala, marca OsProVit).

3.3.2 Conditii experimentale de obtinere a hibrizilor HA-polimer maleic

Cercetarile privind obtinerea prin MAPLE de acoperiri hibride organic-inorganic (polimer - fosfat de calciu) s-au realizat in Romania pentru prima data in laboratorul ILSP, INFLPR in cadrul contractului de cercetare CEEX 46/2005, ReteBetaDent, la care am participat ca membru.

Copolimerul ales ca substanta organica in fabricarea compozitelor hibride este copolimerul alternativ 1:1 maleat de sodiu - acetat de vinil NaM–VA, obtinut din copolimerul anhidrida maleica – acetat de vinil AM-AV. In referirele ce urmeaza notatia pentru (acest) copolimer va fi MP.

Pentru unele experimente MAPLE am folosit ca solvent doar apa distilata (97 %) si ca substanta activa un amestec de pulbere hibrida de HA (80 procente de greutate din pulberea hibrida) si MP (20 procente de greutate). In urmatoarele experimente dizolvarea in apa distilata a materialului compozit HA (80 % w.p.) – MP (20 % w. p.) a fost completata de adaugarea unei substante dispersoare (Duramax sau izopropanol) pentru stabilizarea suspensiei coloidale. In varianta de solvent apa distilata cu dispersant, am variat raportul dintre cele doua componente ale hibridului HAP-polimer, testand si proportia concentratiilor HAP 90% - polimer 10%.

Au fost realizate doua seturi de probe, in doua etape. Tabelele 3.4 - 3.5 se refera la compozitiile exacte ale solutiilor/suspensiilor coloidale din care au fost obtinute filmele si la conditiile lor de depunere MAPLE.

Tabel 3.4 Solutii de HA- polimer: concentratii, dispersant

Filme	Cod, Polimer	Conc. pulbere HA-MP	Conc. dispersant	Vol. suspensie	pH
HA+MP1	P1HPA18, AV 98.2	0,2 %,	5% Izopropanol	100 ml	9,85
HA+MP2	P1HPA18, AV 98.2	1 %	0.6% Duramax	200 ml	8,27

Tabel 3.5 Filme HA-polimer depuse prin MAPLE – conditii experimentale

Cod filme	Subst. tinta	Substrat	Pres., Pa	Fluenta. J/cm ²	Temp. Substrat, °C	D _{t-s} , cm	Nr. pulsuri
Ti-HA+MP1	HA+MP, 0,2 %	Ti, Si	13 N ₂	0,7	30	3	20 000
Ti-HA+MP2	HA+MP, 1 %	Ti, Si	13 N ₂	0,7	30	3	20 000
Ti-HA	s. a. HA	Ti	5,33 vap. H ₂ O	0,55	30	4	25 000
Ti-MP	s. a. MP	Ti	5,33 vap. H ₂ O	0,55	30	4	25 000
Ti-HA+MP	s. a. HA+MP, 1 %	Ti	5,33 vap. H ₂ O	0,55	30	4	25 000

Pentru mentinerea omogenitatii si stabilitatii solutiilor/suspensiilor primite inainte de inghetare, acestea au fost agitate mecanic la turatii corespunzatoare, zilnic si inaintea experimentelor de depunere. Tintele solide au fost obtinute prin inghetarea solutiilor/suspensiilor apoase in azot lichid

si mentinerea, pe durata depunerii, la temperaturi sub punctul de topire, cu ajutorul unui dispozitiv de racire „home-made”.

Evitarea posibilelor neuniformitati ale filmelor, cauzate de erodarea inegală, a fost asigurata prin rotirea permanenta a tintelor, in timpul depunerii.

Calitatile filmelor depuse au fost testate prin analize fizico-chimice si *in vitro* prin teste avansate de biocompatibilitate si bioactivitate, de catre Institutul de Biochimie al Academiei Romane (IBAR).

3.3.2 Conditii experimentale de obtinere a hibrizilor HA-fibroina

Polimerul, pulbere de fibroina cu granulatia de 2 microni, provenind din matase degumata (fara sericina), a fost cumparat de la un furnizor de profil din China. Pulberea de hidroxiapatita (HA) a fost achizitionata de la firma Merck.

Realizarea solutiilor polimer (fibroina)-hidroxiapatita pentru tinte MAPLE

Pentru experimentele de depunere MAPLE am preparat diverse solutii de fibroina.

Am ales ca retete de solubilizare a fibroinei cele din referintele [335, 336]. Pentru omogenizare, solutiile de clorura de calciu si bromura de litiu si fibroina au fost incalzite la temperatura de 95 °C, respectiv 60 °C si mentinute la aceste temperaturi timp de 8, respectiv 4 ore. Ulterior pentru a separa fibroina de sare, solutiile au fost supuse unui proces de dializa chimica, timp de 4 zile. La finalul acestei perioade in membranele de dializa speciale pentru a retine doar moleculele cu mase moleculare > 10000 Da, imersate in apa distilata, au ramas solutiile apoase de fibroina.

Alternativ, o cantitate din solutiile de sare si fibroina obtinute au fost separate prin centrifugare.

A treia metoda de obtinere a tintei inghetate de polimer, ca sursa de material de depunere specifica metodei MAPLE, a fost realizarea unei suspensii de fibroina in apa distilata, in concentratii de 2 - 5%. Aspectul foarte omogen al suspensiei a fost mentinut si prin folosirea unui agitator mecanic.

Pentru filmele hibride de HA-fibroina, am folosit solutiile de polimer, la care am adaugat hidroxiapatita, astfel incat solutiile finale mixte sa contin un raport fixat HA/polimer. Pentru omogenizare, solutiile au fost agitate mecanic.

In toate cazurile, conform tehnologiei MAPLE, tinte solide au fost obtinute prin inghetarea solutiilor/suspensiilor in azot lichid si mentinerea, pe durata depunerii, sub punctul de topire, cu ajutorul unui dispozitiv de racire, alimentat de asemenea cu azot lichid.

Conditii de depunere prin MAPLE

Toate acoperirile au fost obtinute cu ajutorul instalatiei de depunere laser pulsata din dotarea laboratorului, cu un laser cu excimeri KrF*, $\lambda = 248$ nm, cu durata pulsului $\tau_{FWHM} = 25$ ns, functionand la o frecventa de repetitie reglabilă intre 1 si 50 Hz.

Primul set de probe a fost depus in urmatoarele conditii experimentale: presiune de $(5-6) * 10^{-2}$ torr (~ 7 Pa), distanta tinta-substrat 4 cm, temperatura substratului ~ 30 °C, fluenta laser incidenta pe tinta intre 0,3 si 0,5 J/cm², cu numar de pulsuri de 15 000 sau 20 000 la o frecventa de repetitie 10 Hz. Filmele de fibroina au fost depuse din suspensii apoase cu concentratie de 2 % sau 5 % fibroina, iar cele mixte din suspensii apoase cu concentratie de fibroina de 2 % si hidroxiapatita de 3 %.

Conditiiile experimentale de depunere a primelor filme de fibroina si de composit fibroina –HA sunt rezumate in tabelele 3.6-3.8.

Tabel 3.6 Conditii experimentale de depunere a fibroinei pe suporturi de titan si cuart:

Cod proba	Pres. (torr)	Conc fibr. (%)	Temp subst (°C)	Frecv rep. laser (Hz)	Nr pulsuri	Dist. T-S (cm)	Fluenta (mJ/cm ²)	Substrat
FIB1	$(2-3.5)* 10^{-2}$	5	30	10	15000	4	50	Ti
FIB1'	$(2-3.5) *10^{-2}$	5	30	10	15000	4	50	Cuart
FIB2	$(5-6)* 10^{-2}$	2	30	10	20000	4	50	Ti
FIB2'	$(5-6)* 10^{-2}$	2	30	10	20000	4	50	Cuart
FIB3	$(5-6)* 10^{-2}$	5	30	10	15000	4	40	Ti
FIB3'	$(5-6)* 10^{-2}$	5	30	10	15000	4	40	Cuart
FIB4	$(5-6)* 10^{-2}$	2	30	10	23000	4	40	Ti
FIB4'	$(5-6)* 10^{-2}$	2	30	10	23000	4	40	Cuart
FIB5	$(5-6)* 10^{-2}$	5	30	10	20000	4	30	Ti
FIB5'	$(5-6)* 10^{-2}$	5	30	10	20000	4	30	Cuart
FIB6	$(5-6)* 10^{-2}$	2	30	10	23000	4	30	Ti
FIB6'	$(5-6)* 10^{-2}$	2	30	10	23000	4	30	Cuart
FIB 7 centrifugare	$(5-6)* 10^{-2}$	<1	30	10	20000	4	50	Ti
FIB7' centrifugare	$(5-6)* 10^{-2}$	<1	30	10	20000	4	50	Cuart
FIB dializa	$(5-6)* 10^{-2}$	<5	30	10	20000	4	40	Ti
FIB dializa'	$(5-6)* 10^{-2}$	<5	30	10	20000	4	40	Cuart

Tabel 3.7 Conditii experimentale de depunere a fibroinei + HA pe suporturi de Ti si cuart

Cod proba	Pres. (torr)	Conc. Fib/HA	Temp Subst (°C)	Frecv Rep. (Hz)	Nr Puls.	Dist. T-S (cm)	Fluenta (mJ/cm ²)	Substrat
FIB-HA 1	(5-6)* 10 ⁻²	2/3	30	10	20000	4	50	Ti _{corodat}
FIB1-HA 1'	(5-6)* 10 ⁻²	2/3	30	10	20000	4	50	Cuart
FIB-HA2	(5-6)* 10 ⁻²	2/3	30	10	20000	4	40	Ti _{corodat}
FIB-HA2'	(5-6)* 10 ⁻²	2/3	30	10	20000	4	40	Cuart
FIB-HA3	(5-6)* 10 ⁻²	2/3	30	10	20000	4	40	Ti _{corodat}
FIB-HA3'	(5-6)* 10 ⁻²	2/3	30	10	20000	4	40	Cuart
FIB-HA4	(5-6)* 10 ⁻²	2/3	30	10	20000	4	30	Ti _{corodat}
FIB-HA4'	(5-6)* 10 ⁻²	2/3	30	10	20000	4	30	Cuart

Tabel 3.8 Conditii experimentale de noi filme de fibroina si HA- fibroina

Cod proba	Pres. (torr)	Conc. Fib/HA	Temp Subst (°C)	Frecv Rep. (Hz)	Nr Puls.	Dist. T-S (cm)	Fluenta (mJ/cm ²)	Substrat
FIB-NaOH ₁₋₆	5* 10 ⁻²	-	30	15	50000	4	50	Ti _{corodat}
FIB-NaOH ₇		-						Cuart
FIB-NaOH ₈		-						Si 100
⁹ HA ₃ +FIB4- NaOH ₁₋₆		4/3						Ti _{corodat}
⁹ HA ₃ +FIB ₁₋₆		4/3						Ti _{corodat}
HA ₃ +FIB ₇		4/3						Cuart
HA ₃ +FIB ₈		4/3						Si 100

Pentru optimizarea proprietatilor, o a doua serie de filme de fibroina si comozite au fost depuse cu aceeasi sursa laser pulsat cu excimeri (KrF*, $\lambda = 248$ nm, $\tau_{FWHM} = 25$ ns), aplicand pentru fiecare film 50 000 pulsuri laser la o rata de repetitie de 10-15 Hz, cu fluenta laser incidenta pe tinta de $0,4 - 0,5$ J/cm², in incinta vidata pana la $5* 10^{-2}$ torr, la aceeasi temperatura a substraturilor de 30 °C, cu distanta dintre substrat si tinta, asezate paralel, 4 cm.

Solutiile de fibroina au avut concentratii de 5 %, iar cele de fibroina cu HA de 2% Fib si 3 % HA, respectiv de 4 % Fib si 3% HA. Am recurs la neutralizarea suspensiei de fibroina (usor acida) prin adaugarea catorva picaturi de solutie diluata de NaOH, metoda uzual folosita in studiile biologice, sau prin adaugarea unor picaturi de solutie slab salina de NaCl.

Am depus si o a treia serie de probe, cu ultimele filme hibride si de fibroina, selectate dupa conditiile identificate anterior, pentru confirmarea rezultatelor cele mai bune.

Suspensiile/solutiile de fibroina folosite la pregatirea tintelor MAPLE au avut concentratii de 5 %, iar cele de fibroina cu HA de 4 % Fib si 3% HA. Pentru a ajunge la valoarea optima a pH-ului agreat de celule, de 7,4, am adaugat cateva picaturi de solutie diluata de NaOH, atat in suspensiile de fibroina (pH initial 5,3), cat si in cele mixte de fibroina-HA (pH initial 6,6). Cele 50 000 pulsuri laser cu energie de 50 mJ focalizate pe tinta intr-un spot de 10 mm² (rezultand o fluenta laser incidenta de 0,5 J/cm²) s-au succedat la o frecventa de repetitie de 15 Hz, intr-un vid de $5 * 10^{-2}$ torr (~ 7 Pa). Substraturile de Ti corodat au fost plasate la 4 cm distanta fata de tinte si usor incalzite, doar pana la temperatura de 30 °C.

Pentru comparatie, au fost depuse si filme MAPLE de hidroxiapatita din suspensie apoasa (5 % wt HA), folosind aceiasi parametri experimentali ca pentru filmele cu continut de fibroina.

In tabelul 3.9 sunt prezentate codurile filmelor simple si hibride pentru care au fost obtinute si selectate rezultatele relevante.

Tabel 3.9 Codurile filmelor simple si hibride analizate in Cap. 4

Cod	Tipul probei
FIB5	Fibroina (5 % g/l in solutie)
HA5	Hidroxiapatita (5 % g/l)
FIBNaOH	Fibroina (5% g/l solutie) cu adaos de NaOH
FIBNaCl	Fibroina (5% g/l solutie) cu adaos de NaCl
HA3FIB2	Hidroxiapatita (3% g/l) – Fibroina (2 % g/l)
HA3FIB4	Hidroxiapatita (3% g/l) - Fibroina (4 % g/l)
C	Control – sticla borosilicata standard

3.4 Metode si instalatii de caracterizare a straturilor subtiri obtinute

Toate filmele depuse au fost investigate prin tehnici **fizico-chimice** complementare in scopul caracterizarii si optimizarii probelor: XRD, SEM, TEM, FTIR, AFM. Am crescut astfel gradul de obiectivitate si confirmare a rezultatelor obtinute, utilizand mai multe tipuri de echipamente de investigare, enumerate in sectiunile din acest subcapitol.

In ierarhia **testarilor biologice**, testele *in-vitro* simuleaza anumite procese si comportamente caracteristice mediilor vii si sunt primele pe care materialele trebuie sa le treaca favorabil pentru a fi clasate ca biocompatibile. Urmeaza testele *in-vivo*, care verifica comportamentul biomaterialelor in contact direct cu tesuturile vii ale animalelor de testare si, in final, testele *clinice* pe subiecti umani.

In studiile din prezenta lucrare testele *in-vitro* de biocompatibilitate [337-341] au fost efectuate pentru acoperirile depuse in anumite conditii determinante de selectarea minutioasa si investigarea prin XRD si microscopia electronica de inalta rezolutie a probelor. Acoperirile de fosfati de calciu au fost evaluate si *in vivo* [342].

Capitolul 4

REZULTATE SI DISCUTII

In acest capitol prezint rezultatele analizelor fizico-chimice si biologice asupra straturilor subtiri depuse ca acoperiri bioactive pe titan: **(4.1) fosfati de calciu, (4.2) HA-polimer maleic si (4.3) HA-fibroina.**

4.1 Caracterizarea straturilor subtiri de fosfati de calciu

4.1.1 Analize fizico-chimice

Investigatii fizico-chimice ale straturilor subtiri de OCP

Investigatiile XRD arata ca acoperirile OCP depuse prin PLD pe substraturi de Ti (sau pe siliciu, in cazul anumitor analize) prezinta in general cristalinitate foarte slaba, datorata faptului

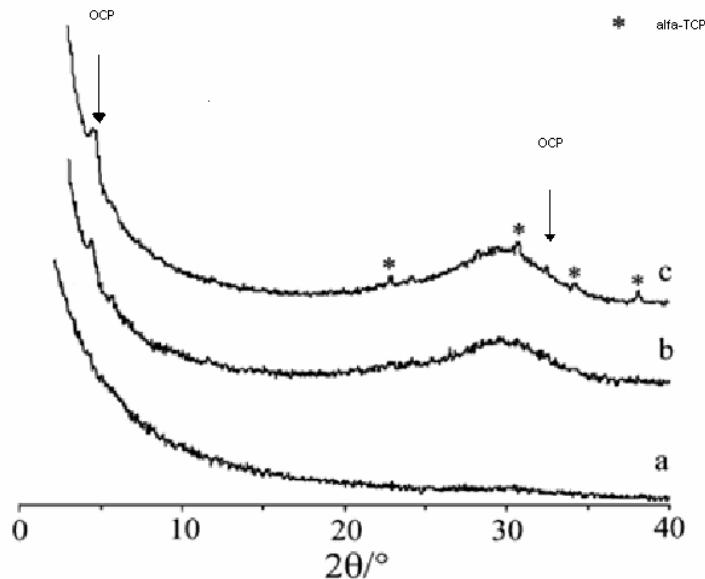


Fig. 4.1 Difractograme de raze X ale acoperirilor de OCP pe siliciu obtinute prin PLD la diferite temperaturi ale substratului a) la temperatura camerei; b) la 150 °C; c) la 200 °C.

ca depunerile si tratamentele termice post depunere s-au efectuat la temperaturi relativ scazute, sub 200 °C, temperatura de descompunere a OCP (vezi diagramele de difractie de raze X din Fig. 4.1 si Fig. 4.2). Cu toate acestea existenta OCP este identificata in toate cazurile prin prezenta unui “umar” la aproximativ 4,7°, corespunzator reflexiei planului (100) si respectiv al unui maxim largit centrat in jurul valorii de (32-33)° [337]. La temperatura camerei depunerea este amorfa, iar la 200 °C incep sa apara maxime caracteristice fazei alfa-TCP. Analiza XRD indica valoarea de 150 °C a temperaturii substratului ca optima pentru sinteza acoperirilor de OCP.

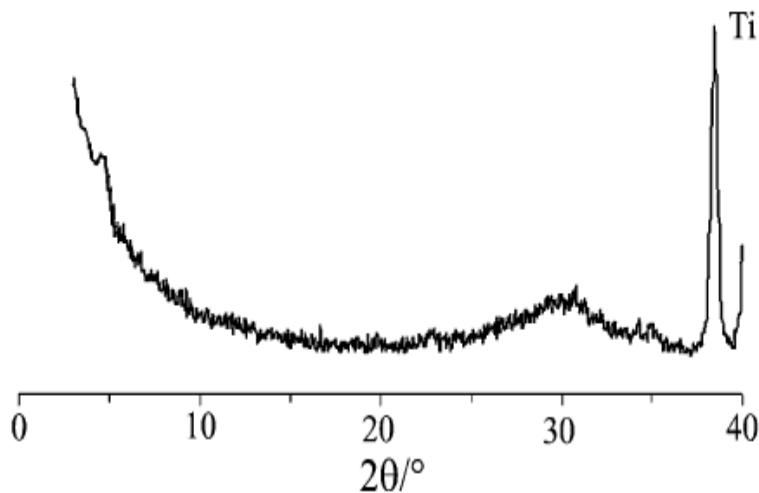


Fig. 4.2 Diagrama XRD tipica a unei acoperiri OCP depuse pe Ti in 50 Pa H₂O la 150 °C

Rezultatele investigatiilor de microscopie electronica demonstreaza ca acoperirile OCP sunt majoritar amorse cu incluziuni nanocristaline, o structura similara materialului anorganic din tesutul osos. Detaliile de microscopie electronica in transmisie cu inalta rezolutie XHRTEM din Fig. 4.3 si diagramele de difractie de electroni pe arii restranse SAED corespunzatoare pun in evidenta existenta acestor domenii nanocristaline OCP suprapuse peste un fond amorf. Pe baza diagramelor au fost calculati parametrii celulei elementare $a = 19,68 \text{ \AA}$, $b = 9,50 \text{ \AA}$, $c = 6,83 \text{ \AA}$, $\alpha = 90,21^\circ$, $\beta = 92,52^\circ$, $\gamma = 108,32^\circ$, valori ce difera de cele din tabelele ASTM cu mai putin de 1 % [351] .

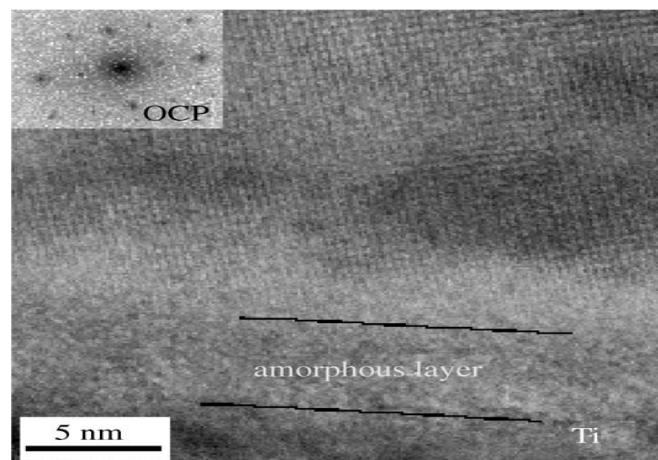


Fig. 4.3 Imagine HRTEM (imagine de detaliu) la interfata unei probe de OCP/Ti depuse la 180 °C, in 50 Pa vaporii H₂O

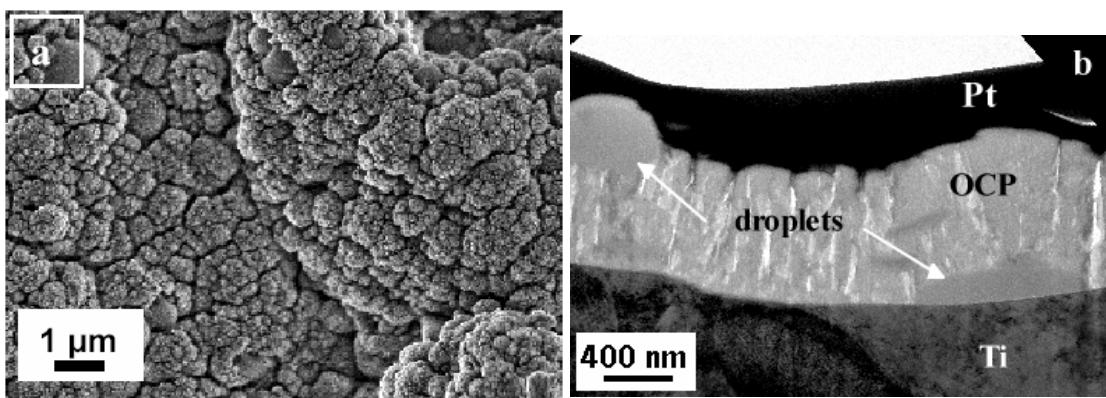


Fig. 4.4 Imagini SEM (a) si XTEM (b) reprezentand morfologia acoperirilor OCP depuse pe substraturi de Ti, incalzite la 150 °C si supuse tratamentului termic post-depunere la 150°C, in vaporii H₂O.

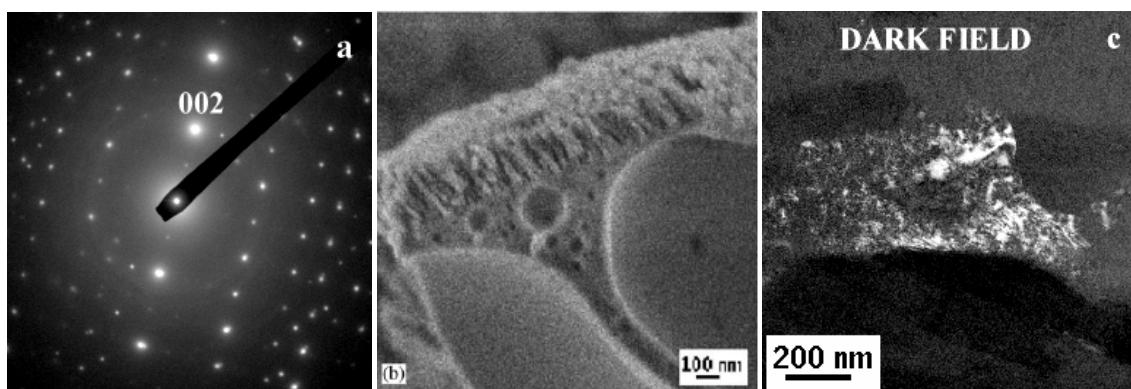


Fig. 4.5 (a) Diagrama SAED; (b) Detaliu SEM de la suprafata si (c) Imagine de camp intunecat (dark field DF) caracteristice filmelor OCP depuse prin PLD pe substraturi de Ti incalzite la 150 °C si supuse tratamentului temic post-depunere la 150 °C, in vaporii H₂O.

Din imaginile SEM si TEM (Fig. 4.4 si 4.5b) se poate observa ca morfologia suprafetei straturilor de OCP obtinute prin PLD la temperatura de depunere si tratament de 150 °C consta din granule si agregate cu forma de conopida (sau coral). Imaginile TEM (Fig. 4.4b si 4.5c) pentru acelasi tip de probe pun in evidenta formarea unui strat de fosfat de calciu (OCP) uniform ca grosime, ce urmareste relieful substratului. El consta din nanoparticule coalescente ce cresc perpendicular pe substrat intr-o structura de tip coral. Secțiunea transversala surprinde si inclusiunea de picaturi de material submicronice, trasatura specifică metodei de depunere prin ablație laser (Fig. 4.4b). Imaginea în camp intunecat (dark field, DF), împreună cu difracția corespunzătoare SAED (Fig. 4.5 a, c), indică prezența unor domenii micro-nanocrystaline disperse în stratul depus.

Intr-adevar, datorita naturii nanocrystaline, tehniciile clasice de difractie (de exemplu, XRD) nu pot furniza suficiente informatii asupra detaliilor structurii fine a nanocristalelor de apatita (ansamblurile de nanoparticule prezinta numai un urmar larg de difractie similar celor provenite de la un material amorf) [5, 352, 353] Totusi, studiile de microdifractie cu microonde de electroni indica un caracter cristalin clar al nanoparticulelor din aceste ansambluri. Mai mult, rezultatele microscopiei electronice de inalta rezolutie au aratat ca nanoparticulele de HA s-au comportat ca o structura de graungi fini monocrystalini [5, 352, 354].

Masuratorile EDS indica un raport molar Ca/P de 1,32, foarte apropiat de valoarea teoretica de 1,33.

Investigatii fizico-chimice ale straturilor subtiri de Mn:CHA

Datorita unei mai bune stabilitati termice comparativ cu OCP, hidroxiapatitei (in acest caz particular, Mn:CHA) i se pot aplica tratamente termice in timpul depunerii si post-depunerii. Din diagrama XRD (Fig. 4.6) se observa o imbunatatire a cristalinitatii straturilor o data cu cresterea temperaturii. De asemenea, se constata ca acoperirile pana la 350 °C sunt amorse [355].

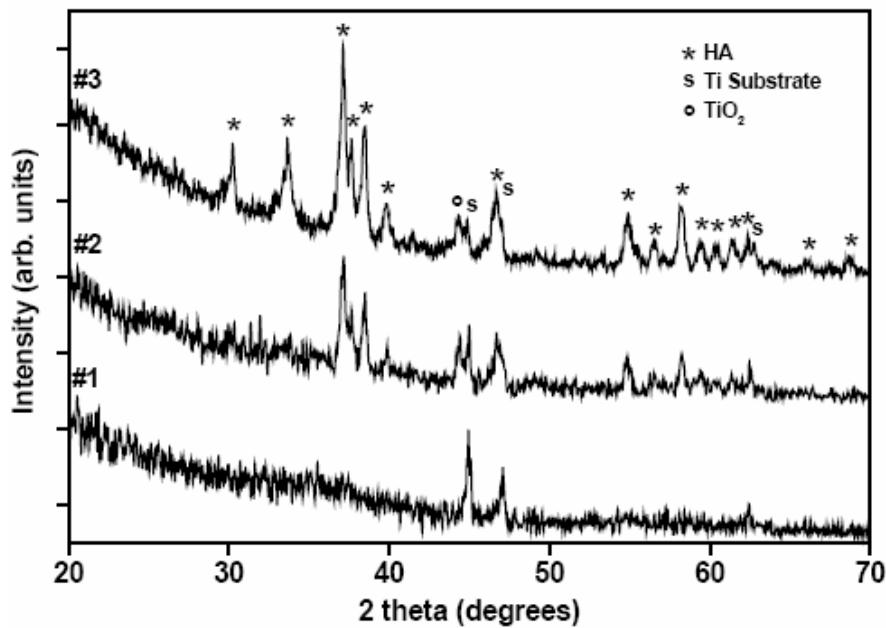


Fig. 4.6 Diagrama XRD a straturilor subtiri de Mn:CHA depuse pe Ti la Mn:CHA1 – $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, Mn:CHA2 – $400\text{ }^{\circ}\text{C}$, Mn:CHA3 – $450\text{ }^{\circ}\text{C}$

Morfologia suprafetei straturilor de Mn:CHA, desi are acelasi aspect granulat si rugos, difera de cea a OCP [356]. Imaginele SEM (Fig. 4.7) prezinta o suprafata mai compacta care contine o densitate mai mare de picaturi de diferite forme si dimensiuni, vizibile si in profunzimea acoperirilor (Fig. 4.8). Aceasta morfologie a suprafetelor confirma faptul ca HA este ablată atat sub forma de material vaporizat ce contine particule de dimensiuni nanometrice cat si sub forma de conglomerate solide de dimensiuni submicronice.

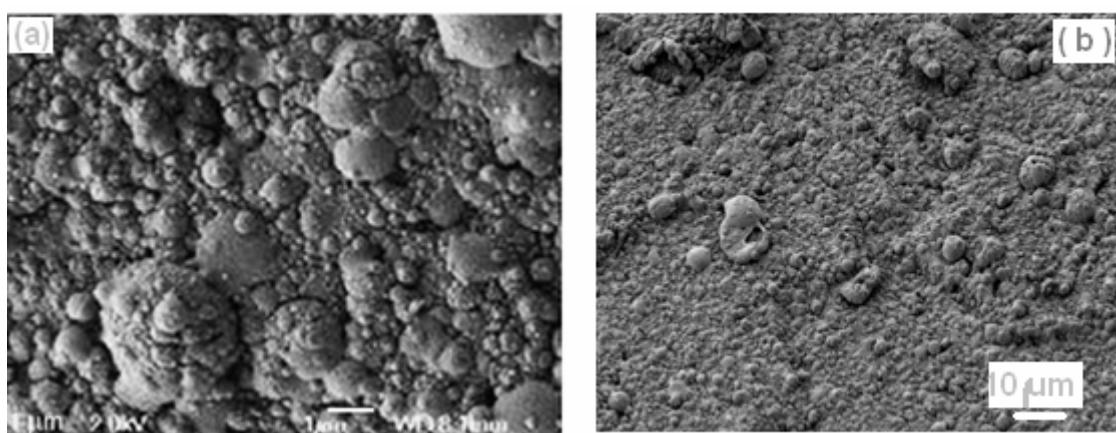


Fig. 4.7 Imagini tipice SEM ale acoperirilor de Mn:CHA depuse la $400\text{ }^{\circ}\text{C}$ Bara de marire este de (a) 1 μm (b) 10 μm

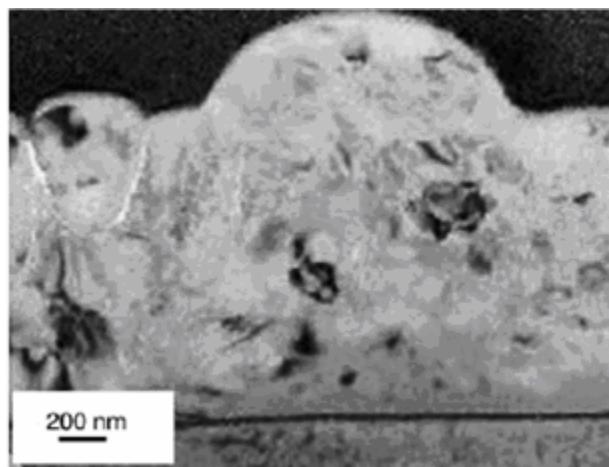


Fig. 4.8 Imagine TEM tipica pentru acoperirile de Mn:CHA depusa la 400 °C

Analizele EDS (Tabel. 4.1) indica mici diferente ale raportului Ca/P intre filme. Valoarea raportului Ca/P cea mai apropiata de cea corespunzatoare HA stoichiometrice (1,67) a fost obtinuta pentru probele sintetizate la 400 °C (1,66), in timp ce probele depuse la 350 °C si 450 °C prezinta un raport Ca/P mai mare (~ 1,8).

Tabel 4.1 Raportul atomic Ca/P determinat prin EDS si XPS

Probe	Tratament termic (°C)	Ca/P (XPS)	Ca/P (EDS)
Mn:CHA 1	400	1,61	1,66
Mn:CHA 2	350	1,64	1,78
Mn:CHA 3	450	1,65	1,85

Spectrele XPS au profile similare pentru toate probele si rapoartele Ca/P masurate prin XPS (Tabel 4.1) in straturile superioare ale suprafetei probelor sunt aproape identice (1,61 - 1,65). Prezenta Mn²⁺ ca agent dopant in structura HA a fost evidențiata in spectrele XPS prin semnale slabe (Fig. 4.9), datorita concentratiei sale reduse in material (0,55 % in greutate). Pe langa Ca, P, O si C, au fost identificate urme de sodiu (Fig. 4.9) ce se pot datora agentilor chimici utilizati pe durata procesului de dopare cu Mn. Mentionam ca, in limita erorilor de masurare,

valorile rapoartelor Ca/P ale suprafetelor probelor, determinate prin XPS sunt foarte apropiate de valorile stoichiometrice.

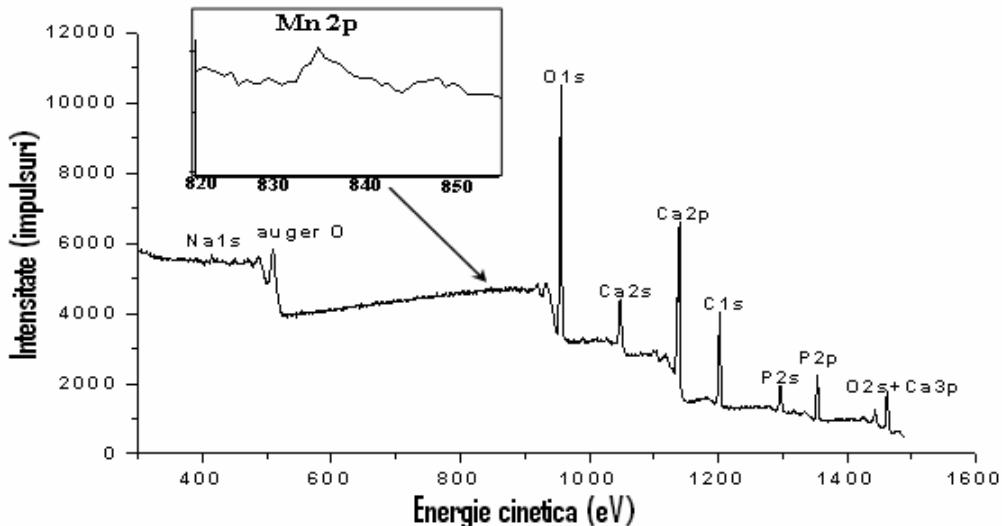


Fig. 4.9 Spectru XPS caracteristic acoperirilor Mn:CHA

4.1.2 Analize biologice

4.1.2.1 Analize *in vitro*

4.1.2.1A Rezultatele analizelor de biodegradare

In functie de cristalinitatea si tipul fosfatului de calciu, biodegradarea acoperirilor se produce in mod diferit, influentand in mod direct comportamentul celulelor.

S-a observat ca in cazul probelor de OCP (pentru care initial raportul Ca/P a fost 1,28), dupa 7 zile de imersare in SBF, acoperirile s-au dizolvat complet. Dupa test, pe suprafata s-au detectat numai cristale de NaCl, in timp ce maximele de Ca si P au disparut complet din spectrele XPS (Fig. 4.10a) [338].

Probele Mn:CHA (cu raportul Ca/P de 1,67 inainte de test) au prezentat numai o slaba degradare dupa 28 de zile. In acest caz, raportul atomic Ca/P a devenit 1,21, ceea ce evidențiaza initierea unui proces lent de degradare (Fig. 4.10b) [338, 357].

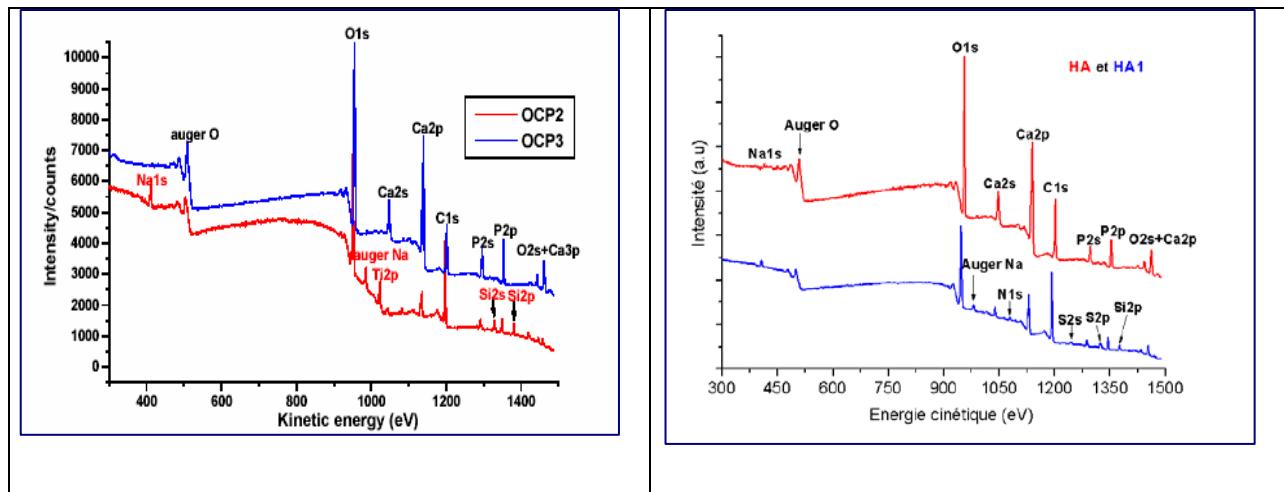


Fig. 4.10 Spectre XPS tipice ale acoperirilor a) OCP inainte (OCP3) si dupa teste de biodegradare (OCP2) ; b) Mn:CHA inainte (HA) si dupa teste de biodegradare (HA1)

Pentru ambele tipuri de titan neacoperit (grad 4, polisat mecanic si grad 4 corodat chimic) supuse biodegradarii, am observat aparitia unei anumite cantitati de Ca si P, dar si Na, Cl, K (chiar anterior celei de a 7-a zile).

4.1.2.1B Culturi celulare

Asa cum este cunoscut, activitatea celulara, proliferarea, si diferențierea depind de interacțiile dintre celule și suprafața biomaterialului. De aceea, studierea unor parametri implicați în metabolismul celular permite obținerea de informații relevante referitoare la activitatea fibroblastelor și osteoblastelor cultivate pe filmele de OCP și Mn:CHA.

Morfologia celulară

Celulele osteoblaste crescute pe probele de Ti după 7 și, respectiv, 21 de zile prezintă aceeași formă alungită (Fig. 4.11 a, b).

După 7 zile celulele cultivate pe acoperirile de OCP (Fig. 4.11 c) și Mn:CHA (Fig. 4.11 e), sunt extinse și prezintă o configurație poligonala, iar după 21 zile (Fig. 4.11 d, f) sunt semnificativ extinse și acoperă mult mai bine suprafața [357], semn al unei adeziuni celulare superioare.

In cazul acoperirilor de OCP osteoblastele prezinta multiple extincii citoplasmatic (Fig 4.11 d), mai putin numeroase in cazul Mn:CHA (Fig. 4.11 e, f) [357].

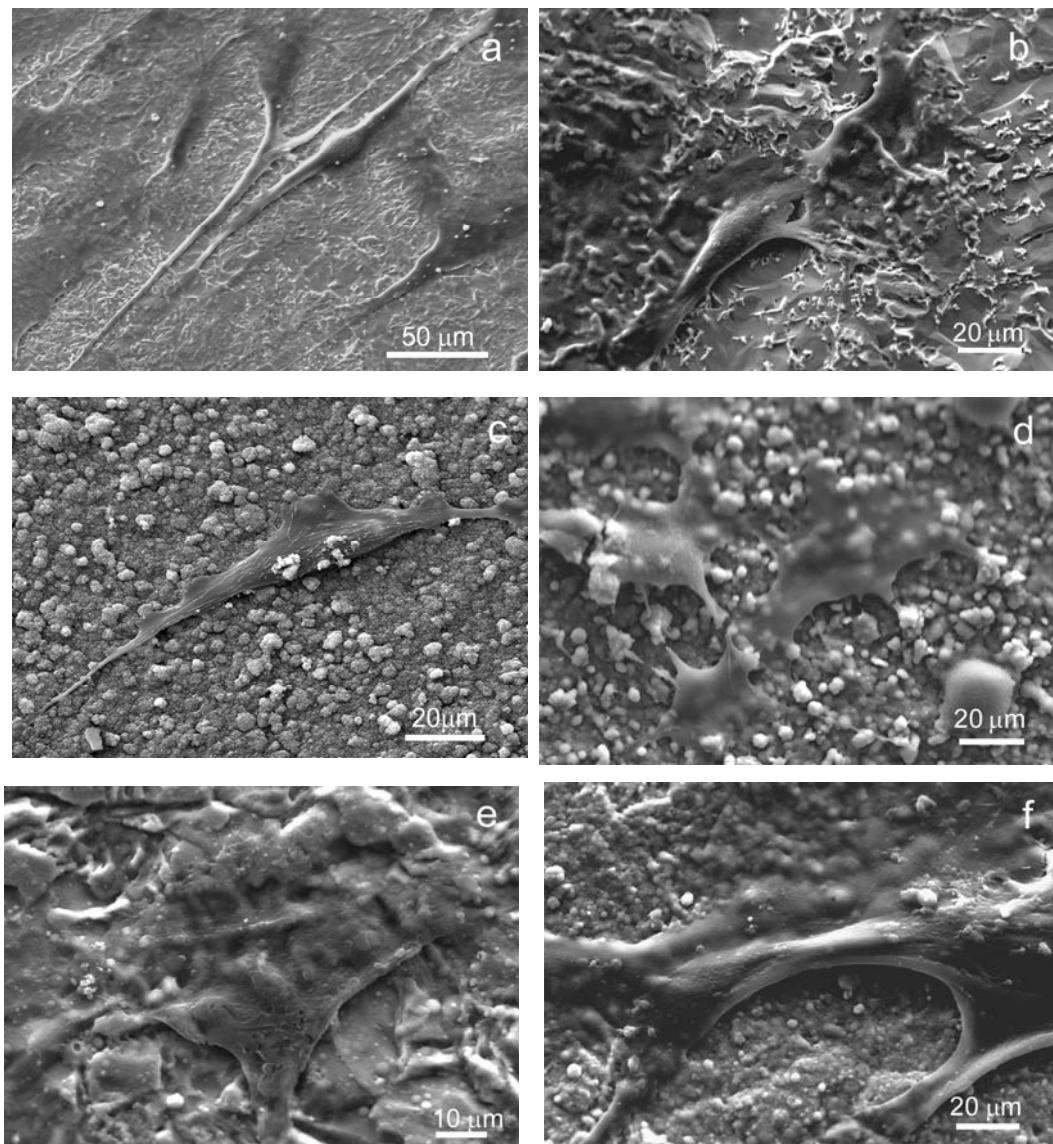


Fig. 4.11: Imagini SEM tipice ale osteoblastelor crescute pe Ti neacoperit dupa (a) 7 zile, respectiv (b), 21 zile; pe acoperirele OCP/Ti dupa (c) 7, respectiv (d) 21 zile; pe acoperiri Mn:CHA/Ti dupa (e) 7, respectiv (f) 21 zile [357]

Testele cu osteobaste umane cultivate si studiate 21 de zile, la diverse intervale de timp, prezinta proliferare si viabilitate normale, ca si un comportamant bun de difereniere (relevant prin analize ALP, CICP, TGF- β 1), aproape similar pentru OCP si Mn:CHA [357]. In toate cazurile proliferarea celulelor (test WST1) se accentueaza dupa ziua a 3-a pana la a 7-a apoi valorile scad usor si se stabileaza pana la finalul perioadei de 21 de zile [357]. S-a remarcat

o crestere a fosfatazei alcaline ALP din ziua a 3-a pana la a 14-a, urmata de o scadere pina la ziua 21. Nivelul ALP fiind un indice timpuriu al activitatii si diferentierii celulare, rezulta ca acest comportament semnifica inceputul mineralizarii matricii [357].

Proteina TGF- β 1 sintetizata de osteoblaste moduleaza proliferarea si diferentierea celulara si imbunatatesta depunerea/formarea de matrice extracelulara in timpul proceselor de dezvoltare osoasa. Din Fig. 4.20 se observa ca dupa trei zile factorul de transformare si de crestere TGF- β 1 porneste de la cea mai mica valoare In ziua a 7-a controlul si titanul ating nivelul maxim, dupa care scad progresiv. Pe de alta parte nivelul TGF- β 1 pentru acoperirile cu fosfati de calciu (OCP, Mn:CHA si, pentru o mai buna comparatie, HA comerciala) creste in continuare intre ziua a 7-a si a 21-a, ceea ce indica formarea de tesut osos chiar si dupa trei saptamani de la implantare (Tabel 4.6 si Fig. 4.20) [338].

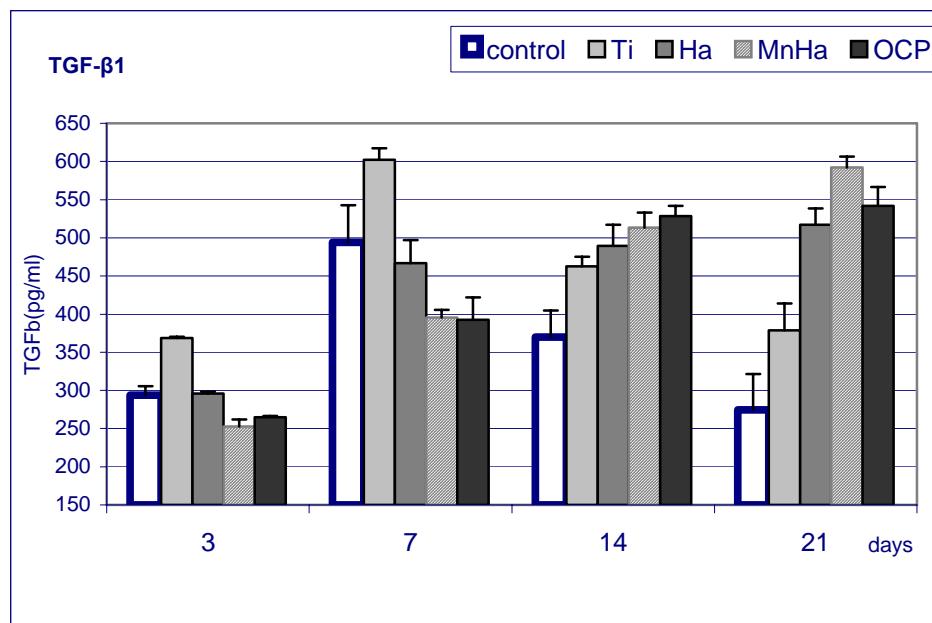


Fig. 4.20 Diagrama testului factorului de transformare si crestere β 1 (TGF- β 1)

Tabel 4.6 Evolutia factorului de transformare si de crestere TGF- β 1 pentru implanturile acoperite cu fosfati de calciu si probele de control

Temp (zile)/TGF β 1	Control	Ti	Ha	MnHa	OCP
3	294±12	369±1	296±3	253±9	265±2
7	494±48	602±15	467±30	395±10	393±29
14	370±35	462±13	490±27	513±20	528±14
21	275±47	379±35	517±21	592±14	542±25

Aceste constatari arata ca depunerea multistructurilor de OCP si Mn:CHA poate fi aplicata pentru dezvoltarea de implanturi biomimetice cu o suprafata resorbabila (OCP) in contact direct cu tesutul osos si una stabila (Mn:CHA) in contact cu partea metalica a protezei.

Cresterea celulara *in vitro* a demonstrat adeziunea si biocompatibilitatea osteoblastelor si fibroblastelor pe ambele tipuri de acoperiri, OCP si Mn:CHA. Osteoblastele umane au desfasurat activitati normale de proliferare, viabilitate si difereniere (ALP, CICP, TGF β 1), similar in cele doua cazuri, OCP si Mn:CHA.

Raspunsul superior al osteoblastelor cultivate pe filmele de OCP si Mn:CHA fata de cele crescute pe titan au indicat ca aceste acoperiri induc o integrare mai rapida implant - tesut osos.

4.1.2.2 Studii *in vivo*

Rezultatele analizelor de rugozitate, arata ca toate implanturile (de tip moneda) acoperite cu fosfati de calciu prezinta aceeasi *rugozitate maxima mediata* de aproximativ 6,3 μm , prin urmare aceeasi contributie mecanica de intrepatrundere la atasarea osoasa.

In tabelul 4.7 si in diagrama aferenta (Fig. 4.21) prezentam rezultatele testelor de desprindere pentru implanturile de titan acoperite cu cele trei tipuri de fosfati de calciu si pentru implanturile de control din titan. Cadrele separate indica animale diferite,. Fiecare cadru include 4 implanturi dintr-un iepure, in ordinea drept proximal, drept distal, stang proximal, stang distal. Valorile statistic semnificative p au fost calculate prin testul “comparatiei 2 cate 2” (student-t test

Tabel 4.7 Forte de desprindere pentru implanturile de titan simplu si, respectiv, acoperite cu straturi subtiri de fosfati de calciu

Implant (nr)	Forță (N)			
	OCP	HA :Mn	HA	Control Ti
1	13,20	18,10	9,20	5,10
2	18,00	9,10	6,30	3,40
3	10,50	12,00	4,90	2,50
4	12,30	10,90	3,50	5,60
5	3,40	10,70	0,80	7,50
6	7,20	17,30	1,90	4,80
7	4,80	10,50	5,80	4,90
8	0,90	11,20	4,90	6,30
9	2,70	9,30	18,00	7,20
19	13,10	8,70	12,10	2,10
11	12,20	8,10	18,70	5,50
12	11,00	9,00	15,30	8,90
Medie	9,11	11,24	8,45	5,32
SD	5,224324	3,233197	6,17804	2,01532
p	0,014208	1,04E-05	0,054516	

pairwise comparison) intre grupurile experimentale individuale si grupul de control.

In diagrama din Fig. 4.21 sunt reprezentate rezultatele testelor de desprindere a implanturilor de pe os pentru cele patru grupuri de probe.

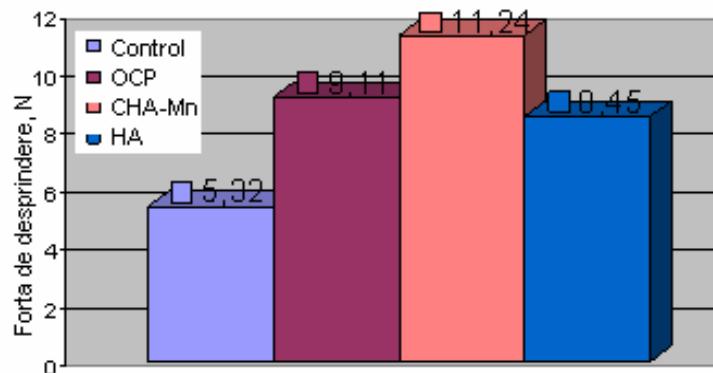


Fig. 4.21 Diagrama distributiilor fortelor necesare desprinderii implanturilor de pe os

Toate implanturile acoperite cu fosfati de calciu (OCP, HA si Mn:CHA) prezinta valori superioare ale rezistentei atasarii osoase ($p \leq 0,05$), aproape duble fata de cele ale probelor de control (titan, medie de 5,32 N) [342]. Cele mai bune rezultate s-au obtinut in cazul probelor acoperite cu Mn:CHA, pentru care valoarea medie este de 11,24 N. Urmeaza probele acoperite cu OCP, cu valoarea medie de 9,11 N si cele acoperite cu HA comerciala Osprovit, 8,45 N comparativ cu media probelor de control, de numai 5,32 N.

Aceste evaluari pozitive ale studiilor *in vivo* confirma, prin urmare, potentialul superior de osteointegrare al implanturilor medicale acoperite cu fosfati de calciu similari celor biologici.

Rezultatele prezentate in acest subcapitol au fost raportate in urmatoarele trei articole:

- "Biocompatible nanocrystalline octacalcium phosphate thin films obtained by pulsed laser deposition", G. Socol, P. Torricelli, B. Bracci, M. Iliescu, **F. Miroiu**, A. Bigi, J. Werckmann, I. N. Mihailescu, "Biomaterials" **25**(13) (2004) 2539-2545;

- "Calcium phosphate thin films synthesized by pulsed laser deposition: physico-chemical characterization and in vitro cells response", I.N. Mihailescu, P. Torricelli, A. Bigi, I. Mayer, M. Iliescu, J. Werckmann, G. Socol, **F. Miroiu**, F. Cuisinier, R. Elkaim, G. Hildebrand, Applied Surface Science **248** (2005) 344-348;

- "In vivo tensile tests of biomimetic titanium implants pulsed laser coated with nanostructured calcium phosphate thin films", I. N. Mihailescu, S. Lamolle, G. Socol, **F. Miroiu**, H.J. Roenold, A. Bigi, I. Mayer, F. Cuisinier, S.P. Lyngstadaas, Journal of Optoelectronics and Advanced Materials, **2**(6) (2008) 337 – 341

4.2 Caracterizarea straturilor subtiri de HA-polimer maleic

4.2.1 Analize fizico-chimice

Spectroscopia in infrarosu cu transformata Fourier, FTIR, a demonstrat ca intre cei doi componenti ai sistemului hibrid exista interactiuni de natura fizica si/sau chimica.

In figura 4.24 este prezentat spectrul depunerii mixte hidroxiapatita-copolimer maleic HA+MP pe titan.

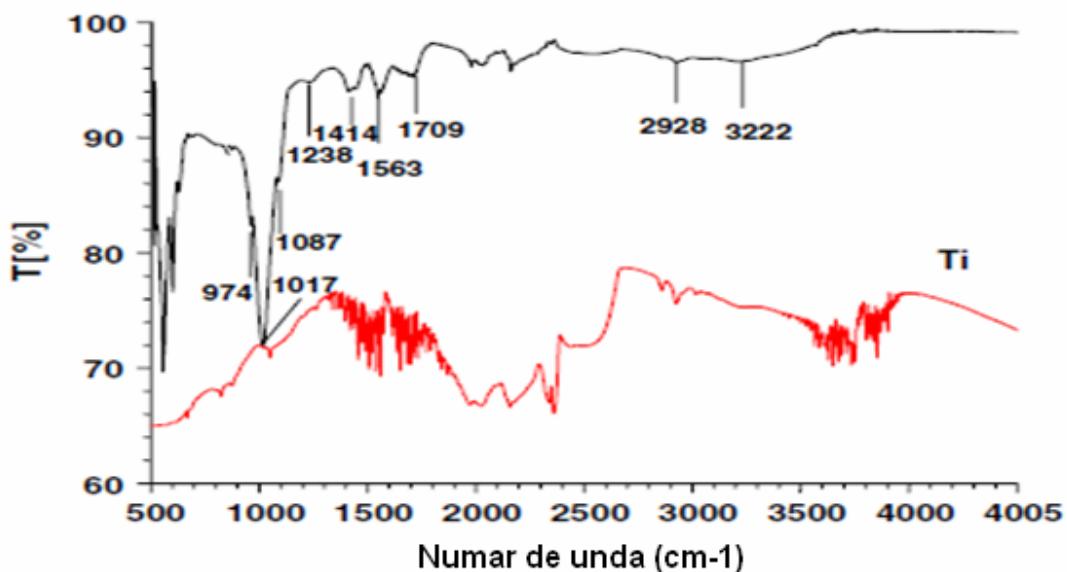


Fig. 4.24 Spectrul FT-IR al compozitului hidroxiapatita- copolimer anhidrida maleica-acetat de vinil (HA+MP) pe suport de titan

Spectrul FTIR al compozitului HA+MP a demonstrat formarea unei legaturi chimice intre faza anorganica (fosfatul de calciu) si copolimer, cu participarea fosfatului din HA si a gruparii carboxil (prin C=O) a copolimerului maleic AM-AV. Banda de la 1238 cm^{-1} (Fig. 4.24) corespunde intinderii C=O a gruparii ester din acetatul de vinil, banda de la 1709 cm^{-1}

corespunde tot unui mod de vibratie specific C=O din acetatul de vinil, iar cea de la 1563 cm^{-1} este atribuita intinderii simetrice a gruparii carboxilat a polimerului maleic (provine din banda de la 1575 cm^{-1} , usor translata) [358].

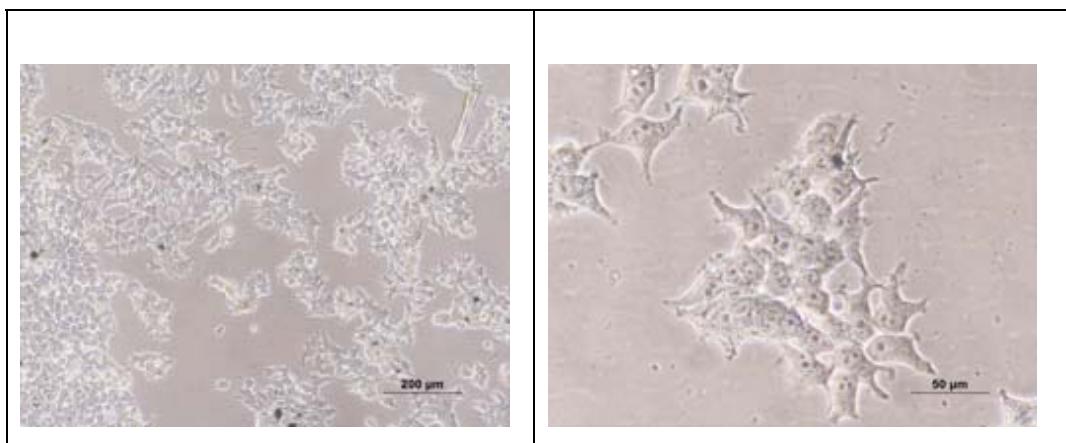
Banda de la 1730 cm^{-1} a fost atribuita legaturii C=O din gruparea acetatului de vinil a copolimerului maleic AM-AV. Participarea acestei legaturi la interactiunile intermoleculare este evidențiată prin deplasarea sa către valoarea de 1709 cm^{-1} , probabil datorita legaturii de hidrogen intermolecular dintre fazele organica și anorganica [358].

Cele trei benzi caracteristice intinderilor grupului fosfat al hidroxiapatitei, de la 960, 1092 și 1048 cm^{-1} , sunt deplasate la 974, 1017 și respectiv la 1087 cm^{-1} [339]. O explicatie posibila ar fi interactiunea intre grupurile fosfat si faza organica. Banda de la 3222 cm^{-1} corespunde OH (legaturilor de hidrogen intermolecular).

4.2.2 Analize biologice *in vitro*

Testarea toxicitatii/biocompatibilitatii structurilor de titan acoperite cu HA sau cu nanocompozitul HA+MP

In prima etapa a evaluarii *in vitro* s-a verificat daca structurile studiate elibereaza compusi toxici solubili, ca urmare a incubarii cu mediu de cultura.



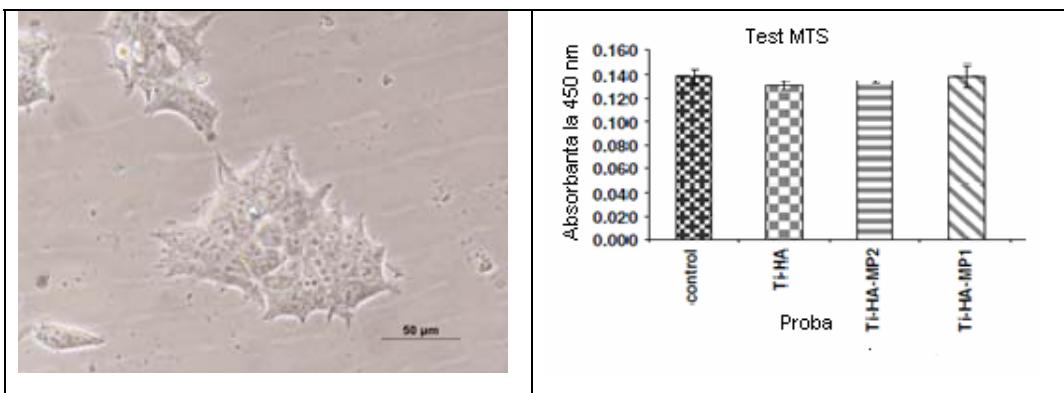


Fig. 4.25 Citotoxicitatea Ti acoperit cu HA sau cu nanohibrizi HA+MP. Celulele HEK cultivate in mediul rezultat in urma a 48 h de incubare cu diferite biomateriale au fost evaluate pentru viabilitate, prin procedura MTS, si pentru morfologie, prin microscopie cu contrast de faza. Valorile reprezinta media \pm DS, n=4

Dupa 48 ore de incubare cu discurile de titan acoperite fie cu HA, fie cu nanocompozitul HA-polimer (HA+MP), mediul de cultura a fost adaugat peste celule HEK (precultivate) si incubat cu acestea pentru inca 24 ore. Citotoxicitatea a fost estimata prin determinarea viabilitatii celulare din testul MTS si observarea morfologiei celulare prin microscopie cu contrast de faza.

Viabilitatea celulelor HEK crescute in mediul rezultat din incubarea cu nanostructuri HA/Ti sau HA+MP/Ti a fost similara cu cea a controlului si celulele au evideniat un fenotip poligonal normal (Fig. 4.25).

Acste date au demonstrat ca dupa perioada de incubare cu medii de cultura, structurile de titan acoperit cu nanocomposite nu sunt citotoxice, fapt ce le valideaza pentru teste aditionale.

Expresia markerilor adeziunii si proliferarii osteoblastelor crescute pe suprafetele Ti-HA, Ti-MP sau ale nanocompozitelor Ti-HA+MP

Raspunsul celular pe suprafata nanocompozitelor HA+MP a fost evaluat prin studii de dinamica a scheletului celular si de morfologie nucleara. Pentru aceasta, suspensii de celule HDF, MSC sau HEK au fost asezate sub forma de monostrat pe suprafata diferitelor acoperiri nanostructurate si cultivate in paralel cu probele de control. Celulele aderente la suprafata acoperirilor nanostructurate de testat au fost permeabilizate si marcate pentru vizualizarea in acelasi timp a actinei, a microtubulilor si a nucleilor (date prezentate in Figurile 4.26 si 4.27).

Pe parcursul a 24 h fibrele lungi de actina polimerizata (fluorescenta in rosu), care s-au extins in intreg volumul celular, formand o retea, au fost clar vizibile pentru HDF si MSC (Fig. 4.26). Celulele HEK s-au concentrat in extremitatile celulare (Fig.4.27). Ambele comportamente sunt similare a ceea ce s-a observat in cazul celulelor crescute in conditii standard. Desi nu au existat diferente vizibile intre formațiunile de actina ale HDF si MSC crescute pe Ti acoperit cu HA versus al celor de pe Ti acoperit cu naonocompozite HA+MP (Fig. 4.26), totusi marajul pentru actina al MSC a aparut mai intens pentru celulele crescute pe Ti-HA+MP2 (concentratia pulberii mixte in tinta/solutia MAPLE de 1 %) decat pentru celulele crescute pe Ti-HA+MP1. (concentratia pulberii mixte de 0,2 %). Evidențierea actinei a fost de asemenea mai putin intensa pentru celulele HEK crescute pe Ti-HA decat pentru celulele crescute pe Ti- HA+MP (Fig. 4.27).

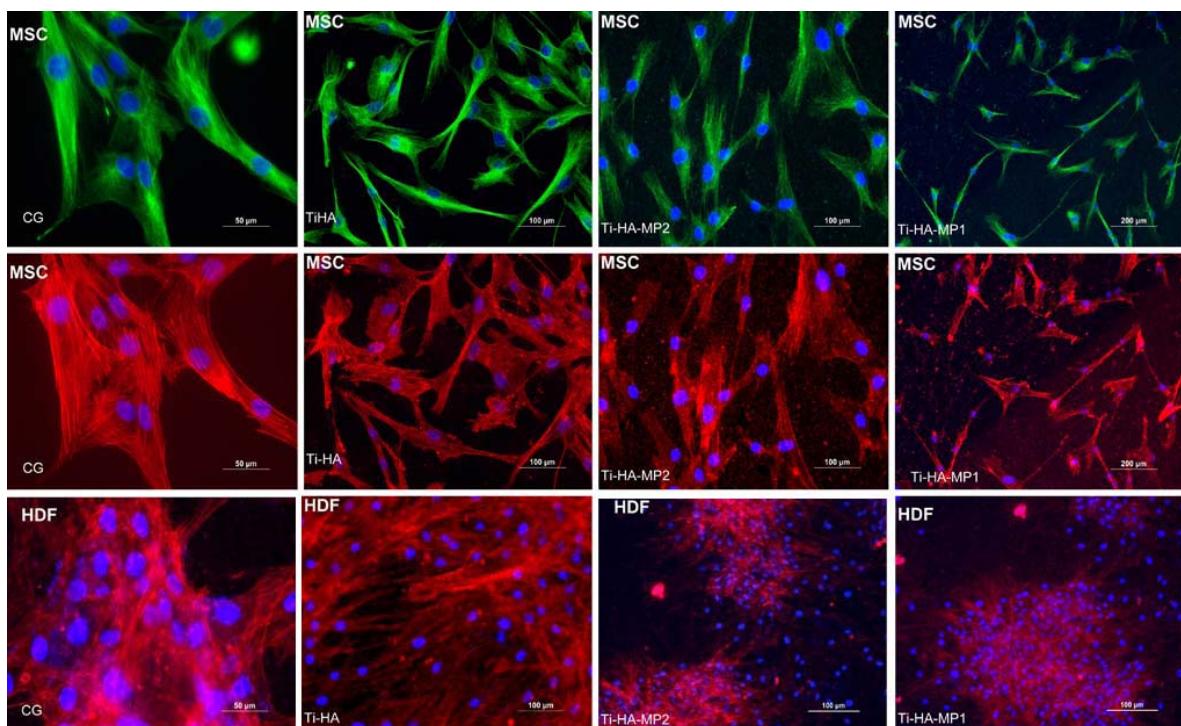


Fig. 4.26: Organizarea scheletului celular si morfologia nucleilor MSC si HDF cultivate timp de 24h pe suprafata acoperirilor — Ti-HA, Ti-HA+MP1, sau Ti-HA+MP2 — sau pe probe de control *de sticla borosilicata standard* (coverglass, CG). Celulele fixate au fost marcate pentru vizualizarea actinei (in rosu), a microtubulilor (verde) si a nucleilor (albastru) si analizate prin microscopie de fluorescenta.

Investigatiile au evidențiat ca pe cateva zone ale suprafetelor structurilor nanocompozite Ti-HA+MP celulele HDF au fost pozitive la marcarea nucleilor si slabe la marcarea actinei

polimerizate, indicand o atasare superficiala. In alte zone ale acelorasi probe au fost vizibile aglomerari de HDF cu marcare puternica pentru actina, demonstrand o buna imprastiere. Acest fapt indica suprafetele de nanocompozit ca fiind organizate in arii discrete in care celulele s-au atasat preferential.

Imaginiile actina-microtubuli analizate pentru MSC cultivate pe Ti-HA sau pe Ti-HA+MP au aratat ca reteaua fina de microtubuli corticale (fluorescenta verde) s-a aliniat cu axa celulei, un indiciu al interfazei si ca in majoritatea celulelor nu a co-localizat cu actina. Toate tipurile de celule crescute pe biomaterialele Ti-HA sau Ti-HA+MP au marcat uniform nucleii cu o morfologie normala rotunda.

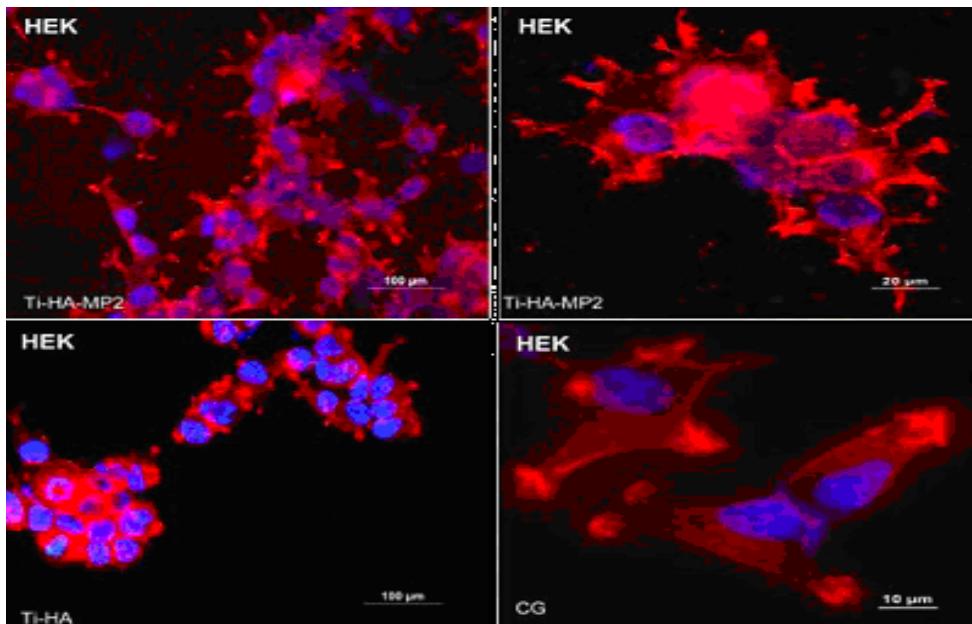


Fig. 4.27: Organizarea scheletului celular si morfologia nucleilor celulelor HEK cultivate timp de 24h pe suprafata diferitelor biomateriale — Ti-HA, Ti-HA+MP1, sau Ti-HA+MP2 - ori pe probe de control standard de sticla borosilicata (CG). Celulele fixate au fost marcate pentru vizualizarea actinei (in rosu) si a nucleilor (albastru) si analizate prin microscopie de fluorescenta.

Proliferarea celulara pe Ti-HA sau pe nanocompozitele Ti-HA+MP

In prima etapa, proliferarea celulara pe Ti-HA sau pe nanocompozitele Ti-HA+MP a fost studiata cu ajutorul celulelor HEK datorita ratei rapide de proliferare a acestei linii celulare. Proliferarea celulelor crescute pe suprafata de Ti acoperit doar cu HA a fost de aproximativ 50 %,

in timp ce pentru probele acoperite cu nanohibrizi/nanocompozite, Ti–HA+MP1 si Ti–HA+MP2, a ajuns la 65 % si respectiv 77 %, in comparatie cu proba de control, de 100 % (Fig. 4.28).

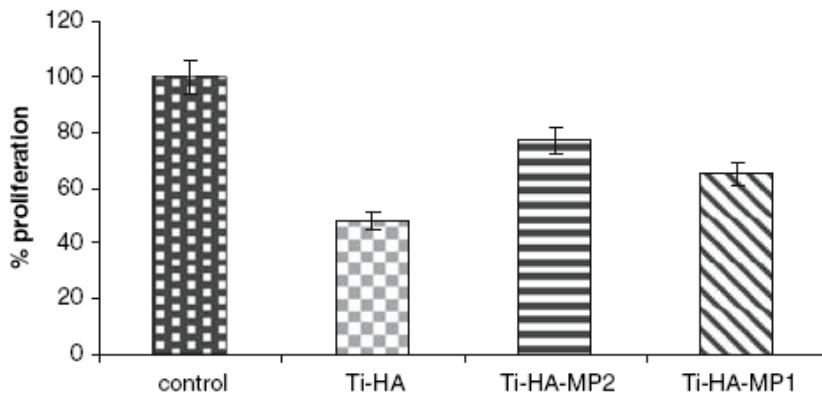


Fig. 4.28 Proliferarea celulelor HEK (celule embrionale renale umane) pe substraturi de titan acoperite cu HA sau HA+polimer (HA+MP): Celulele crescute 72 h direct pe suprafata biomaterialelor au fost detasate si numarate. Numarul celulelor viabile a fost determinat prin testul de excludere Trypan Blue.

Ansamblul, lungimea si stabilitatea filamentelor microtubulilor si actinei controleaza forma celulei, adeziunea, cinetica si proliferarea. Merita de remarcat ca proprietatile suprafetei pot afecta atat morfologia celulara si scheletul celular, cat si nucleii. Morfologia nucleara reprezinta un indiciu al activitatii de proliferare si biosintiza. Toate tipurile de celule pentru test au fost crescute in conditii standard, dupa 24 h au atins morfologia specifica, retelele de microtubuli si actina devenind clar vizibile (Fig. 4.26, 4.27).

Morfologia celulara si structurile de actina-microtubuli pentru celulele MSC si HDF crescute pe acoperirile HA si HA+MP au fost similare celor de (pe esantioanele) control, demonstrand ca aceste suprafete au fost bine tolerate de catre ambele tipuri de celule. Tiparul actinei si morfologia celulara au aratat insa ca celulele HEK au preferat acoperirile compozite HA+MP celor simple de HA. Aceasta observatie concorda cu datele de proliferare (Fig. 4.2.7) care au aratat ca numarul de celule HEK crescute pe suprafetele Ti–HA+MP2 a fost superior celor de pe Ti–HA+MP1 sau Ti–HA. Deoarece proliferarea este un eveniment care urmeaza raspandirii si aderarii celulare, acest rezultat favorabil sugereaza ca polimerul a crescut adeziunea celulara la suprafata structurii Ti–HA+MP2. Diferentele evidențiate prin fluorescenza nucleilor si

a scheletului celular (pentru celulele HDF crescute pe filmele HA-MP1 si HA-MP2) au indicat ca celulele adera mai bine pe unele zone decat pe altele, sugerand ca marcarea simultana a celulelor pentru actina si nuclei poate functiona ca senzor al calitatii acoperirii suprafetei biomaterialului.

MSC au aderat pe structurile Ti-HA+MP si au prezentat o morfologie si un schelet cellular similar cu cele ale celulelor de pe probele de control, oferind un indiciu ca aceste acoperiri sunt eligibile ca potentiiale biomateriale pentru teste *in vitro* din etapa urmatoare, de diferentiere in osteoblaste.

Adeziunea celulara este un parametru important in evaluarea biocompatibilitatii suprafetei materialelor destinate implanturilor ortopedice sau dentare. Dincolo de ancorarea mecanica, adeziunea celulelor la substrat activeaza caile de transmitere a mesajelor, declanseaza si moduleaza expresia diferitelor gene si sinteza proteinelor specifice, urmate de proliferare [359]. Adeziunea celulara ferma si activarea cailor de transfer depind de fenotipul celular si de proprietatile de suprafata. Dinamica morfologiei cellulare si a scheletului cellular, ca si a distributiei subcelulare a markerilor de adeziune au fost analizate pentru OB cultivate pe suprafetele de Ti acoperite, comparativ cu OB crescute in conditii standard.

Pasul urmator al investigatiilor *in vitro* a constat prin urmare in studierea capacitatii osteoblastelor de a adera si a prolifera pe probele de Ti acoperite cu HA+MP, comparativ cu probele de Ti acoperite cu polimer Ti-MP sau doar cu HA, Ti-HA. Controlul absolut a fost reprezentat de celulele crescute in conditii standard. Osteoblastele cultivate timp de 72 de ore pe biomateriale au fost analizate din perspectiva marcatorilor de adeziune: vinculina si kinaza de adeziune focala (FAK). Aceasta durata a fost aleasa ca sa permita celulelor sa adere in intregime si ca favorabila detectie de celule proliferative.

Au fost evaluate ca slab aderente OB cu contur celular neregulat, localizarea ACT in membrana plasmei, VNC si FAK concentrate in aria nucleara (Fig. 3.18, ACT-VNC-1 ora; ACT-FAK, 1 ora). Osteoblastele pe deplin aderente au fost caracterizate de evidenierea ACT in forma de cos si redistribuirea imunoreactivitatii pentru VNC si FAK la periferia celulara (Fig. 3.18, ACT-VNC, 7 ore; ACT-FAK, 7 ore). Celulele OB crescute pe titanul acoperit cu HA timp de 72 de ore (Fig. 4.29), prezinta formatiuni de actina si vinculina similar cu celulele crescute in conditii standard timp de o ora, sugerand o slaba adeziune.

Osteoblastele cultivate pe tipurile studiate de substraturi de titan acoperite au demonstrat tipare de localizare si expresii diferite ale markerilor de analiza mentionati (Fig. 4.29). Osteoblastele crescute pe Ti-MP si Ti-HA+MP au prezentat o retea ordonata de ACT si un marcat VNC in forma triunghiulara, indicand cu claritate ancorarea celulara la suprafata biomaterialelor (Fig. 4.29, f, l, si insertii). Morfologia alterata a scheletului cellular si localizarea VNC pentru OB cultivate pe Ti-HA (Fig. 4.29, c-insertie) au demonstrat o slaba adeziune la acest substrat. Pentru OB crescute pe Ti-HA scheletul cellular se reorganizeaza in filamente de actina foarte subtiri si valurite. Nucleii celulelor au fost mai mici decat cele ale OB crescute pe substraturile de Ti acoperit cu MP, cu HA+MP sau pe suprafetele de control si VNC a avut aspectul unor filamente lungi ce decoreaza conturul multor structuri vacuolare.

Formatiunile de tip “cos de basket” ale fibrelor de actina si VNC concentrate in extremitatile celulare ale OB crescute pe probele de Ti-MP (Fig. 4.29 d-f) si Ti-HA+MP (Fig. 4.29 g-i; j-l) au demonstrat ca suprafetele Ti-MP sau Ti-HA au indicat o adeziune mai buna a celulelor OB. Totusi, in OB crescute atat pe Ti-HA (Fig. 4.30 b), cat si pe Ti-MP (Fig. 4.30 e), FAK au fost putin exprimate si au ramas localizate difuz in aria perinucleara, in timp ce in OB crescute pe Ti-HA+MP granulele pozitive (de) care este semnificativa (de) FAK au fost vizibile in pozitie distala fata de nucleu sugerand traficul FAK spre periferia celulelor.

In continuare, OB crescute pe biomateriale au fost testate pentru exprimarea markerului de proliferare, proteina Ki67. In Fig. 4.30, (partea inferioara) sunt indicate prin sageti celulele pozitive Ki67 pe suprafetele Ti-HA+MP, unde dintr-un numar total de 8 celule pozitive DAPI (Fig. 4.30, j), cinci celule au fost si pozitive Ki67 (Fig. 4.30, k). Celule pozitive Ki67 au fost detectate de asemenea pe substraturile depuse pe titanul acoperit doar cu MP sau doar cu HA.

Suprafetele Ti-HA+MP au fost ocupate de grupuri largi de celule, toate pozitive din punct de vedere al markerilor specifici OB si avand marcare uniforma DAPI si o morfologie nucleara normala (Fig. 4.30, imaginile din ultimul rand).

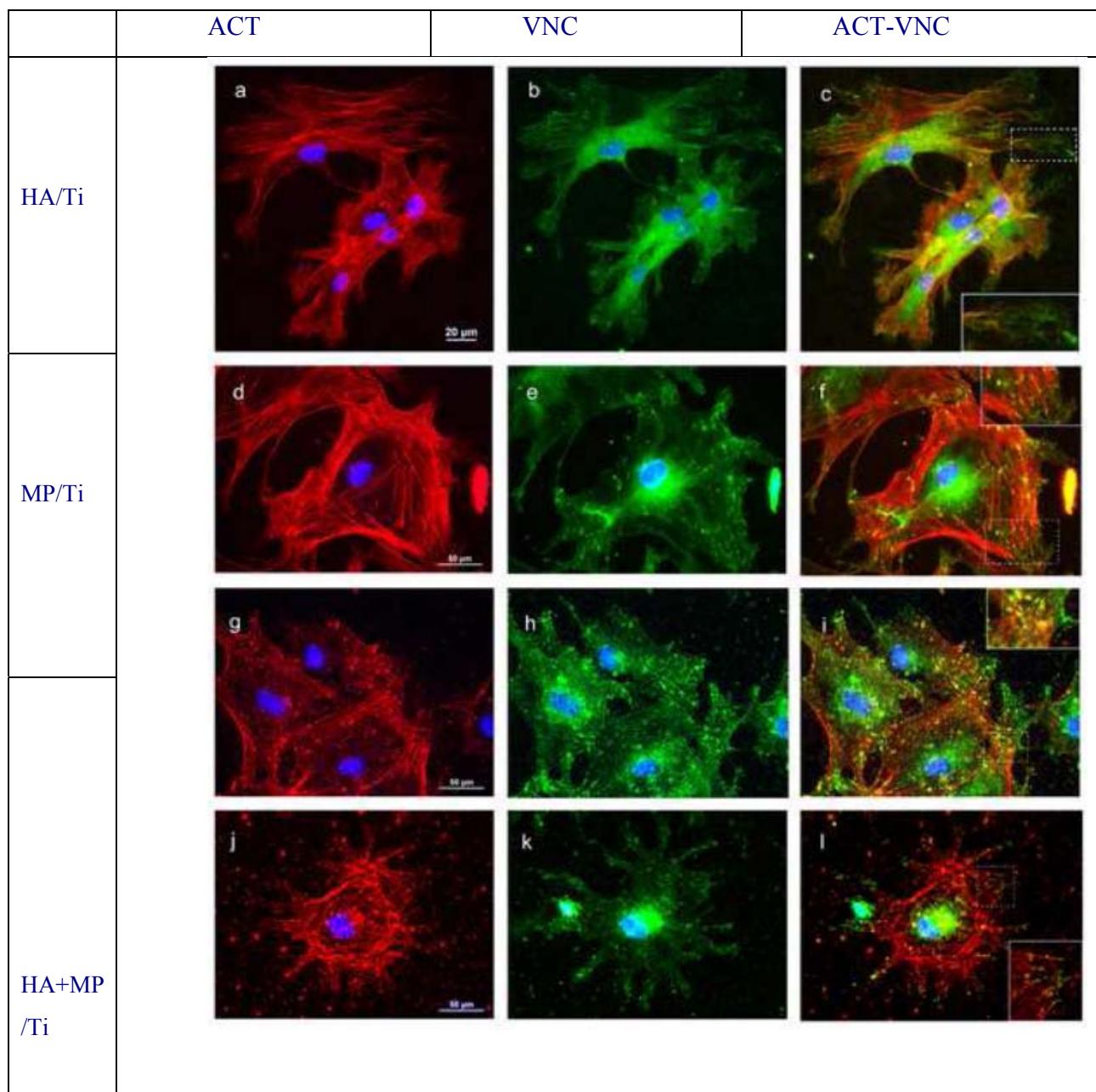


Fig. 4.29 Microscopie de fluorescenta - Adeziunea si proliferarea celulelor osteobaste primare OB crescute 48 h pe Ti acoperit cu HA (a-c), MP (d-f) sau HA+MP (g-i,j-l). OB imunotestate pentru actina-ACT (a,d,g,j) si vinculina-VNC (b,e,h,k). Bara = 20 μ m pentru a-c; bară = 50 μ m pentru d-l)

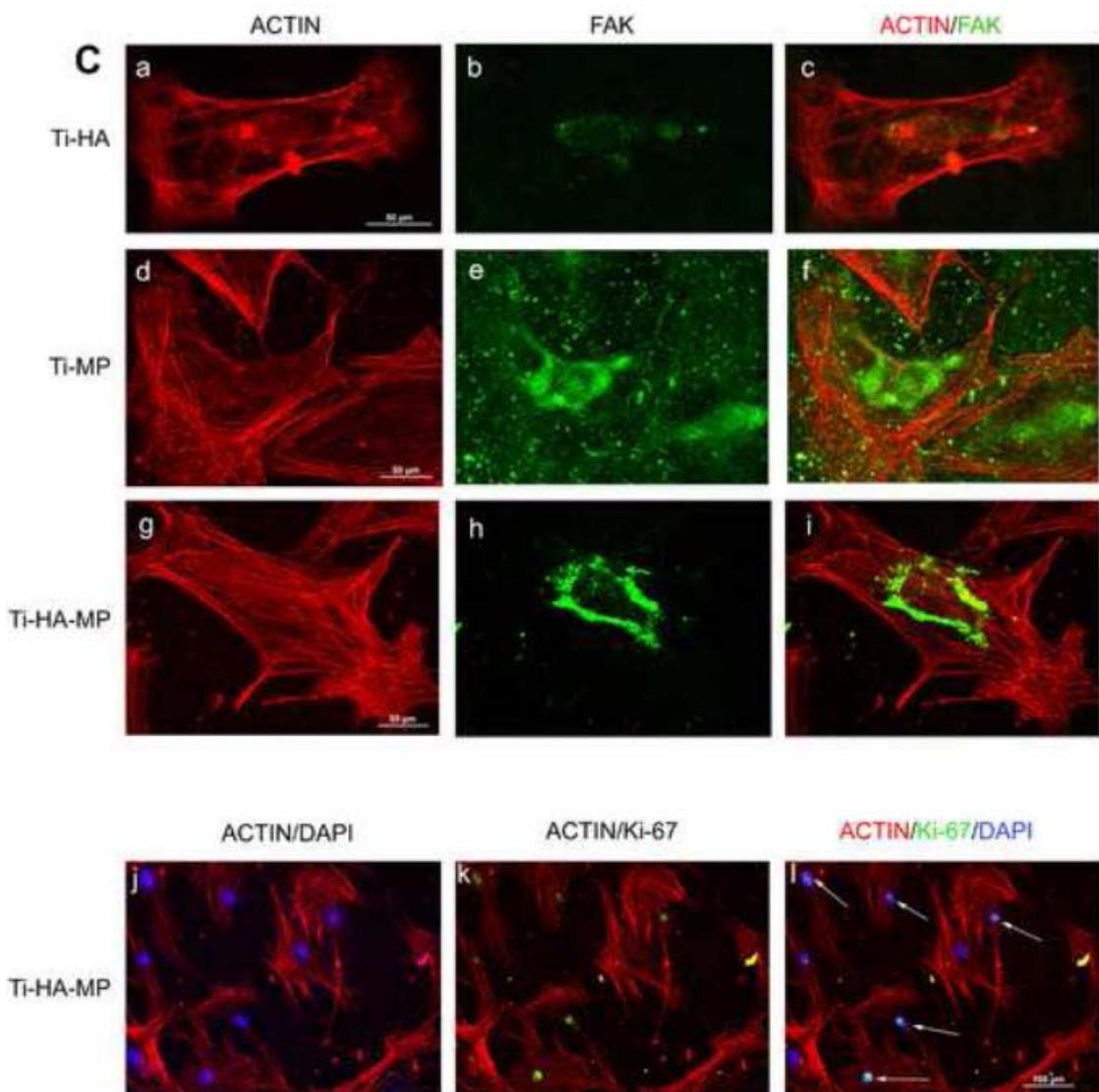


Fig. 4.30: Microscopie de fluorescenta. Adeziunea si proliferarea celulelor osteoblaste primare OB crescute pe Ti acoperit cu HA(a-c), MP(d-f) sau HA+MP (g-i,j-l). OB imunotestate pentru ACT (a, d, g) si FAK (b,e,h), (bara =50 µm a,b,c; Bara = 100 µm pentru Ki67/actina)

Dat fiind ca celulele OB marcate pozitiv cu Ki67 au reprezentat un indiciu al proliferarii pe suprafetele de Ti acoperite, **proliferarea celulară** în continuare estimată cantitativ prin testul CFSE.

Fluorescenta celulei „mama” este mostenita de celulele „fiice”, ajungând la valori mai scăzute după fiecare diviziune și nu se transferă celulelor adiacente din populație. Astfel celulele

cu indice ridicat de CFSE au o activitate proliferativa scazuta sau inexistentă, iar cele cu indice scazut CFSE au suferit deja cateva diviziuni celulare.

Este important de precizat ca primele teste de proliferare au fost facute pe HEK, celule embrionare de rinichi uman. Acestea au alt comportament proliferativ decat OB primare. Testul de proliferare pe HEK reprezinta un indiciu al faptului ca probele nu sunt toxice, dar nu este foarte relevant pentru predictia comportamentului proliferativ al osteoblastelor.

Testul de proliferare CFSE pe OB arata viteze diferite ale proliferarii pe probele de control sau acoperite cu straturi subtiri de biomateriale. Acest test furnizeaza informatii reale despre comportamentul *in vitro* si potential sugestive despre comportamentul *in vivo* al osteoblastelor pe acoperirile probelor de tip implant.

In histogramele din Fig. 4.31 populatiile de osteoblaste cu CFSE scazut si CFSE ridicat corespund maximelor M1 si, respectiv, M2. Procentajul de celule al fiecarei populatii a fost determinat din statistica histogramelor si reprezentat ca bara de diagrama a duplicatelor mediate (Fig. 4.31, panelul inferior).

Datele au aratat ca probele de titan acoperit cu HA sau MP au generat o proportie mai mare de osteoblaste cu marcatie scazut de CFSE (inalt proliferative), respectiv 50 si 60 %, in comparatie cu probele control si/sau cele pe titan acoperit cu HA+MP, cu o proportie de numai 40 % a celulelor proliferative. Acest rezultat a indicat o frecventa crescuta a diviziunii celulare pe durata celor sase zile de cultura pe acoperirile de HA sau MP.

Pentru a obtine o comparatie mai complexa a acoperirilor HA+MP, HA si MP in ceea ce priveste proprietatile de reglare a fisiologiei specifice celulelor osoase, am analizat intai exprimarea markerilor caracteristici fenotipului OB in celulele cultivate pe aceste acoperiri propuse ca biomateriale pentru substraturile de titan (Fig. 4.32.).

In celulele crescute pe Ti-MP si Ti-HA+MP imunofluorescenta pentru colagen a fost intensa si a aparut ca fibre lungi si subtiri de colagen traversand intregul corp celular (Fig. 4.32 b, c-detaliu), in timp ce in celulele crescute pe Ti-HA marcarea cu colagen a fost punctuala si concentrata in jurul nucleului (Fig. 4.32. a - insertie, vezi sageata).

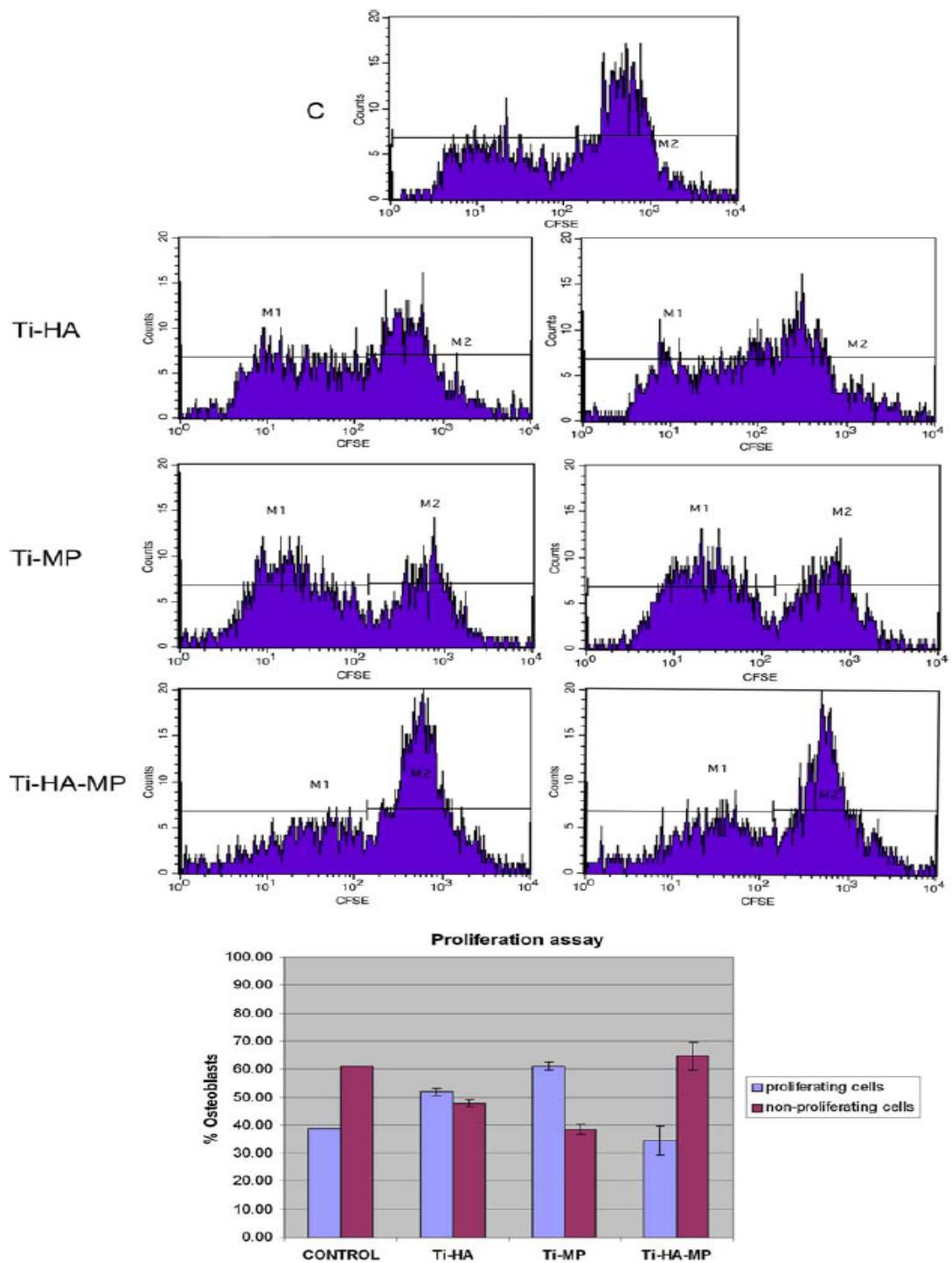


Fig. 4.31 Proliferarea OB umane crescute pe Ti acoperit cu biomaterialele HA, MP si HA+MP. Osteoblastele au fost marcate cu reagent CFSE si cultivate timp de sase zile pe materiale standard (control, C) sau pe biomaterialele de testare indicate si analizate prin citometrie in flux

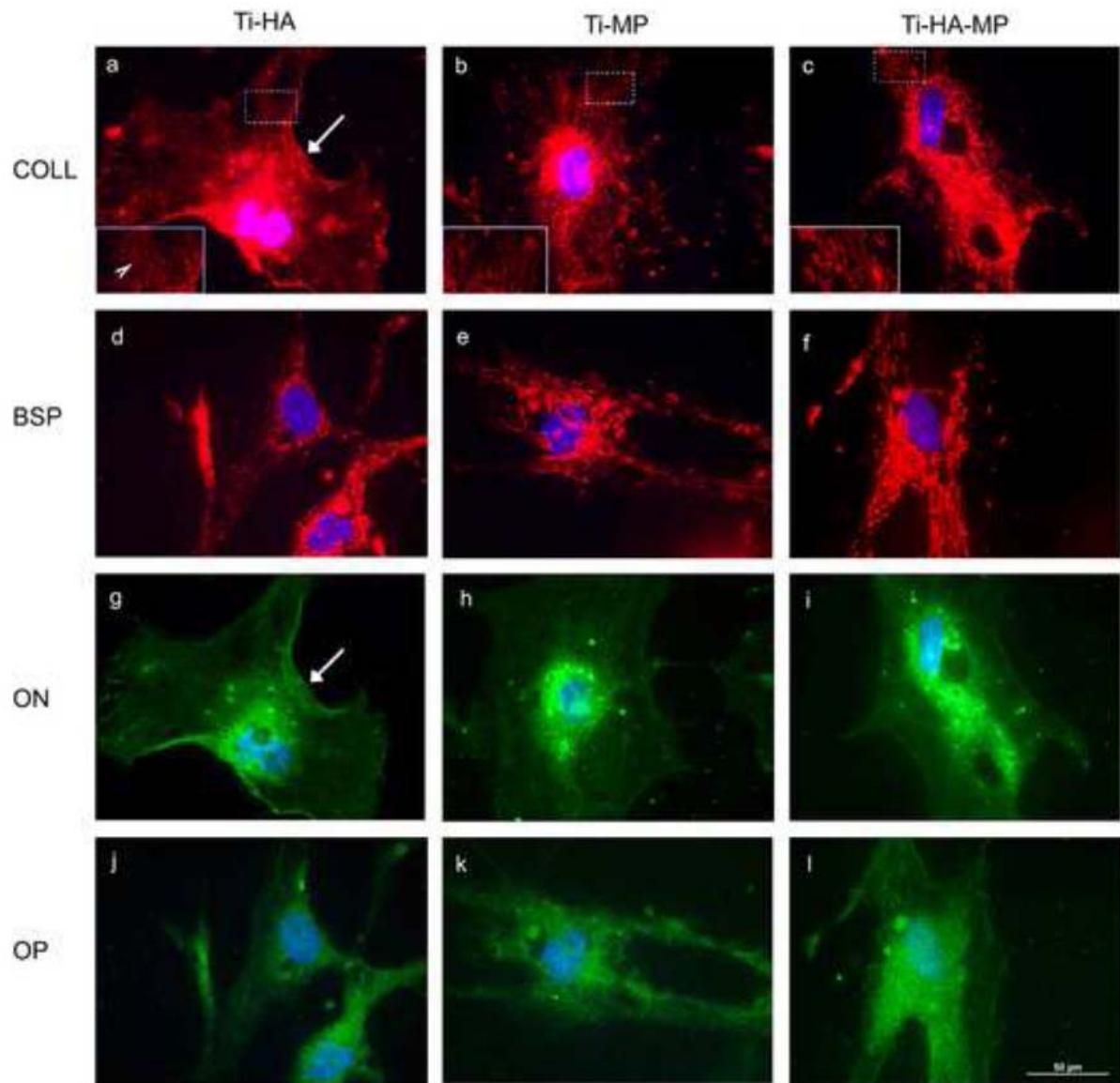


Fig. 4.32 Expresia markerilor specifici fenotipului osteoblatelor OB in celulele cultivate pe titan acoperit cu HA, MP si HA+MP. Osteobaste imunomarcate pentru colagen de tipul I (COLL), sialoproteina osoasa (BSP), osteonectina (ON) si osteopontina (OP) (bara = 50 μ m); aglomerari celulare crescute pe Ti-HA+MP imunotestate simultan pentru OP-BSP (f, l) si ON-COLL (c,i) (bara = 50 μ m)

Pentru toate cele trei tipuri de acoperiri sialoproteina osoasa, BSP, a fost bine exprimata si localizata in vezicule, in cazul Ti-HA (4.32 d), sau in structuri de tip filament, in cazurile Ti-MP sau Ti-HA+MP (4.32 e, f). Celulele cultivate pe Ti-HA au exprimat saracacios osteonectina (4.32

g) si osteopontina (4.32 j). Pentru OB crescute pe Ti-MP osteonectina s-a concentrat in aria perinucleara, in timp ce pentru OB de pe Ti-HA+MP osteonectina si osteopontina au fost mai disperse in structuri citoplasmatice. Este interesant de notat ca pentru OB crescute pe Ti-HA (marcare cu colagen COLL sau cu osteopontina OP) o portiune din corpul celulei (marcata prin sageti in Fig. 4.32) este vizibil detasata, indicand o slaba adeziune a acestor celule la suprafata acoperita cu HA.

De notat, marcarea intensa a FAK si VNC din placile de adeziune ale OB crescute in conditii standard pe substratul control de sticla (Fig. 3.18) nu a fost detectata in celulele crescute pe nici unul dintre suporturile de titan acoperite cu biomateriale (Fig. 4.29 si 4.30). Intensitatile diferite ale imunomarcajului FAK in OB crescute pe cele trei tipuri de acoperiri au demonstrat ca expresia FAK a fost modulata de catre proprietatile de suprafata ale structurilor Ti/acoperire si accentuata doar in cazul acoperirii de Ti cu HA+MP. Deoarece FAK este o proteina care necesita interactiunea integrinelor cu matricea extracelulara pentru expresia sa [360], se poate trage concluzia ca celulele OB au stabilit interactiuni mai puternice cu matricea extracelulara cu ajutorul integrinelor atunci cand au fost cultivate pe Ti-HA+MP decat in cazurile Ti-HA sau Ti-MP. Datele obtinute din analiza expresiei markerilor fenotipului OB au aratat ca in OB crescute pe Ti acoperit cu HA colagenul nu s-a organizat in fibrile, iar osteopontina si osteonectina au fost detectate in principal in aria perinucleara (Fig. 4.32).

Modificările observate in ansamblul si traficul compusilor biosintetici specifici ai OB crescute pe Ti-HA ar putea reprezenta consecintele faptului ca OB au aderat slab la acest substrat. Totusi, OB crescute pe Ti-HA au fost proliferative si se presupune ca ar genera descendente cu caracteristici functionale si morfologice distincte de cele ale celulelor normale. O explicatie pentru acest comportament al celulelor in contact cu HA, care este cunoscuta a fi larg si cu succes folosita ca ceramica pentru acoperiri biocompatibile, ar putea fi legata de metoda de depunere. Metoda MAPLE fiind mai curand potrivita pentru transferul polimerilor decat pentru cel al compusilor anorganici, s-ar putea sustine ipoteza conform careia acoperirea cu HA pe Ti obtinuta prin MAPLE a generat un strat subtire mai putin biocompatibil decat nanohibrizii HA+MP.

Conform datelor achizitionate din evaluarea proliferarii cantitative OB cultivate pe acoperirile Ti-MP au parcurs un numar semnificativ mai mare de cicluri celulare fata de celulele OB crescute pe Ti-HA+MP (Fig. 4.31). Rezultatul confirma datele anterioare care au indicat o

proliferare crescuta a celulelor HEK pe Ti-HA+MP in comparatie cu cele de pe suporturile Ti-HA [339] si care sprijina ideea ca polimerul ar putea avea proprietati mitogene. Totusi, osteoblastele sunt celule cu crestere si multiplicare lente [361]. Proliferarea lor accelerata determinata de cultivarea pe acoperirile de tip Ti-MP ar putea afecta expresia genei, conducand in consecinta la modificari in sinteza componentelor matricii extracelulare osoase.

Efectele MP asupra diferitelor procese celulare sunt insuficient intelese in aceasta etapa. Totusi, lipsa sa de toxicitate si abilitatea de a induce adeziunea si proliferarea celulara recomanda polimerul maleic ca pe un candidat interesant pentru proiectarea de noi structuri biocompatibile.

In concluzie, datele prezentate in acest studiu au demonstrat ca structurile nanohibride rezultate din asocierea HA cu copolimerul maleic MP si depunerea compozitului pe suprafetele metalice prin tehnica MAPLE au generat un mediu mai favorabil decat HA sau MP, fiecare individual, pe care OB au aderat ferm, au sintetizat componente organice ale matricii extracelulare naturale si pe care au manifestat proliferare controlata [340].

Rezultatele studiilor descrise in acest subcapitol au fost raportate in urmatoarele doua articole:

- *Biocompatibility evaluation of a novel hydroxyapatite-polymer coating for medical implants (in vitro tests)*, Gabriela Negroiu, Roxana M. Piticescu, Gabrielle C. Chitanu, Ion N. Mihailescu, Livia Zdrentu, **Marimona Miroiu**, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, **19(4)**: 1537-1544, Aprilie 2008:

- *Specific biofunctional performances of the hydroxyapatite-sodium maleate copolymer hybrid coating nanostructures evaluated by in vitro studies*, L. E. Sima, A. Filimon, R.M. Piticescu, G.C.Chitanu, D.M.Suflet, **M. Miroiu**, G. Socol, I.N. Mihailescu, J. Neamtu, G. Negroiu, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, **20**, 2305- 2316, 2009.

4.3 Caracterizarea straturilor subtiri de HA-fibroina

Referitor la experimentele descrise anterior de Tsuboi si colab [212, 251] de ablatie laser a fibroinei, metoda MAPLE conduce de asemenea la depuneri de polimer nealterat, functional, prezintand insa avantajul unei prelucrari curate, fara adaos de fotosensibilizatori (in cazul discutat, de antracen). Principiul este insa acelasi, al eficientizarii procesului de ablatie si al prezervarii integritatii substantei din tinta. Am folosit laseri in UV, deoarece HA este ablata eficient la aceste lungimi de unda, nu in IR (vs ablarea fibroinei in IR, ca in experimentele raportate de Nakayama si colab.[2.249]).

Stoichiometria filmelor de fibroina si HA-fibroina a fost evaluata prin analize FTIR si XRD, iar morfologia prin investigatii AFM, SEM si nanoindentare. Au urmat analizele *in vitro* de biocompatibilitate.

4.3.1 Primul set de probe

4.3.1.1 Analize fizico-chimice

- Spectroscopie FTIR

In pulberea de fibroina se disting maximele de absorbtie specifice formei β a substantei, la 1265 (~ 1260), la 1520 , la 1625 (~ 1630) cm^{-1} si la 1698 (~ 1703 sau 1695) cm^{-1} [240, 249, 362-365] si o banda de absorbtie la 700 cm^{-1} (amida V) (Primele valori sunt cele identificate in spectrele noastre, iar valorile din paranteze cele atribuite in lucrările citate ca referinte). La 612 cm^{-1} se observa un maxim destul de slab al poly(L-alanine) specific in forma de strat- β (β -sheet) [366]. Este de asemenea prezent un maxim la 1235 cm^{-1} , atribuit formei de spirala dezordonata (random coil, r. c.) a fibroinei.

In spectrul pulberii de HA se disting urmatoarele maxime de absorbtie: 564 cm^{-1} ($\sim 570 \text{ cm}^{-1}$), 601 cm^{-1} (atribuit indoirii asimetrice PO_4), 961 (~ 954) cm^{-1} (vibratie simetrica de intindere PO_4), un maxim ascuns la 1031 cm^{-1} (vibratie de intindere asimetrica PO_4) si doua maxime de tip umar la 630 cm^{-1} ($\sim 631 \text{ cm}^{-1}$) si respectiv la $\sim 1081 \text{ cm}^{-1}$, corespunzand gruparii PO_4 , ca si maximul de la 3566 (~ 3562) cm^{-1} , atribuibil OH [367].

Analiza FTIR a furnizat spectre similare pentru toate filmele de fibroina, indiferent de solutia de provenienta (Fig. 4.34 a). In filmele cu grad scazut de cristalinitate sau slab stoichiometrice apar fenomene de largire, deplasare si/sau scadere a intensitatii benzilor. Din acest punct de vedere acoperirea cu cea mai mare asemanare fata de pulberea initiala este cea din suspensia apoasa, cu concentratie mai mare de fibroina (5 %) (Fig. 4.34 b).

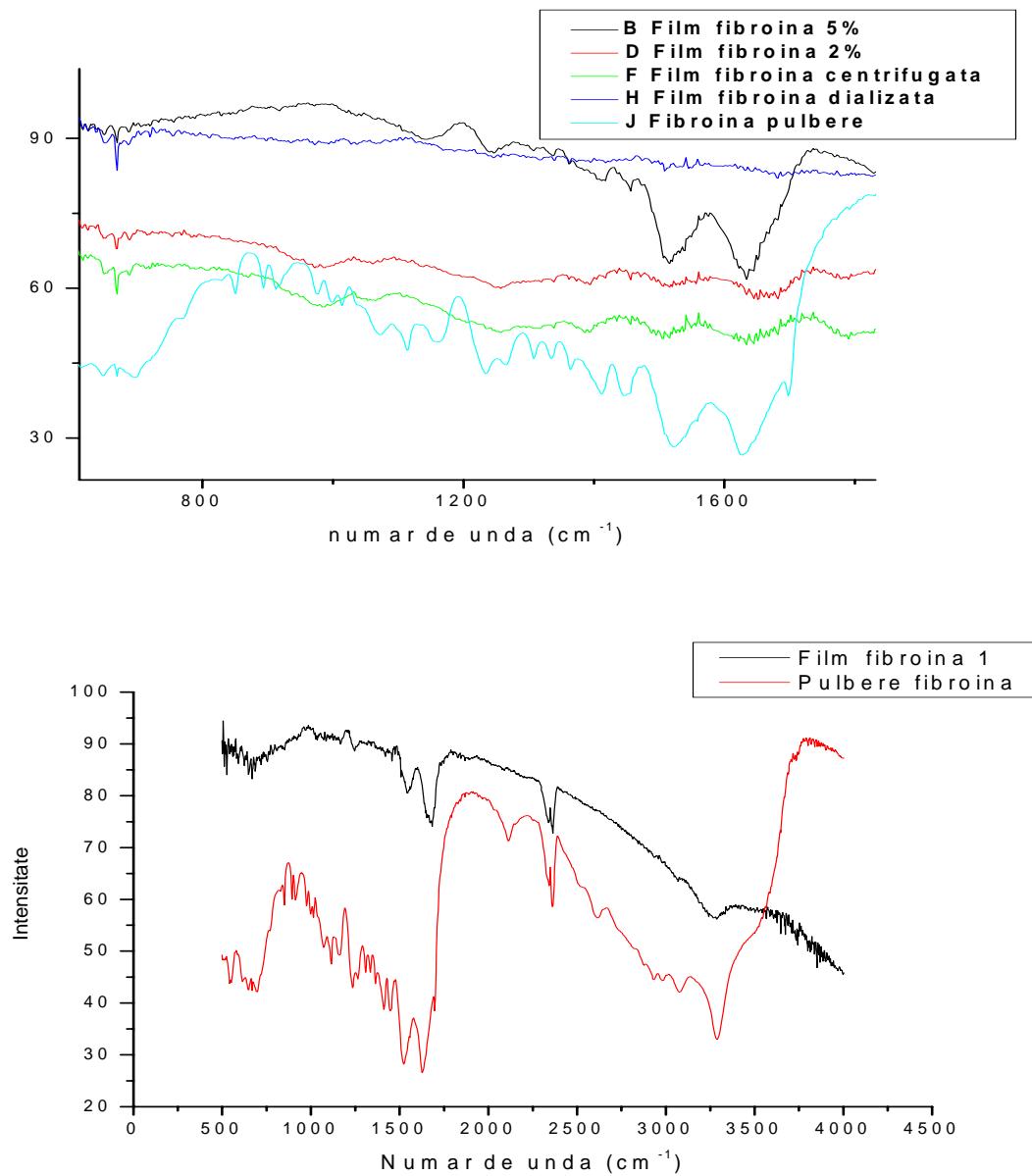
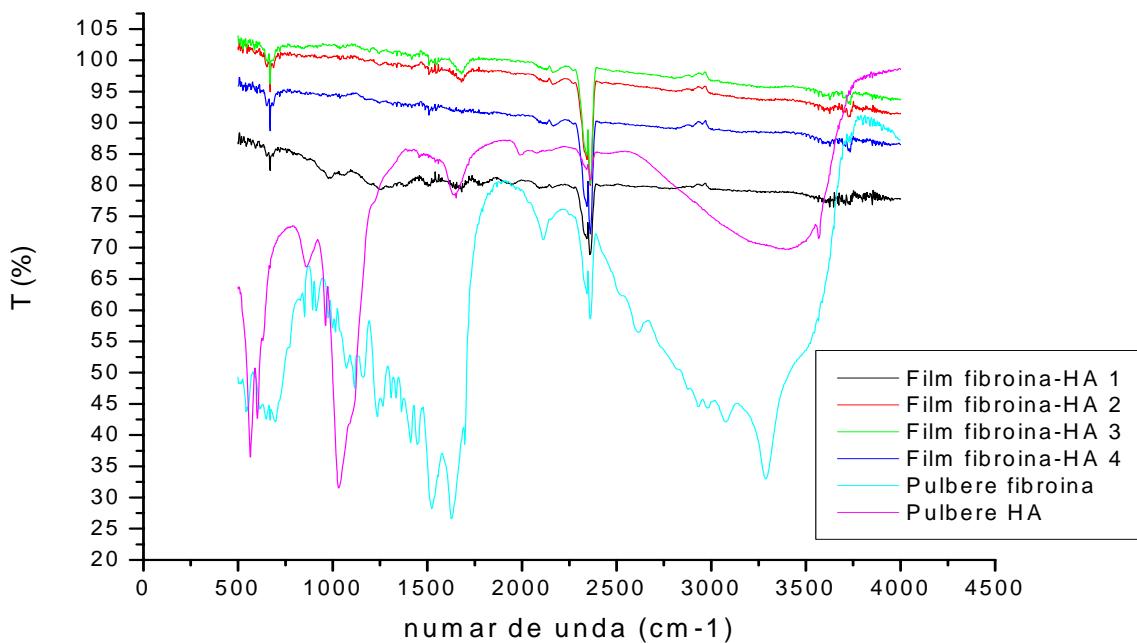


Fig. 4.34 Spectre FTIR comparate cu cele ale pulberii de fibroina: (a) Filme de fibroina depuse prin MAPLE din diverse tipuri de tinte; (b) Film de fibroina 5% din suspensie apoasa

In filmele de fibroina din suspensii, pozitiile benzilor/maximelor amidelor I, II, III sunt localizate la 1680, 1542 si 1246 cm⁻¹, fata de maximele amidice raportate la 1660, 1540 si 1240 sau 1250 cm⁻¹ ca reflectand structura secundara a fibroinei [218]. Aceleasi valori specifice in general formei amorfe r. c. a fibroinei sunt amintite si de alti autori: deformarea NH si C-N stretching, a amidei II r. c. la 1541 cm⁻¹ [240], amida I r.c. la 1658 sau 1660 cm⁻¹ [233, 362, 368.] sau amida I beta la 1695 cm⁻¹ sau 1700 cm⁻¹ [249, 364, 365].

Spectrele FTIR pe pulberi simple de HA, fibroina si pe filme de HA-polimer de fibroina (Fig. 4.35) au indicat ca filmele depuse din suspensia de HA (60%) – polimer (40%) contin cateva pozitii de absorbtie specifice ambelor materiale din hibrid, in special fibroinei: 1239 cm⁻¹, 1510 cm⁻¹, respectiv, 1680 cm⁻¹, usor deplasate dinspre 1230 cm⁻¹ (amida I r. c.), 1520 cm⁻¹ (amida II forma beta), 1660 cm⁻¹ (amida I, r.c), 1700 cm⁻¹ (amida I, beta) si un maxim neatribuit la 979 cm⁻¹, echivalent celui de la 977 cm⁻¹ din pulberea de fibroina. Dintre caracteristicile HA, in filmele compozite se disting doar maxime slab sesizabile la ~ 570 (PO₄) si 3562 cm⁻¹ (OH).



4.35 Filme compozite de fibroina si HA depuse prin MAPLE, spectre FTIR comparate cu cele ale pulberilor de baza.

Am atribuit faptul ca pentru aceasta prima serie de probe nu am putut distinge toate maximele FTIR specifice pulberilor precursoare cel mai probabil datorita faptului ca filmele MAPLE sunt prea subtiri (de cateva sute de nanometri, dupa cum reiese din imaginile AFM). Din acest motiv, am realizat urmatoarele studii cu concentratii mai mari de substanta polimerica si cu filme mai groase (numar mai mare de pulsuri laser, 50 000, vs. 20 000).

- Microscopia de Forta Atomica (AFM)

Imaginiile AFM (Fig. 4.36) indica primele filme de fibroina si de HA-fibroina ca avand un relief de cateva sute de nm, cu morfologie relativ uniforma si ingloband picaturi, aspect specific depunerilor MAPLE.

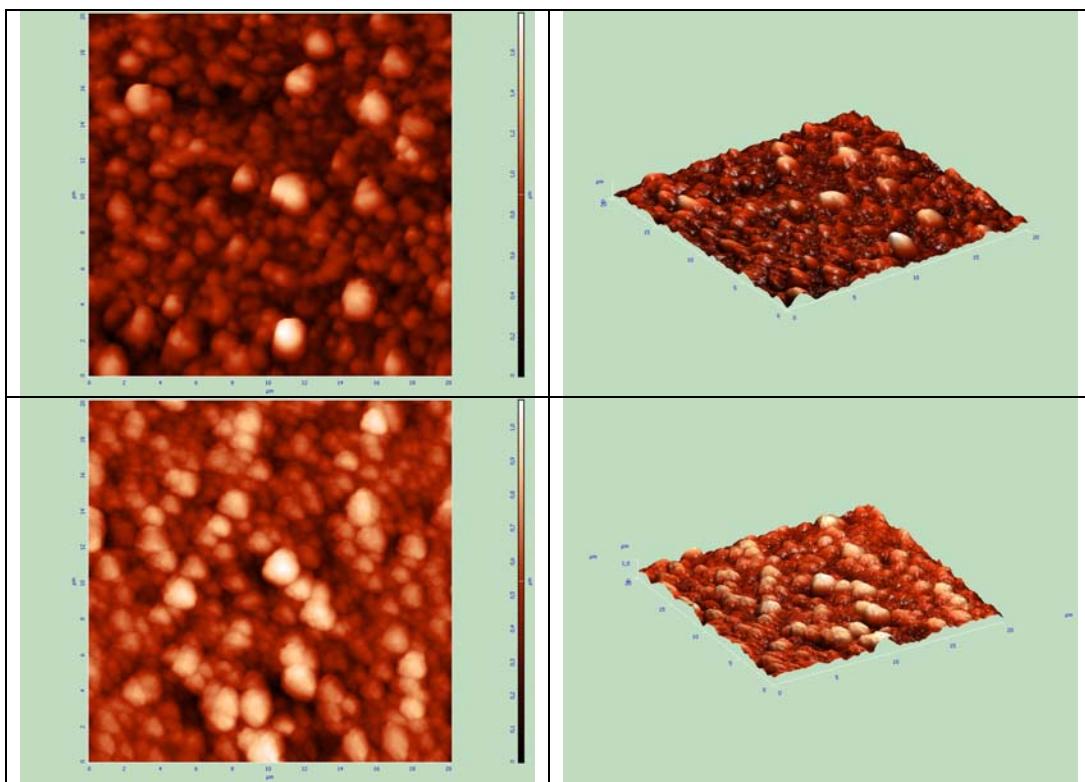


Fig. 4.36 Imagini AFM ale unor filme MAPLE de fibroina (a, sus), respectiv compozit, de fibroina si hidroxiapatita (b, jos)

- Difractie de Raze X

Spectrele XRD ale filmelor de fibroina simple si ale celor compozite HA-fibroina (Fig. 4.37) prezinta un maxim larg centrat in jurul valorii de 20° , caracteristic fibroinei [362, 363]. Forma acestuia sugereaza compozitia predominant amorfa a fibroinei in filmele obtinute.

Se stie ca HA este prezenta in faza amorfa atunci cand este depusa prin PLD la temperatura camerei [165, 369, 370]. Din acest motiv, in spectrul filmului compozit nu sunt prezente maxime XRD specifice HA.

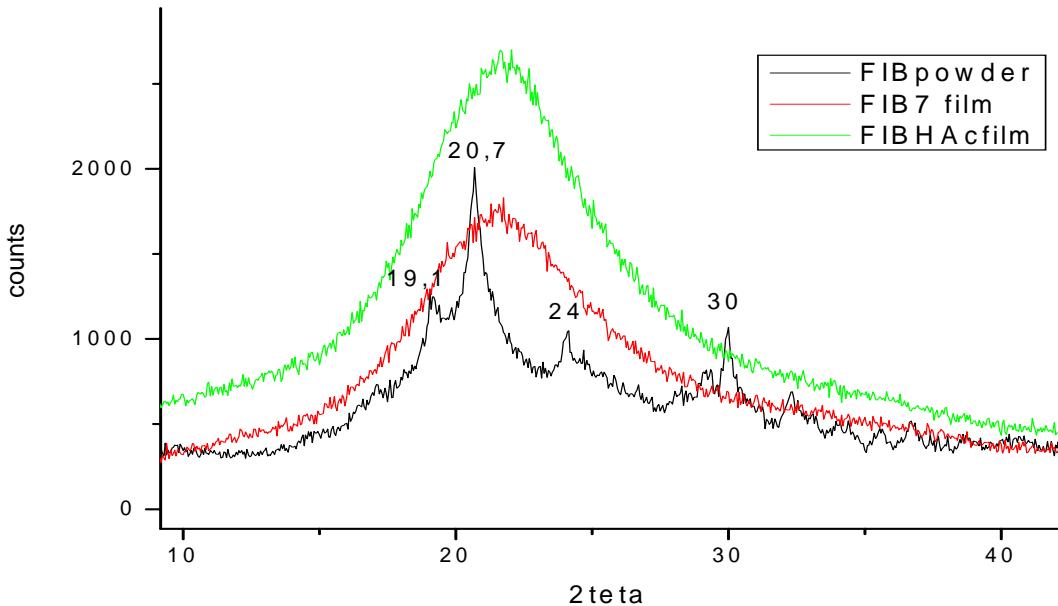


Fig. 4.37 Spectre XRD ale filmelor de fibroina si compozite HA-fibroina depuse prin MAPLE pe Si dublu polisat

4.3.1. 2 Analize biologice *in vitro*

- Teste *in vitro*

Toate variantele testate de filme de fibroina sau compozite HA-fibroina prezinta aceleasi proprietati de biocompatibilitate ca si proba de control standard, de sticla borosilicata (Fig. 4.38). Reamintim pentru comparatie ca proba C corespunde reactivului MTS diluat in mediu, fara celule, si reprezinta controlul absolut, care se scade din valorile tuturor probelor, inclusiv a celei de sticla speciala de control.

Pulberea de fibroina simpla in solutie este cel mai putin biocompatibila, cel mai probabil datorita aciditatii: pH de 5,3, fata de pH-ul optim agreat de celule, 7,4. Cu toate acestea, asa cum indica testul MTS, transferata in forma de film subtire, fibroina devine biocompatibila.

Rezultatele testarii *in vitro* au fost corelate cu primele investigatii fizico-chimice, alaturi de care au reprezentat un factor-cheie in stabilirea regimului experimental optim de depunere.

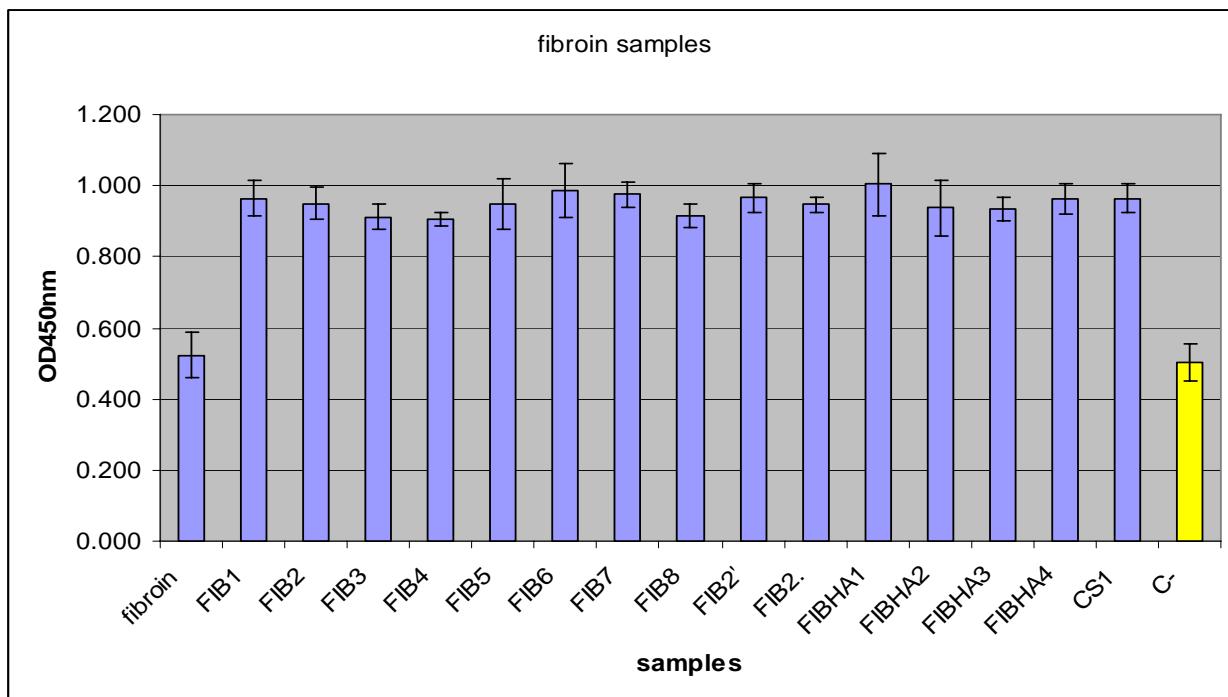


Fig. 4.38 Rezultatele testelor MTS pentru primul set de probe MAPLE pe baza de fibroina si pentru probele de control

Analiza XRD sugereaza reproductibilitatea stoichiometrica a compusilor din tinta in filme, atestand proprietatile corespunzatoare ale depunerilor de composit. De subliniat, analizele FTIR demonstreaza ca prepararea tintei poate fi facuta prin metoda cea mai simpla, a suspensiei apoase de fibroina, fara realizarea prealabila a solutiilor sarate sature si a tehniciilor urmatoare, complicate, de separare a fibroinei din aceste solutii. Astfel si dat fiind ca toate probele au prezentat relativ acelasi comportament pozitiv de biocompatibilitate, urmatoarele serii de experimente s-au rezumat la probe realizate din suspensii simple de fibroina si, respectiv, de hibrid HA-fibroina.

4.3.2 Al doilea set de probe

4.3.2.1 Analize fizico-chimice

Spectroscopie FTIR. Spectrele FTIR ale filmelor simple si hibride (Fig. 4.39) indica transferul stoichiometric al filmelor compositive, evidențiind maximele de absorbtie specifice ambelor componente, HA si fibroina.

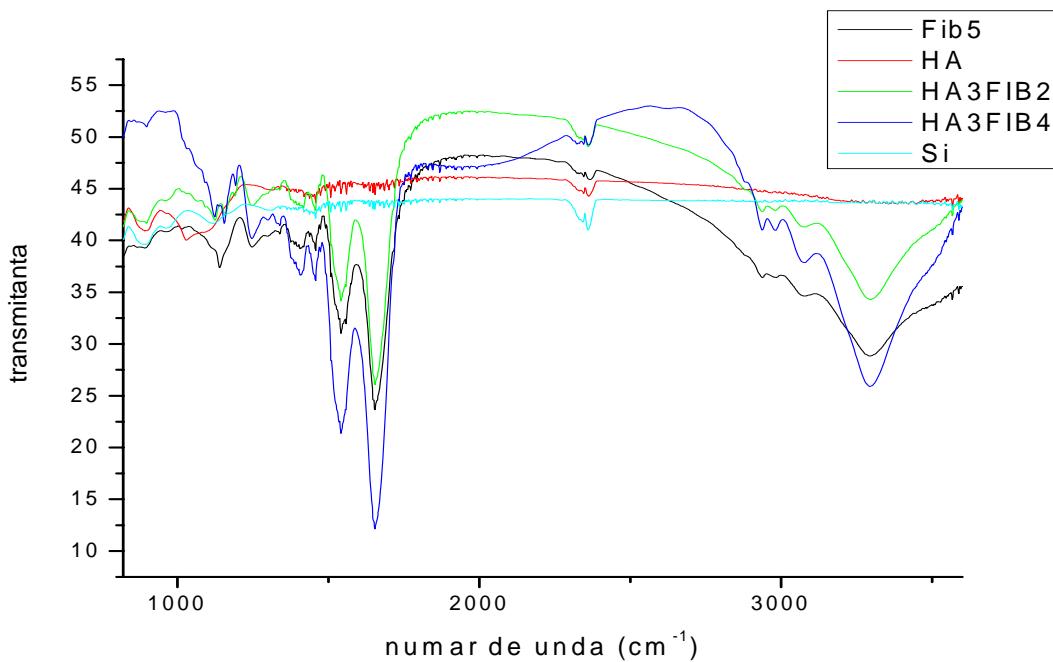


Fig. 4.39 Spectre FTIR ale filmelor de HA, FIB si compozite HA+FIB pe Si dublu polisat

In ceea ce priveste **fibroina**, se disting:

- maxime de absorbtie specifice gruparilor amidice, in pozitii caracteristice formei amorse a fibroinei (spirala dezordonata, r.c.): 1540 cm^{-1} amida II, 1654 cm^{-1} amida I, 1243 cm^{-1} amida III;
- banda puternica de absorbtie $\sim 3309\text{ cm}^{-1}$, intindere NH;
- in regiunea vibratiilor de intindere specifice scheletului proteinei ($1100\text{--}900\text{cm}^{-1}$): banda la 1015 cm^{-1} si benzi gemene, slabe, din secventele periodice $-(\text{gly-gly})-$ si $-(\text{gly-ala})-$, la 998 si 975 cm^{-1} [364];
- $1137\text{--}1140\text{ cm}^{-1}$ pentru filme simple de fibroina.

Atat filmele de **fibroina** cat si cele **compozite** prezinta absorbtie la 2980 , 2934 , 3073 cm^{-1} (*neatribuite*) si 3290 ($\sim 3309\text{ cm}^{-1}$, NH) cm^{-1} . De asemenea, filmele compozite pastreaza maximele amidelor in forma amorfa (r. c.), la 1540 cm^{-1} , 1654 cm^{-1} , 1243 cm^{-1} .

Maximele de absorbtie de la 1156 si 1192 cm^{-1} sunt prezente doar in filmele **compozite** (*neatribuite*).

Absorbtia la 1027 cm^{-1} , specifica gruparii PO_4 , este prezenta doar pentru filmul de **HA** si filmele compozite.

Difractie de raze X. Cum reiese din difractogramele reunite in Fig. 4.40, constatarile din spectrele XRD anterioare se confirmă și pentru ultimul set de probe.

In filmele de fibroina și în cele hibride de tip HA3+FIB4 se distinge un maxim de difractie la $20,5^\circ$ (specific formei cristaline de strat- β a fibroinei) pe un maxim mai larg centrat pe $21,5^\circ$ (posibila atribuire unui maxim al structurii cristaline de elice- α) și un alt maxim larg, dar mai slab ca intensitate, centrat pe 32° .

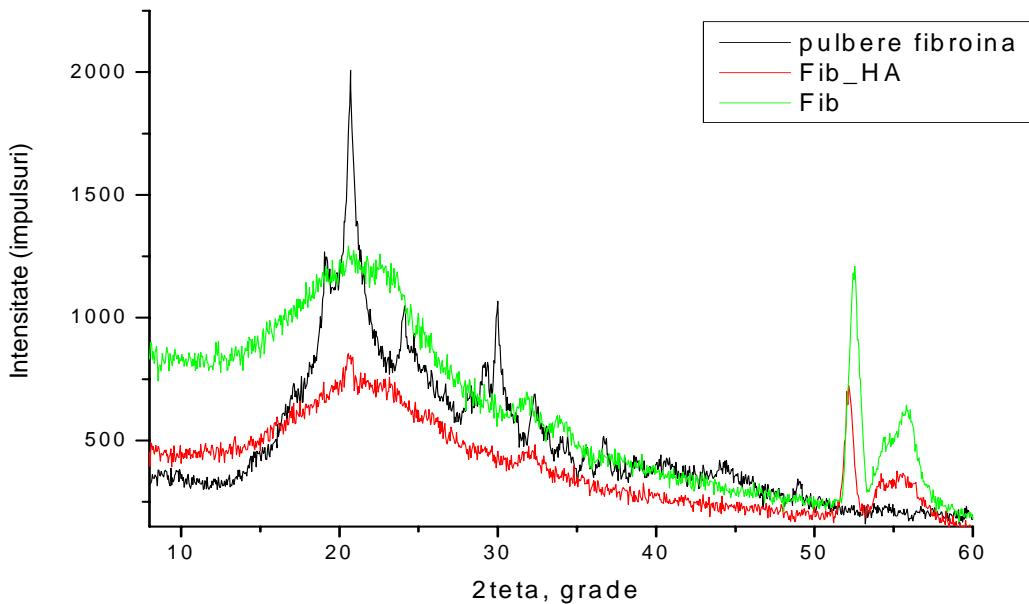


Fig. 4.40 Spectre XRD ale filmelor MAPLE de fibroina și HA-fibroina (HA3+FIB4) pe substraturi de siliciu

Microscopie de Forta Atomica. Imaginile AFM (**Fig. 4.41**) ale filmelor de matase și ale celor compozite HA-matase arată o morfologie specifică filmelor MAPLE, omogenă, dar cu o oarecare rugozitate, ce scade pe măsură ce particulele de matase sunt înglobate în filmele compozite. Aceasta topografie, cu arie activă extinsă, este recunoscută ca fiind favorabilă creșterii și aderenției celulare [304, 371-373].

Estimările AFM privind rugozitatea sunt prezentate împreună cu cele de nanoindentare și nanozgăriere, în secțiunea următoare.

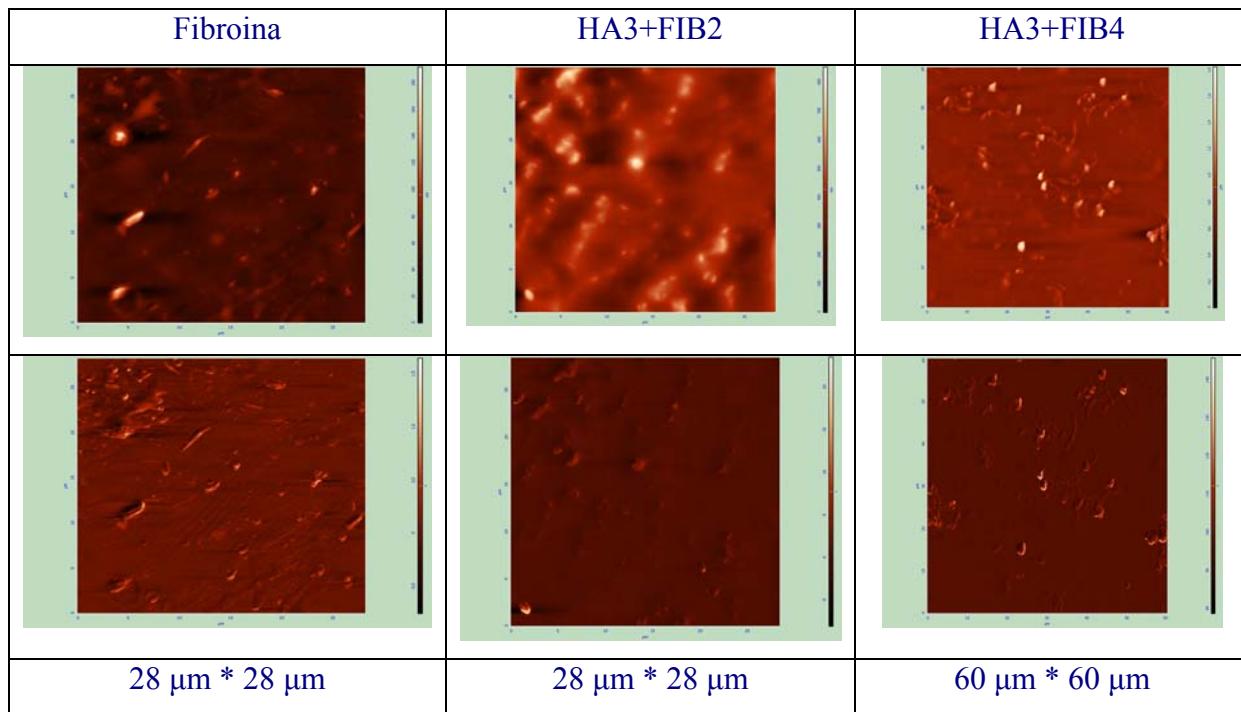


Fig. 4.41 Imagini AFM (a) în mod topografic, (b) în mod contrast de fază, ale filmelor de fibroină și de HA-fibroină depuse prin MAPLE

Nanoindentare. Pentru evaluarea proprietăților mecanice (nanoduritate, aderență) sunt necesare filme mai netede sau mult mai groase. Prin urmare, prin nanoindentare (NHT, CSM Instruments) am putut estima doar parametrii de rugozitate ai filmelor testate.

Remarcam din tabelul 4.8 o diferență de ordin de marime între valorile acestor parametri înregistrate prin testări diferite. Evaluarea AFM indică valori de rugozitate varf-vale S_y , R_t de 106 nm – fibroină, 220 nm – HA3FIB4, 397 nm – HA3FIB2; respectiv rugozitate medie S_a , R_a de 4 nm – fibroină, 7 nm – HA3FIB4 și 76 nm - HA3FIB2). Cele determinate prin analizele de duritate sunt rugozitate varf-vale S_y , R_t de 3790 nm pentru fibroină și 3830 nm pentru HA3FIB2, respectiv rugozitate medie S_a , R_a de 406 nm pentru fibroină și 440 nm pentru HA3FIB2.

Considerăm că diferențele se datorează scalelor diferite de lucru ale celor două tipuri de instrumente. Într-adevar, în cazul AFM, valorile sunt măsurate pe o suprafață de $15 * 15 \mu\text{m}^2$, în timp ce valorile prin NHT sunt măsurate pe o lungime de 1,6 mm, iar la o asemenea distanță își

Tabel 4.8 Valori ale rugozitatii probelor estimate prin masuratori de microscopie de forta atomica (AFM) si de nanoindentare (NHT)

Rugozitate/ Proba	FIBROINA		HA3FIB2		HA3FIB4
	pe cuart, AFM, $15*15 \mu\text{m}^2$	pe Ti, NHT (1,6 mm lungime)	pe cuart, AFM, $15*15 \mu\text{m}^2$	pe Ti, NHT (1,6 mm lungime)	pe cuart, AFM, $15*15 \mu\text{m}^2$
Maxima, varf-la-varf / Peak-to-peak (nm), $S_v(R_t)$	106	3790	397	3830	220
Medie / Average	26	-	171	-	95
Rugozitate medie / Average roughness (nm), S_a	4,20	406	76	440	6,87
Radacina medie patratica/ Root mean square (nm), S_q	6,84	520	90	570	10
Ten point height (nm)/Media celor 10 puncte extreme, S_z	52	3274	198	3610	108

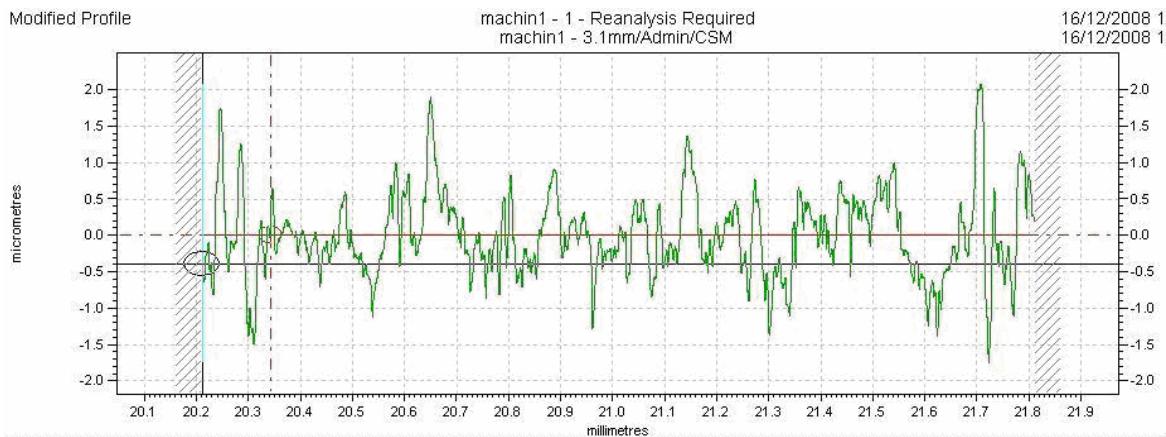
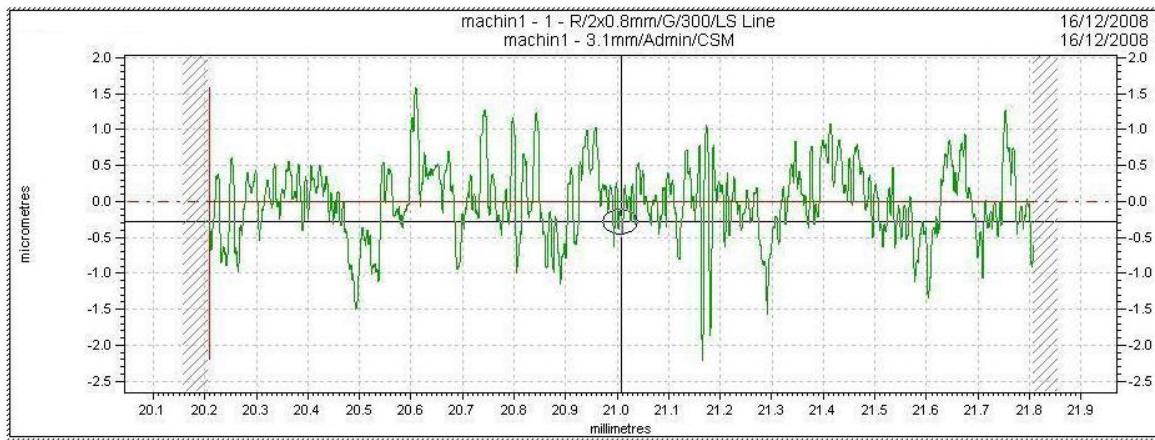


Fig. 4.42 Rugozitatea probelor de tip a) FiB5 si b) HA3+FIB2 estimata prin masuratori de nanoindentare (NHT)

face simtita influenta in special rugozitatea substratului.

Mai mult, masuratorile de AFM au fost facute pe filme pe baza de fibroina depuse pe substraturi de cuart, netede, in timp ce probele supuse testelor de rezistenta mecanica (indentare, zgariere) s-au efectuat pe probe depuse pe substraturi de Ti corodat. Rugozitatea titanului corodat, mentionata de producator, este de $R_a \sim 700$ nm ($200 * 200 \mu\text{m}^2$, evaluata prin microscopie confocala laser) sau, pentru o comparatie mai completa, $R_a \sim 440$ nm (masurata pe o suprafata de $15 * 15 \mu\text{m}^2$, prin AFM).

Din masuratorile de nanoindentare reiese aceeasi tendinta, de usoara aplatizare a rugozitatii, o data cu inglobarea fibroinei in filme.

- Microscopie electronica de baleaj, SEM

Imaginiile SEM ale filmelor de HA, fibroina si HA-fibroina pe substraturi de Si 111 dublu polisat (Fig. 4.43) confirmă topografia relevată de analiza AFM, în care prezenta HA accentuează relieful suprafetei.

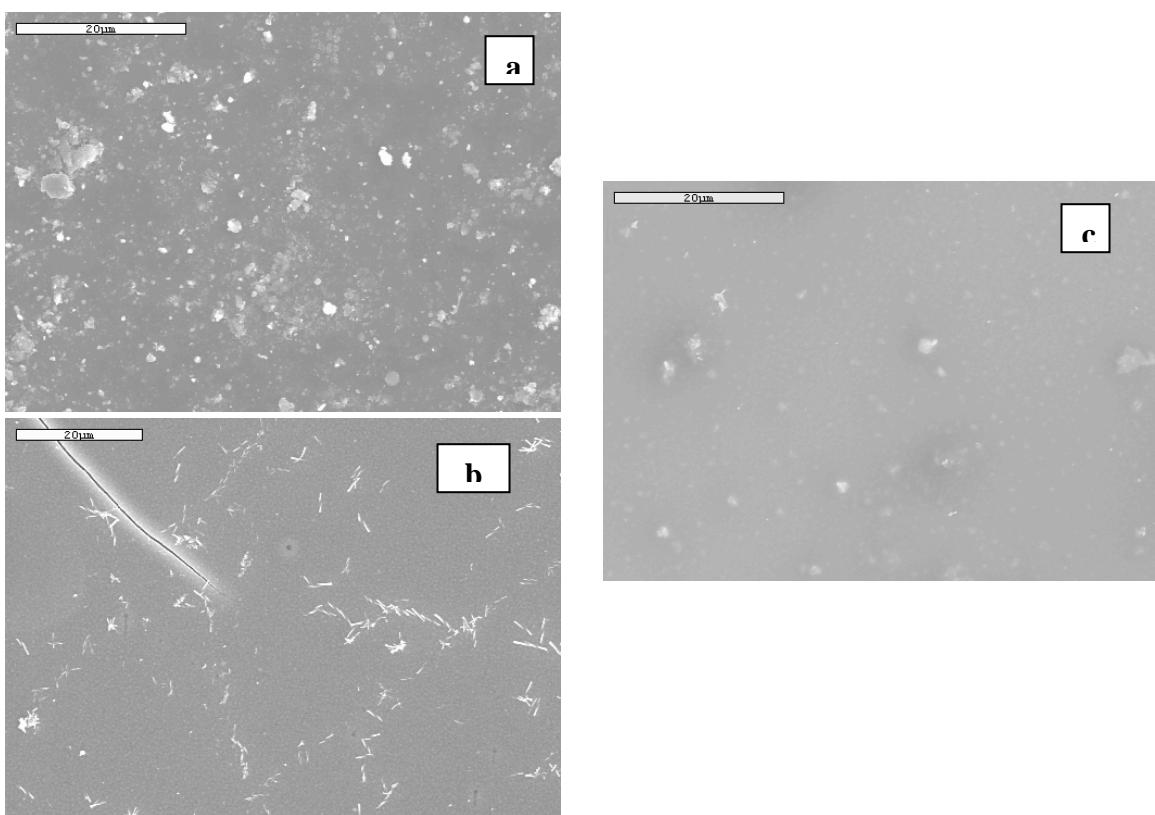


Fig. 4.43 Imagini SEM pe filme de HA (a), fibroina (b), HA3+FIB2 (c)

4.3.2.2 Analize biologice *in vitro*

Testele MTS pe al doilea set de probe au aratat ca viabilitatea celulara nu prezinta variatii majore intre probele testate (Fig. 4.44).

Nici una din variantele testate nu este toxica pe intervalul testat de 72 ore. Totusi, se constata ca probele care se aseamana cel mai mult materialului standard pentru cultura celulara (sticla borosilicata tratata) sunt FIB5, HA3FIB2 si apoi FIBNaOH, HA3FIB4 (Fig. 4.44).

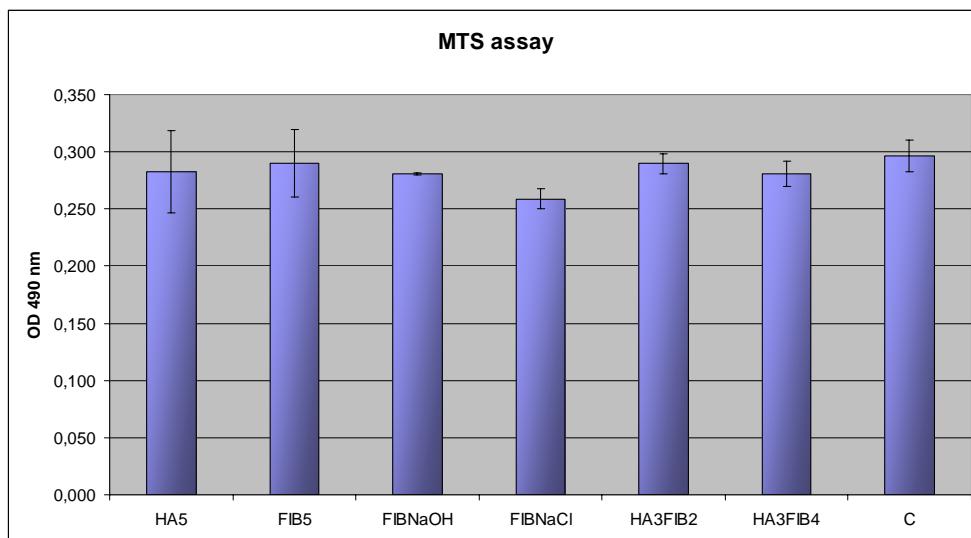


Fig. 4.44 Rezultatele testelor MTS pe al doilea set de probe MAPLE pe baza de fibroina si HA

Din acest set de probe, proba care genereaza viabilitatea cea mai scazuta este cea cu adaos de NaCl, FIBNaCl. (Fig. 4.44). Datele au fost confirmate de experimentele de imunofluorescenta efectuate cu colorantul ER-Tracker.

Din Figura 4.45 se observa o dispunere uniforma a celulelor pentru probele FIB5 si HA3FIB2. Celulele osoase sunt foarte bine intinse pe suport, comportament ce indica o buna interactie a acestora cu filmele depuse.

O interactie favorabila cu suprafata se observa si in cazul filmelor de FIBNaOH, confirmand datele de viabilitate prezentate mai sus.

In schimb, probele HA5 si FIBNaCl determina celulele sa adopte o morfologie heterogena predominant sferica, ceea ce indica o lipsa de compatibilitate a caracteristicilor fizico-chimice ale acestor materiale cu adeziunea celulara. Prin urmare straturile de HA simpla depuse

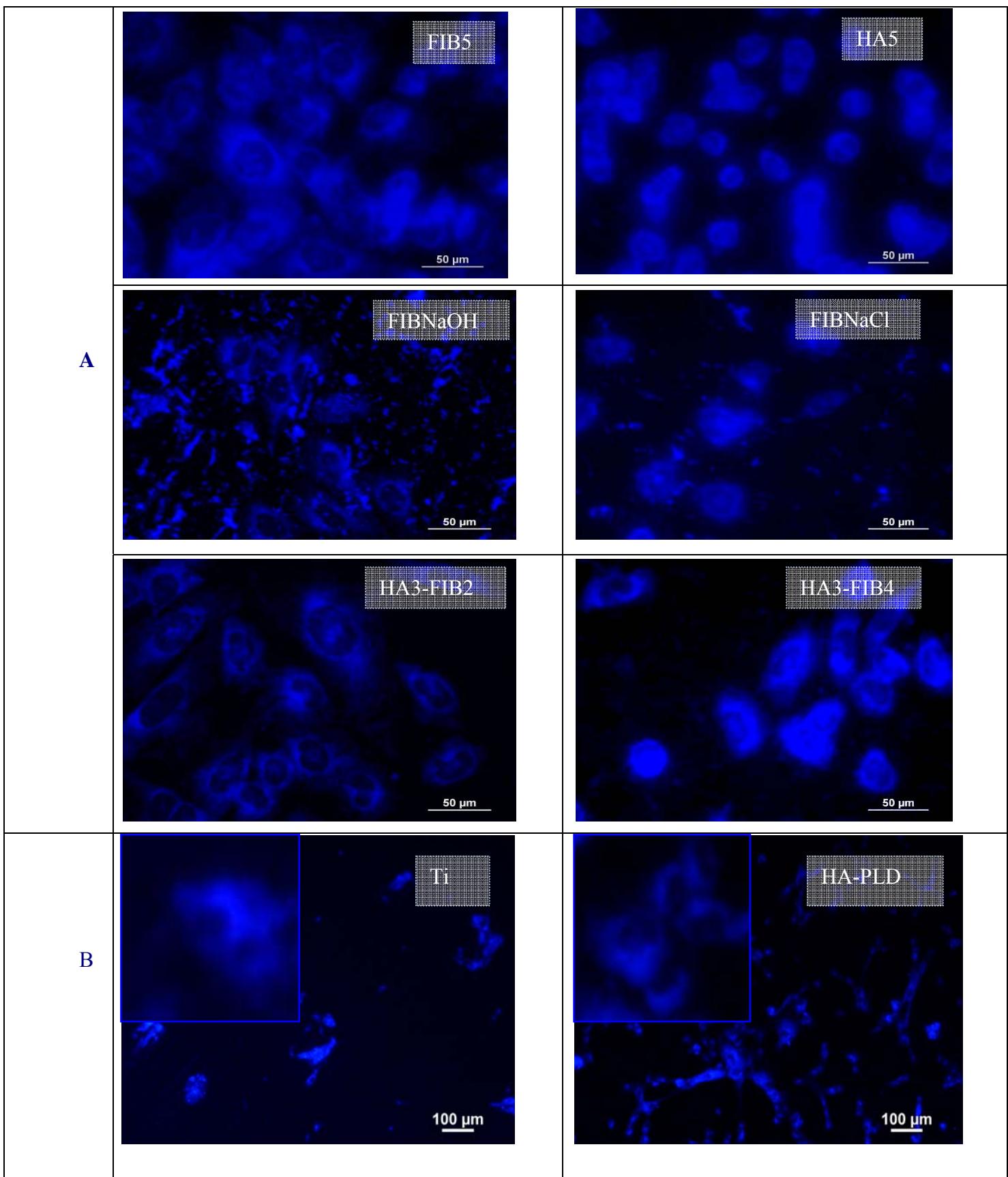
prin MAPLE, fiind total amorfă, nu prezintă un comportament biocompatibil adecvat activitatilor celulare (pentru comparatie, este cunoscut ca HA osoasa este o mixtura de faze cristaline inglobate in faza preponderent amorfă). De asemenea, reiese ca a doua metoda de neutralizare a solutiei usor acide de fibroina, prin adaugarea unei solutii saline de NaCl nu este favorabila imbunatatirii comportamentului celular. Am putea deduce ca, pentru acesti parametri de depunere MAPLE, filmele de HA sunt mai putin favorabile interactiunii celulare.

Mentionam insa ca, asa cum se arata in Fig 4.45 B, cresterea OB umane primare nu este impiedicata pentru filmele de HA pe titan depuse prin metoda PLD. Insertiile din Fig. 4.45 B cuprind sevante marite care ilustreaza distributia optima de colorant in reticulul endoplasmatic pentru aceste probe. Celulele osoase au crescut pe suportul de titan, dar proliferarea lor s-a dovedit mai putin eficienta decat in cazul titanului acoperit cu HA.

Ca si comportament intermediar, celulele crescute pe probele de tip HA3FIB4 prezinta o intindere semnificativa pe suprafata filmelor, desi distributia lor nu este uniforma si sunt mai rare decat cele crescute pe probele FIB5, FIBNaOH si HA3FIB2.

Imaginiile de microscopie de imunofluorescenta furnizeaza informatii despre capacitatea de aderare a OB cultivate pe suprafata filmelor FIB/Ti, HA+-FIB/Ti prin observarea dinamicii scheletului celular si a distributiei subcelulare a markerilor de adeziune: anticorpi antivinculina (pentru vinculina, in verde) si faloidina (pentru actina, in rosu) (Fig. 4.46). Filmele de fibroina determina o expresie slaba a vinculinei si o descrestere a numarului total de contacte focale. Filamentele de actina sunt mai putin intinse si celulele s-au raspandit mai putin uniform. Pe filmele de HA, care au emis semnale de autofluorescenta, nu s-a putut observa marcarea specifica. Celulele crescute pe titanul acoperit cu HA3+FIB4 prezinta structuri de actina si vinculina similar cu celulele crescute in conditii standard si cu cele pe titan, sugerand o adeziune foarte buna. Prin urmare, testele de adeziune celulara indica filmele subtiri MAPLE hibride de HA-fibroina ca cele mai favorabile activitatii OB.

Fig. 4.45 (pagina urmatoare) Imagini de fluorescenta: **A.** Marcarea cu marker ER-Tracker a celulelor SaOs2 crescute pe filmele subtiri de fibroina/Ti, HA/Ti si HA+FIB/Ti depuse prin MAPLE; **B.** Marcarea cu ER-Tracker a celulelor osteoblaste primare cultivate pe titan si pe acoperirile de HA depuse prin PLD



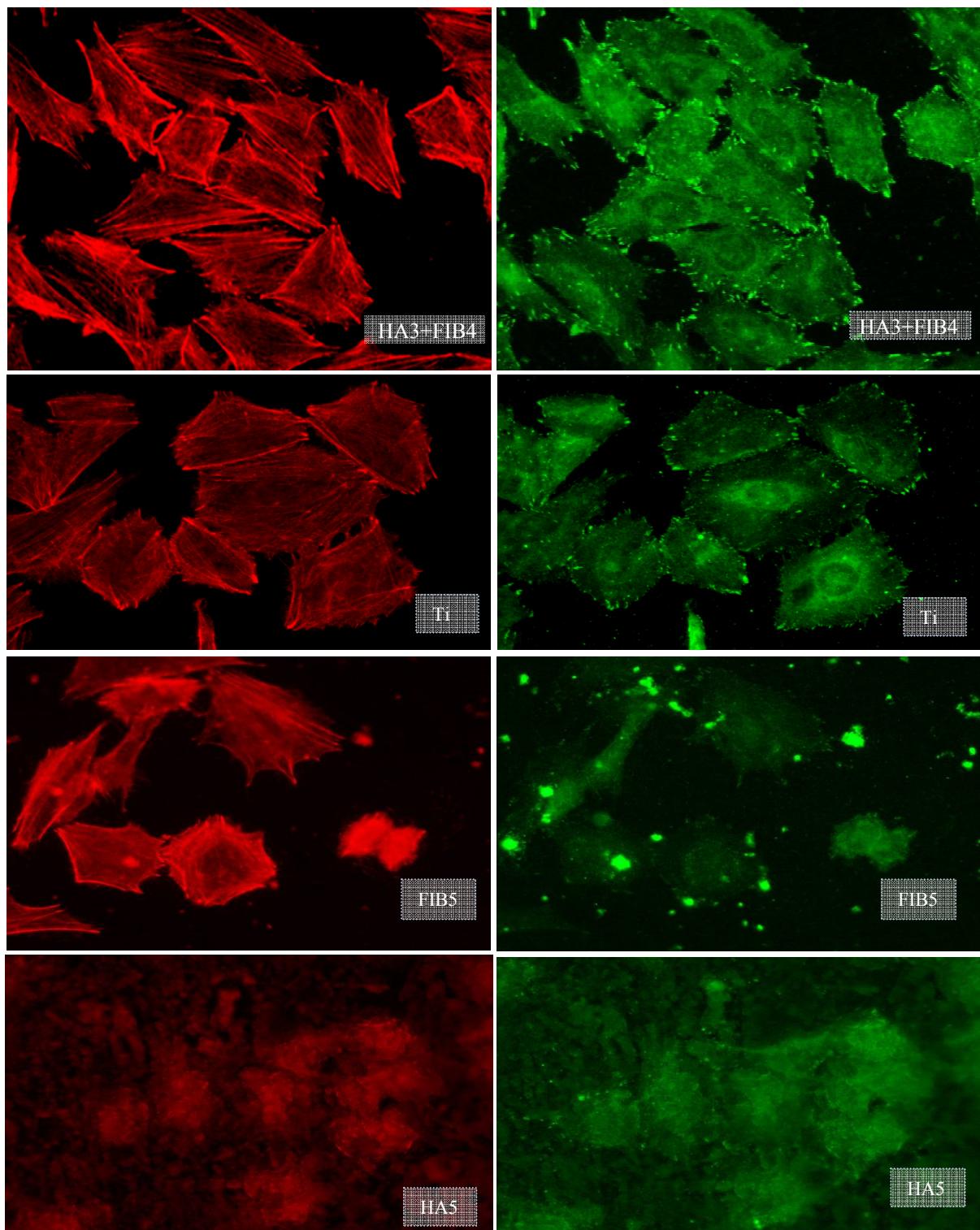


Fig. 4.46 Microscopie de fluorescenta. Adeziunea celulelor SaOs2 marcate pentru actina (in rosu) si pentru vinculina (in verde). Comparativ cu probele pe titan si cu filmele MAPLE de FIB5/Ti si HA5/ Ti, cele mai bune rezultate sunt inregistrate pentru probele de tip MAPLE HA3+FIB4/Ti

In concluzie, am realizat transferul stoichiometric si functional adevarat in strat subtire de biomaterial organic (HA-fibroina) folosind tehnica laser de depunere MAPLE [341]. Spectrele FTIR contin maxime de absorbtie specifice fibroinei in starea preponderent amorfa. Celulele de tip osteosarcoma cultivate pe probele de fibroina si HA-fibroina prezinta morfologie celulara normala, imprastiere buna si viabilitate crescuta. Celulele aplatizate si alungite indica o adeziune ferma a celulelor pe acoperirile simple de fibroina sau mixte HA-fibroina obtinute prin tehnica MAPLE.

Principalele rezultate prezentate despre acoperirile MAPLE de HA- fibroina in aceasta lucrare de doctorat au fost raportate si in articolul:

- *Composite biocompatible hidroxiapatite-silk fibroin coatings for medical implants obtained by matrix assisted pulsed laser evaporation*, **F. Miroiu**, G. Socol, A. Visan, N. Stefan, D. Craciun, V. Craciun, G. Dorcioman, A. Andronie, I. Stamatin, L.E. Sima, S. M. Petrescu, S. Moga, C. Ducu, I.N. Mihailescu, Mater. Sci. Eng. B **169** (2010) 151–158.

Capitolul 5

CONCLUZII

Rezultatele prezentate in aceasta teza au urmarit realizarea de filme subtiri biofuncionale osteoinductive pentru acoperirea implanturilor medicale si se inscriu in domeniul mai larg al dezvoltarii de tehnici si biomateriale pentru cresterea calitatii vietii.

Studiile noastre experimentale au reconfirmat faptul ca metoda de sinteza a filmelor subtiri prin ablatie cu radiatie laser in pulsuri este adevarata explorare si depasirea barierelor stiintifice si tehnologice ale cercetarilor actuale din domeniile fizicii suprafetei si ingineriei biomaterialelor. Aceste tehnici avansate de depunere cu laser a straturilor subtiri, ca Depunerea Laser Pulsata si Evaporarea Laser Pulsata Asistata de o Matrice, pot asigura, prin versatilitate si ajustarea parametrilor, controlul proprietatilor si functionalitatii bionanostructurilor sintetizate.

5.1 Straturi subtiri de fosfati de calciu

Utilizand tehnica de depunere cu laser pulsat am sintetizat filme subtiri de noi tipuri de fosfati de calciu hidratati simpli sau dopati. Alegerea optima a parametrilor experimentalii a condus la obtinerea de structuri partial cristaline similare tesutului osos: domenii nanocristaline inglobate in matrici amorfe si suprafete active extinse datorate prezentei picaturilor submicronice.

Ca si in cazul apatitelor naturale, in functie de cristalinitatea si tipul fosfatului de calciu, biodegradarea acoperirilor se produce in mod diferit, cu influenta asupra comportamentului celular. Acoperirile de octocalciu fosfat OCP sunt caracterizate de solubilitate ridicata in fluide biologice simulate si au un raspuns bun in teste de *in-vivo* (> 70 % fata de titan), astfel incat pot fi utilizate ca structuri bioresorbabile. Depunerile de hidroxiapatitata carbonatata dopata cu mangan Mn:CHA raman stabile la teste de biodegradabilitate, chiar si dupa 21 de zile de imersie in fluidele biologice simulate, fiind recomandate pentru implanturile neresorbabile sau lent resorbabile. Pot fi de asemenea depuse

multistructuri cu o suprafata resorbabila (OCP) in contact direct cu tesutul osos si una stabila (Mn:CHA) in contact cu partea metalica a protezei.

Masuratorile de rugozitate arata ca toate tipurile de implant studiate prezinta aceeasi contributie mecanica de intrepatrundere la formarea legaturii os-implant.

Rezultatele testelor *in vivo* de determinare a rezistentei mecanice pentru dispozitivele protetice prin extragere/desprindere demonstreaza ca cele trei tipuri de acoperiri din fosfati de calciu studiate (hidroxiapatita, hidroxiapatita carbonatata dopata cu mangan si octacalciul fosfat induc o atasare puternic imbunatatita, aproape dubla, comparativ cu cea a implanturilor de control (titan). Deosebit de important este faptul ca forta de desprindere a implantului este cu 25 % mai mare in cazul implanturilor acoperite cu Mn:CHA si cu 10% mai mare pentru cele cu OCP, fata de protezele cu HA comerciala.

Testele de desprindere a implanturilor reprezentand o evaluare functionala capabila sa masoare contributia efectului pur biologic de atasare osoasa prin legatura chimica, din experimentele si masuratorile noastre rezulta ca acoperirile nanostructurate cu noile tipuri de fosfati de calciu (OCP si Mn:CHA) conduc la o mai buna bioactivitate decat cele cu HA pura, prin imbunatatirea atasarii osoase a protezelor medicale metalice (titan).

Rezultatul pozitiv al acestor studii *in vivo* confirma potentialul ridicat pentru osteointegrare permanenta a implanturilor medicale biomimetice bazate pe dezvoltarea tehnologiilor de modificare a suprafetei.

5.2 Straturi subtiri de hibrizi hidroxiapatita-polimer maleic

Am reusit, in premiera pe plan national, depunerea prin metoda Depunerii Laser Pulsate Asistate de o Matrice (MAPLE) de acoperiri nanocomposite de tip anorganic-organic.

Caracterizarea prin spectroscopie FTIR a nanostructurilor hibride biocompatibile studiate hidroxiapatita + copolimer maleic a evideniat formarea de legaturi intre aceste doua faze.

Performantele biofunctionale specifice (morfologia, imprastierea, atasarea si proliferarea celulara, expresia si localizarea intracelulara a marcatorilor fenotipului osteoblastelor), testate *in vitro*, ale structurilor acoperiri compozite HA+copolimer maleic pe titan genereaza un mediu bine tolerat de celule si contributiv biologic superior fata de acoperirile simple de HA sau polimer maleic. Celulele osteoblaste adera ferm la substrat si suporta proliferarea controlata, validand posibilitatea utilizarii acestor implanturi functionalizate cu hibrizi anorganico-organici in implantologia ortopedica sau dentara.

Fara a minimiza aceste premise pozitive, subliniem necesitatea continuarii studiilor aprofundate privind efectul protezelor de titan acoperit cu hidroxiapatita-polimer maleic asupra proliferarii celulare accelerate si al formarii tesutului osos prin dezvoltarea si aplicarea de noi teste *in vivo* pe modele animale.

5.3 Straturi subtiri hibride de hidroxiapatita-fibroina

Am realizat prin MAPLE depunerea de filme hibride de hidroxiapatita si fibroina, un polimer natural inalt biocompatibil si deosebit de rezistent mecanic.

Investigatiile FTIR au furnizat spectre asemanatoare in cazul tuturor tipurilor de tinte provenite din solutii de polimer, sugerand ca prepararea tintei poate fi facuta prin metoda cea mai simpla, a suspensiei apoase de fibroina, evitand utilizarea prealabila a solutiilor saturate de sare si a tehnicielor ulterioare complicate, de separare a fibroinei din aceste solutii. Am eliminat in acest mod o procedura lunga, complexa si costisitoare de pregatire a materialului precursor.

Pentru filmele depuse in conditiile identificate ca optime, analizele FTIR si XRD, atat pentru filmele simple de polimer, cat si pentru cele hibride HA-polimer, au indicat un transfer cvasistoechiometric din tinta in forma de film subtire. S-a dovedit prin prezenta principalelor maxime de absorbtie (amide I, II, III) si de difractie (maximul larg, in domeniul $0\text{--}2\theta$ al fibroinei) specifice substantelor de baza ca transferul prin metoda aleasa, MAPLE, este posibil si corect. Fibroina din filme este un amestec de forma amorfa majoritara (spirala dezordonata r. c.) si forme cristaline (strat- β si elice- α).

Analizele AFM si SEM arata pentru filmele subtiri compozite HA-fibroina o topografie intermediara fata de cele simple de fibroina sau HA, cu picaturi micronice ce determina o suprafata extinsa a filmului, favorabila proliferarii si ancorarii celulelor osoase.

Testele biologice preliminare *in vitro* efectuate (viabilitate, adeziune) indica regimul optim de depunere al acoperirilor biomimetice hibride HA+FIB, recomandandu-le pentru teste ulterioare mai avansate *in vivo*, si validand, la acest nivel, compusul hibrid pentru aplicatiile medicale ortopedice. Performantele cele mai bune, din punct de vedere fizico-chimic si biologic au fost demonstate de filmele MAPLE compozite de tip HA3+FIB4.

In consecinta, am obtinut, prin identificarea unor regimuri experimentale optime, acoperiri biomimetice de fosfati de calciu similari celor biologici, cu ajutorul Depunerii cu Laser Pulsat, respectiv acoperiri biomimetice mixte organic-anorganic de hidroxiapatita-polimeri biocompatibili si bioactivi, prin tehnica inrudita, a Evaporarii Laser Pulsate Asistate de o Matrice.

Chiar daca, pentru nivelul destinat aplicatiilor medicale sunt inca necesare evaluari suplimentare, cu grad ridicat de complexitate si reproductibilitate, cercetarile raportate in aceasta teza atesta proprietatile acestor acoperiri ca fiind adecvate utilizarii in medicina reconstructiva.

In concluzie, studiile noastre au evideniat capacitatea tehnicilor de depunere cu laser pulsat de a sintetiza nanostructuri din biomateriale cu proprietati structurale si biologice dificil sau imposibil de obtinut prin alte metode, deschizand noi directii in biotehnologie.

BIBLIOGRAFIE

1. Epinette J-A., Thomas M. T. (Editori), *Fifteen years of clinical experience with hydroxyapatite coatings in joint arthroplasty*, Springer, 2004, Franta;
2. Leon, Betty, *Thin calcium phosphate coatings for medical implants*, Springer, 2009;
3. Dorozhkin, S.V., *Calcium orthophosphates*, J. Mater. Sci. **42** (2007) 1061–1095;
4. Dorozhkin, Sergey V., *Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine -Review*, Materials **2** (2009) 399-498; doi:10.3390/ma2020399, www.mdpi.com/journal/materials;
5. Dorozhkin, Sergey V., *Nanodimensional and Nanocrystalline Apatites and Other Calcium Orthophosphates in Biomedical Engineering, Biology and Medicine -Review*, Materials 2009, 2, 1975-2045; doi:10.3390/ma2041975, www.mdpi.com/journal/materials;
6. D. Bauerle, *Laser Processing and Chemistry*, Springer-Verlag, 3rd edition, 2000
7. J.C. Miller (Ed.), *Laser Ablation Principles and Applications*, Springer Verlag, Berlin, 1994;
8. M. Von Alleman, A. Blatter, *Laser-Beam Interactions with Materials: Physical Principles and Applications*, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1995;
9. R. Eason (Ed.), *Pulsed Laser Deposition of thin films: applications-led growth of functional materials*, Wiley & Sons, 2007;
10. Dorozhkin, Sergey V., *Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials*, J Mater Sci **44** (2009) 2343–2387;
11. Dorozhkin, Sergey V., *Calcium Orthophosphate-Based Biocomposites and Hybrid Biomaterials (Biomaterials-Properties, Production and Devices)*, Novinka, 2010;
12. Weiner S. and Wagner H. D., *The material bone: Structure-Mechanical Function Relations*, Annual Review of Materials Science **28** (1998) 271-298;
13. Burr DB, *The contribution of the organic matrix to bone's mechanical properties*, Bone **31** (2002) 8-11;
14. Thomson, R.C., Yaszemski, M.J., Powers, J.M., and Mikos, A.G.: *Hydroxyapatite fiber reinforced poly(α -hydroxy ester) foams for bone regeneration*. Biomaterials 19: 1935-1943, 1998;
15. Boccaccini A.R., Blaker J.J. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. Expert Rev Med Devices **2**(3) (2005) 303–17;
16. Chrisey D. B., A. Pique, R. A. McGill et al, *Laser Deposition of Polymer and Biomaterial Thin Films*, Chemical Reviews, 2003, **103**(2), 553-576;
17. Pique A., *Deposition of Polymers and Biomaterials Using the Matrix-Assisted Pulsed Evaporation (MAPLE) Process*, in R. Eason (Ed.) Pulsed Laser Deposition of Thin Films, Wiley-Interscience, 2007;
18. Ringisen B. R., J. Callahan, P. K. Wu, A. Pique, B. Spargo, R. A. McGill, M. Bucaro, H. Kim, D. M. Bubb, and D. B. Chrisey, *Novel Laser-Based Deposition of Active Protein Thin Films*, Langmuir 2001, **17**, 3472-3479;
19. Jacobs JJ, Gilbert JL, Urban RM. *Corrosion of metal orthopaedic implants*. J Bone Joint Surg Am. 1998 80:268–82;
20. Staffolani N, Damiani F, Lilli C, Guerra M, Staffolani NJ, Belcastro S, et al. *Ion release from orthodontic appliances*. J Dent. 1999 27: 449–53;
21. Nag S, Banerjee R, Fraser HL, *Microstructural evolution and strengthening mechanisms in Ti-Nb-Zr-Ta, Ti-Mo-Zr-Fe and Ti-15Mo biocompatible alloys*, Mater Sci Eng C 2005; 25; 357-62
22. N. J. Hallab, K. Mikecz, C. Vermes, a. Skipor and J. J. Jacobs, Mol. Cell Biochem. 222 (2001) 127;

23. G. M. Keegan, I. D. Learmonth and C. P. Case, *Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient*, J. Bone and Joint Surg. 89B (2007) 567-573;
24. T. Hanawa, *Metal ion release from metal implants*, Materials Science and Engineering: C 24(6-8), (2004) 745-752
25. LeGeros, R.Z. *Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine*; Karger: Basel, Switzerland, 1991; p. 210.
26. Elliott, J.C. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates* Studies in Inorganic Chemistry 18, Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1994; p. 404
27. Amjad, Z., Ed. *Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems*; Kluwer Academic Publishers: Boston, MA, USA, 1997; p. 529
28. Lowenstam, H.A.; Weiner, S. *On Biomineralization*; Oxford University Press: New York, USA, 1989; p. 324.
29. Vallet-Regí, M.; González-Calbet, J.M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues. *Prog. Solid State Chem.* 2004, 32, 1–31.
30. Weiner, S.; Addadi, L. Design strategies in mineralized biological materials. *J. Mater. Chem.* 1997, 7, 689–702.
31. Ong, J.L.; Chan, D.C.N. Hydroxyapatite and their use as coatings in dental implants: A review. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 1999, 28, 667–707.
32. Davies, J.E. *In vitro* modeling of the bone/implant interface. *Anat. Rec.* 1996, 245, 426–445.
33. Anselme, K. *Osteoblast adhesion on biomaterials*, *Biomaterials* 21 (2000) 667–681.
34. Suchanek, W.L.; Yoshimura, M. Processing and properties of hydroxyapatite-based biomaterials for use as hard tissue replacement implants. *J. Mater. Res.* 1998, 13, 94–117.
35. Hench, L.L. Bioceramics: From a concept to clinics. *J. Am. Ceram. Soc.* 1991, 74, 1487–1510.
36. Hench, L.L. Bioceramics. *J. Am. Ceram. Soc.* 1998, 81, 1705–1728.
37. Gauthier, O.; Bouler, J.M.; Weiss, P.; Bosco, J.; Daculsi, G.; Aguado, E. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calciumphosphate bone substitutes. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999, 47, 28–35.
38. Hing, K.A. Best, S.M.; Bonfield, W. Characterization of porous hydroxyapatite. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1999, 10, 135–145.
39. Carotenuto, G.; Spagnuolo, G.; Ambrosio, L.; Nicolais, L. Macroporous hydroxyapatite as alloplastic material for dental applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1999, 10, 671–676.
40. Brown, P.W., Constantz, B., Eds. *Hydroxyapatite and Related Materials*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 1994; p. 343.
41. Hughes, J.M.; Kohn, M.; Rakovan, J., Eds. *Phosphates: Geochemical, Geobiological and Materials Importance*; Mineralogical Society of America: Washington, D.C., USA, 2002; Series: Reviews in Mineralogy and Geochemistry, Vol. 48; p. 742.
42. Chow, L.C., Eanes, E.D., Eds. *Octacalcium Phosphate*; Monographs in Oral Science, 18, Karger: Basel, Switzerland, 2001; p. 168
43. Brès, E., Hardouin, P., Eds. *Les matériaux en phosphate de calcium. Aspects fondamentaux. /Calcium phosphate materials. Fundamentals*; Sauramps Medical: Montpellier, France, 1998; p. 176
44. Olszta, M.J.; Cheng, X.; Jee, S.S.; Kumar, R.; Kim, Y.Y.; Kaufmane, M.J.; Douglas, E.P.; Gower, L.B. Bone structure and formation: A new perspective. *Mater. Sci. Eng. R* 2007, 58, 77–116.
45. Traykova, T.; Aparicio, C.; Ginebra, M.P.; Planell, J.A. Bioceramics as nanomaterials. *Nanomedicine* 2006, 1, 91–106.
46. Cui, F.Z.; Li, Y.; Ge, J. Self-assembly of mineralized collagen composites. *Mater. Sci. Eng. R* 2007, 57, 1–27.

47. Meyers, M.A.; Chen, P.Y.; Lin, A.Y.M.; Seki, Y. Biological materials: Structure and mechanical properties. *Prog. Mater. Sci.* **2008**, *53*, 1–206.
48. Currey, J.D. *Hierarchies in biomineral structures*. *Science* **309**, 2005, 253–254.
49. Porter, A.E.; Nalla, R.K.; Minor, A.; Jinschek, J.R.; Kisielowski, C.; Radmilovic, V.; Kinney, J.H.; Tomsia, A.P.; Ritchie, R.O. A transmission electron microscopy study of mineralization in age-induced transparent dentin. *Biomaterials* **2005**, *26*, 7650–7660.
50. Kirkham, J.; Brookes, S.J.; Shore, R.C.; Wood, S.R.; Smith, D.A.; Zhang, J.; Chen, H.; Robinson, C. Physico-chemical properties of crystal surfaces in matrix-mineral interactions during mammalian biomineralisation. *Curr. Opin. Colloid Interf. Sci.* **2002**, *7*, 124–132.
51. Daculsi, G.; Mentanteau, J.; Kerebel, L.M.; Mitre, D. Length and shape of enamel crystals. *Calcif. Tissue Int.* **1984**, *36*, 550–555.
52. Robinson, C.; Connell, S.; Kirkham, J.; Shorea, R.; Smith, A. Dental enamel—a biological ceramic: Regular substructures in enamel hydroxyapatite crystals revealed by atomic force microscopy. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2242–2248.
53. Currey, J.D. Hierarchies in biomineral structures. *Science* 2005, **309**, 253–254.
54. Cui, F.Z.; Ge, J. New observations of the hierarchical structure of human enamel, from nanoscale to microscale. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2007**, *1*, 185–191.
55. He, L.H.; Swain, M.V. Enamel—A “metallic-like” deformable biocomposite. *J. Dent.* **2007**, *35*, 431–437.
56. Nelson, S.J. *Wheeler's Dental Anatomy, Physiology and Occlusion*, 9th ed.; W.B. Saunders: Philadelphia, PA, USA. 2009; p. 368
57. Ji, B.; Gao, H. Elastic properties of nanocomposite structure of bone. *Compos. Sci. Technol.* **2006**, *66*, 1212–1218.
58. Boskey, A. Bone mineral crystal size. *Osteoporosis Int.* **2003**, *14* (Suppl. 5), S16–S20; discussion S20–S21.
59. Alivisatos, A.P. Enhanced: Naturally aligned nanocrystals, *Science* **2000**, *289*, 736–737.
60. Gao, H.; Ji, B.; Jager, I.L.; Arz, E.; Fratzl, P., Materials become insensitive to flaws at nanoscale: Lessons from nature, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 5597–5660.
61. Gupta, H.S.; Seto, J.; Wagermaier, W.; Zaslansky, P.; Boesecke, P.; Fratzl, P. Cooperative deformation of mineral and collagen in bone at the nanoscale. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 17741–17746.
62. Narayan, R.J.; Kumta, P.N.; Sfeir, C.; Lee, D.H.; Choi, D.; Olton, D. Nanostructured ceramics in medical devices: applications and prospects. *JOM* **2004**, *56*, 38–43.
63. Williams, D.F. The relationship between biomaterials and nanotechnology. *Biomaterials* **29**, 2008, 1737–1738.
64. Moriarty, P. Nanostructured materials. *Rep. Prog. Phys.* **2001**, *64*, 297–381
65. Zou, C.; Weng, W.; Cheng, K.; Du, P.; Shen, G.; Han, G. Preparation of nanosized β -tricalcium phosphate particles with Zn substitution. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 1133–1136,
66. Ohsawa, H.; Ito, A.; Sogo, Y.; Yamazaki, A.; Ohno, T. Synthesis of albumin/DCP nanocomposite particles. *Key Eng. Mater.* **2007**, *330–332*, 239–242.
67. Murugan, R.; Ramakrishna, S. Bioresorbable composite bone paste using polysaccharide based nano hydroxyapatite. *Biomaterials* **2004**, *25*, 3829–3835
68. Murugan, R.; Ramakrishna, S. Aqueous mediated synthesis of bioresorbable nanocrystalline hydroxyapatite. *J. Cryst. Growth* **2005**, *274*, 209–213
69. Li, G.; Huang, J.; Li, Y.; Zhang, R.; Deng, B.; Zhang, J.; Aoki, H. *In vitro* study on influence of a discrete nano-hydroxyapatite on leukemia P388 cell behavior. *Biomed. Mater. Eng.* **2007**, *17*, 321–327

70. Ganesan, K.; Kovtun, A.; Neumann, S.; Heumann, R.; Epple, M. Calcium phosphate nanoparticles: Colloidally stabilized and made fluorescent by a phosphate-functionalized porphyrin. *J. Mater. Chem.* **2008**, *18*, 3655–3661
71. Kim, H.W.; Kim, H.E. Nanofiber generation of hydroxyapatite and fluorohydroxyapatite bioceramics. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2005**, *77B*, 323–328
72. Cihlar, J.; Castkova, K. Direct synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by hydrothermal hydrolysis of alkylphosphates. *Monatshefte für Chemie* **2002**, *133*, 761–771
73. Lak, A.; Mazloumi, M.; Mohajerani, M.; Kajbafvala, A.; Zanganeh, S.; Arami, H.; Sadrnezhaad, S.K. Self-assembly of dandelion-like hydroxyapatite nanostructures via hydrothermal method. *J. Am. Ceram. Soc.* **2008**, *91*, 3292–3297
74. Grainger, D.W.; Castner, D.G. Nanobiomaterials and nanoanalysis: Opportunities for improving the science to benefit biomedical technologies. *Adv. Mater.* **2008**, *20*, 867–877.
75. Hahn, H. Unique features and properties of nanostructured materials. *Adv. Eng. Mater.* **2003**, *5*, 277–284.
76. Thomas, V.; Dean, D.R.; Vohra, Y.K. Nanostructured biomaterials for regenerative medicine. *Curr. Nanosci.* **2006**, *2*, 155–177.
77. Balasundaram, G.; Webster, T.J. A perspective on nanophase materials for orthopedic implant applications. *J. Mater. Chem.* **2006**, *16*, 3737–3745.
78. Balasundaram, G.; Webster, T.J. Nanotechnology and biomaterials for orthopedic medical applications. *Nanomedicine* **2006**, *1*, 169–176.
79. Tasker, L.H.; Sparey-Taylor, G.J.; Nokes, L.D. *Applications of nanotechnology in orthopaedics*, Clin. Orthop. Relat. Res. **2007**, *456*, 243–249.
80. Rehman, I. *Nano bioceramics for biomedical and other applications*. Mater. Technol. **19**, 2004, 224–233.
81. Sato, M.; Webster, T.J. Nanobiotechnology: *Implications for the future of nanotechnology in orthopedic applications*. Expert Rev. Med. Dev. **1** (2004) 105–114.
82. Chan, C.K.; Kumar, T.S.S.; Liao, S.; Murugan, R.; Ngiam, M.; Ramakrishnan, S. *Biomimetic nanocomposites for bone graft applications*. Nanomedicine **1**, 2006, 177–188.
83. Webster, T.J.; Ergun, C.; Doremus, R.H.; Siegel, R.W.; Bizios, R. Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics. *Biomaterials* **2001**, *22*, 1327–1333.
84. Sun, W.; Chu, C.; Wang, J.; Zhao, H. *Comparison of periodontal ligament cells responses to dense and nanophase hydroxyapatite*. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18*, 677–683
85. Lewandrowski, K.U.; Bondre, S.P.; Wise, D.L.; Trantolo, D.J., *Enhanced bioactivity of a poly(propylene fumarate) bone graft substitute by augmentation with nano-hydroxyapatite*. *Biomed. Mater. Eng.* **13**, **2003**, 115–124.
86. Zhou, D.S.; Zhao, K.B.; Li, Y.; Cui, F.Z.; Lee, I.S., *Repair of segmental defects with nanohydroxyapatite/collagen/PLA composite combined with mesenchymal stem cells*. *J. Bioactive Compat. Polym.* **2006**, *21*, 373–384.
87. Xu, Z.; Sun, J.; Changsheng, L.; Jie, W. Effect of hydroxyapatite nanoparticles of different concentrations on rat osteoblast. *Mater. Sci. Forum* **2009**, *610–613*, 1364–1369
88. Kay, M.I.; Young, R.A.; Posner, A.S. Crystal structure of hydroxyapatite. *Nature* **204**, 1964, 1050-1052
89. Elliott, J.C.; Mackie, P.E.; Young, R.A., *Monoclinic hydroxyapatite*, *Science* **180**, 1973, 1055-1057
90. G. Montel, G. Bonel, J.C. Heughebaert, J.C. Trombe, C. Rey: *J. Cryst. Growth* **53** (1981), 74
91. Rey, Christian; Combes, Christèle; Drouet, Christophe and Sfihi, H. *Chemical Diversity of Apatites*. Advances in Science and Technology **49** (2006) 27-36

92. Armulik A, Svineng G, Wennerberg K, Faessler R, Johansson S., *Expression of integrin subunit beta1B in integrin beta1-deficient GD25 cells does not interfere with alphaVbeta3 functions*, Exp Cell Res 2000; **254**:55–63
93. O. Guillet-Noël, R. Gomez-San Roman, J. Perrière, J. Hermann, V. Craciun, C. Boulmer-Leborgne, P. Barboux, *Growth of apatite films by laser ablation: Reduction of the droplet areal density*, J. Appl. Phys., **80** (3), 1803 - 1808 (1996)
94. Brown, W.E.; Mathew, M.; Tung, M.S. Crystal chemistry of octacalcium phosphate. *Prog. Cryst. Growth Charact.* 1981, **4**, 59-87;
95. Iijima, M.; Nelson, D.G.A.; Pan, Y.; Kreinbrink, A.T.; Adachi, M.; Goto, T.; Moriwaki, Y. *Fluoride analysis of apatite crystals with a central planar OCP inclusion: concerning the role of F- ions on apatite / OCP / apatite structure formation*, Calcif Tissue Int. **59**(5) (1996) 377-84.
96. Bodier-Houllé, P.; Steuer, P.; Voegel, J.C.; Cuisinier, F.J.G., *First experimental evidence for human dentine crystal formation involving conversion of octacalcium phosphate to hydroxyapatite*, Acta Crystallogr., Sect D: Biol. Crystallogr. **54** (1998), 1377-1381.
97. Aoba, T.; Komatsu, H.; Shimazu, Y.; Yagishita, H.; Taya, Y. Enamel mineralization and an initial crystalline phase. *Connect. Tissue Res.* **1998**, **38**, 129-137.
98. W. E. Brown, *Octacalcium Phosphate and Hydroxyapatite: Crystal Structure of Octacalcium Phosphate*, Nature **196** (1962) 1048-1050;
99. W. E. Brown, J.P. Smith, J. R. Lehr, A. W. Frazier, *Octacalcium Phosphate and Hydroxyapatite: Crystallographic and Chemical Relations between Octacalcium Phosphate and Hydroxyapatite*, Nature **196** (1962) 1050-105
100. Brown, W.E. Crystal growth of bone mineral. *Clin. Orthop. Relat. Res.* **1966**, **44**, 205-220.
101. LeGeros, R.Z. *Variations in the crystalline components of human dental calculus: I. crystallographic and spectroscopic methods of analysis*. J. Dent. Res. 1974, **53**, 45-50.
102. Schroeder, H. *Formation and inhibition of dental calculus*. J. Periodontol. 1969, **40**, 643-646.
103. Kamakura, S.; Sasano, Y.; Homma, H.; Suzuki, O.; Kagayama, M.; Motegi, K. *Implantation of octacalcium phosphate (OCP) in rat skull defects enhances bone repair*. J. Dent. Res. 1999, **78**, 1682-1687;
104. Kamakura, S.; Sasano, Y.; Homma, H.; Suzuki, O.; Kagayama, M.; Motegi, K. *Implantation of octacalcium phosphate nucleates isolated bone formation in rat skull defects*. Oral Dis. 2001, **7**, 259-265;
105. Suzuki, O.; Kamakura, S.; Katagiri, T.; Nakamura, M.; Zhao, B.; Honda, Y.; Kamijo, R., *Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite*, Biomaterials 2006, **27**, 2671-2681;
106. Suzuki, O.; Imaizumi, H.; Kamakura, S.; Katagiri, T. *Bone regeneration by synthetic octacalcium phosphate and its role in biological mineralization*. Cur. Med. Chem. 2008, **15**, 305-313;
107. Kikawa, T.; Kashimoto, O.; Imaizumi, H.; Kokubun, S.; Suzuki, O., *Intramembranous bone tissue response to biodegradable octacalcium phosphate implant*. Acta Biomater. 2009, **5**(5):1756-66
108. Rey, C.; Combes, C.; Drouet, C.; Sfihi, H.; Barroug, A., *Physico-chemical properties of nanocrystalline apatites: Implications for biominerals and biomaterials*, Mater. Sci. Eng. C , **27**, 2007 198–205
109. Brown, P.W.; Martin, R.I. *An analysis of hydroxyapatite surface layer formation*. J. Phys. Chem. B **103**, **1999**, 1671-1675.
110. Honghui, Z.; Hui, L.; Linghong, G. *Molecular and crystal structure characterization of calcium-deficient apatite*. Key Eng. Mater., **330-332** (2007) 119-122

111. Mirtchi, A.A.; Lemaître J.; Munting, E., *Calcium phosphate cements: study of the β -tricalcium phosphate – dicalcium phosphate – calcite cements*. Biomaterials **1990**, *11*, 83-88.
112. Mirtchi, A.A.; Lemaître J.; Munting, E., *Calcium phosphate cements: effect of fluorides on the setting and hardening of β -tricalcium phosphate – dicalcium phosphate – calcite cements*. Biomaterials **1991**, *12*, 505-510.
113. Lemaître J.; Munting, E.; Mirtchi, A.A., *Setting, hardening and resorption of calcium phosphate ionic cements*. Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac. **1992**, *93*, 163-165.
114. Ohura, K.; Bohner, M.; Hardouin, P.; Lemaître, J.; Pasquier, G.; Flautre, B. *Resorption of, and bone formation from, new β -tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: an in vivo study*. J. Biomed. Mater. Res. **1996**, *30*, 193-200.
115. Metsger, D.S.; Driskell, T.D.; Paulsrud, J.R. Tricalcium phosphate ceramic – a resorbable bone implant: review and current status, *J. Am. Dent. Assoc.* **1982**, *105*, 1035-1038.
116. Yamamoto, H.; Niwa, S.; Hori, M.; Hattori, T.; Sawai, K.; Aoki, S.; Hirano, M.; Takeuchi, H., *Mechanical strength of calcium phosphate cement in vivo and in vitro*, Biomaterials **1998**, *19*, 1587-1591
117. Fernández, E.; Gil, F.J.; Ginebra, M.P.; Driessens, F.C.M.; Planell, J.A.; Best, S.M. Production and characterization of new calcium phosphate bone cements in the CaHPO₄ – α -Ca₃(PO₄)₂ system: pH, workability and setting times. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1999**, *10*, 223-230.
118. Oda, M.; Takeuchi, A.; Lin, X.; Matsuya, S.; Ishikawa, K., *Effects of liquid phase on basic properties of α -tricalcium phosphate-based apatite cement*, *Dent. Mater. J.* **2008**, *27*, 672-677.
119. Lecomte, A.; Gautier, H.; Bouler, J.M.; Gouyette, A.; Pegon, Y.; Daculsi, G.; Merle, C. *Biphasic calcium phosphate: a comparative study of interconnected porosity in two ceramics*, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater* **84B**, 2008, 1-6.
120. Wang, J.; Chen, W.; Li, Y.; Fan, S.; Weng, J.; Zhang, X. *Biological evaluation of biphasic calcium phosphate ceramic vertebral laminae*, Biomaterials **1998**, *19*, 1387-1392.
121. Daculsi, G., *Biphasic calcium phosphate concept applied to artificial bone, implant coating and injectable bone substitute*, Biomaterials **1998**, *19*, 1473-1478.
122. Daculsi, G.; Weiss, P.; Bouler, J.M.; Gauthier, O.; Millot, F.; Aguado, E., *Biphasic calcium phosphate / hydrosoluble polymer composites: a new concept for bone and dental substitution biomaterials*, *Bone* **1999**, *25* (Suppl. 2), 59S-61S.
123. LeGeros, R.Z. Lin, S.; Rohanizadeh, R.; Mijares, D.; LeGeros, J.P. Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **14**, 2003, 201-209.
124. Daculsi, G.; Laboux, O.; Malard, O.; Weiss, P. Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **14**, 2003, 195-200.
125. Sun, L.; Berndt, C.C.; Gross, K.A.; Kucuk, A. Review: material fundamentals and clinical performance of plasma sprayed hydroxyapatite coatings. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **2001**, *58*, 570-592
126. Z. Zyman, J. Weng, X. Liu, X. Zhang, and Z. Ma. *Biomaterials* **3** (1993) 225; Z. Zyman, J. Weng, X. Liu, X. Li and X. Zhang, *Biomaterials* **2** (1994) 151;
127. W. Tong, J. Chen, X. Li, Y. Cao, Z. Yang, J. Feng, and X. Zang, *Biomaterials* **17** (1996) 1507
128. J. A. Jansen, J. P. C. M. Van Der Waerden, and X. Zhang, *Journal of Biomedical Materials Research* **279** (1993) 603;
129. D. Busen, R. K. Schenk, S. Steinmann, J. P. Fiorellini, C. H. Fox, and H. Stich, *Journal of Biomedical Materials Research* **25** (1991) 889;
130. C. P. A. T. Klein, P. Patka, H. B. M. Van Der Lubbe, J. G. C. Wolke, and K. De Groot, *Journal of Biomedical Materials Research* **25** (1991) 53;

131. M. Gottlander, t. Albrektsson, and L. V. Carlsson, *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **7** (1992) 485;
132. M. Weinlaender, E. B. Kenny, V. Lekovic, J. Beumer, P. K. Moy, and S. Levis, *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **7** (1992) 491;
133. W. J. A. Dhert, C. P. A. T. Klein, J. A. Jansen, E. A. Van Der Velde, R. C. Vriesde, P. M. Rozing and K. De Groot, *Journal of Biomedical Materials Research* **27** (1993) 127;
134. C. P. A. T. Klein, P. Patka, J. G. C. Wolke, J. M. A. Blieck-Hogervorst, and K. De Groot, *Biomaterials* **15** (1994) 146;
135. T. Kitsugi, T. Nakamura, M. Oka, Y. Seneha, T. Goto and T. Shibuya, *Journal of Biomedical Materials Research* **30** (1996) 261;
136. G. H. Evens, A. J. Mendez, and R. F. Caudill, *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **11** (1996) 360
137. B. Carr, D. A. Gerard, and P. E. Larsen, *International Journal of Oral & Maxillofacial Implants* **12** (1997) 777;
138. H. Caulier, J. P. C. M. Van der Waerden, Y. C. G. J. Paquay, J. G. C. Wolke, W. Kalk, I. Neart, and J. A. Jansen, *Journal of Biomedical Materials Research* **29** (1995) 1061;
139. S. Vercaigne, J.G. C. Wolke, I. Naert, and J. A. Jeansen, *Clinical Oral Implants Research* **9** (1998) 261
140. M. Gottlander, C. B. Jonsson, and A. Alberktsson, *Clinical Oral Implants Research* **8** (1997) 345
141. P. Ducheyne, W. Van Raemdonck, J. C. Heughebaert, and M. Heughebaert, *Biomaterials* **7** (1986); P. Ducheyne, S. Radin, M. Heughebaert, J. C. Heughebaert, *Biomaterials* **11** (1990) 244
142. M. Yoshinari, Y. Ohtsuka, and T. Derand, *Biomaterials* **15** (1994) 529
143. J. A. Jansen, J. G. Wolke, S. Swann, J. P. Van der Waerden, and K. de Groot, *Clin. Oral implants Res.* **4** (1993) 28;
144. K. Van Dijk, H. G. Shaenken, J. C. G. Wolke, C. H. M Maree, F. H. P. M. Habraken, J. Verhoeven, J. A. Jansen, *J. Biomed. Mater. Res.* **29**, 269 (1995);
145. K. Van Dijk, J. Verhoeven, C. H. M Maree, F. H. P. M. Habraken, J. A. Jansen, *Thin Solid Films* **304** (1997) 191;
146. V. Nelea, C. Morosanu, M. Iliescu, I. N. Mihailescu, *Microstructure and mechanical properties of hydroxyapatite thin films grown by RF magnetron sputtering*, Surface and Coatings Technology, **173**, 2-3 (2003) 315-322;
147. Liliana Verestiuc, C. Morosanu, M. Bercu, Iuliana Pasuk, I. N. Mihailescu, *Chemical Growth of calcium phosphate layers on magnetron sputtered HA films*, Journal of Crystal Growth, **264**/1-3 (2004) pp 483-491;
148. V. Nelea, C. Morosanu, M. Iliescu, I. N. Mihailescu, *Hydroxyapatite thin films grown by pulsed laser deposition and RF magnetron sputtering: a comparative study*, Applied Surface Science, **228** (2004) 346-356
149. W. R. Lacefield, *Ann. NY Acad. Sci.* 523 (1988) 72],
150. P. Li, *J. Biomed. Mater. Res.* 66A (2003) 79
151. V. Nelea, M. Jelinek, I. N. Mihailescu, *Pulsed laser deposition of biomedical materials*, Chapter 9 of *Pulsed laser deposition of optoelectronic films*, Series: Optoelectronic Materials and Devices, **vol. 2** 2005 p. 265-311;
152. V. Nelea, M. Jelinek, I. N. Mihailescu, *Biomaterials: new issues and breakthroughs for biomedical applications*, Chapter 18 in *Pulsed Laser Deposition of thin films: applications-lead growth of functional materials*, Wiley & Sons, 2006 421-459
153. Yang, Y.; Kim, K.H.; Ong, J.L., *A review on calcium phosphate coatings produced using a sputtering process – an alternative to plasma spraying*, *Biomaterials* **26**, 2005, 327-337.

154. Oliveira, A.L.; Mano, J.F.; Reis, R.L., Nature-inspired calcium phosphate coatings: present status and novel advances in the science of mimicry, *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* **7**, 2003, 309-318
155. C. M. Cotell, D. B. Chrisey, K. S. Grabowski, and J. A. Sprague, *J. Appl. Biomater.* **3** (1992) 87;
156. C. M. Cotell, *Applied Surface Science*, **69** (1993) 140
157. P. Baeri, L. Torrisi, N. Marino, and G. Foti, *Appl. Surf. Sci.* **54** (1992) 210
158. L. Torrisi, *Thin Solid Films* **227** (1994) 12
159. C. Peraire, J.L. Arias, D. Bernal, J. Pou, B. Leon, A. Arano, W. Roth, *J. Biomed. Mater. Res. A* **77** (2006) 370
160. J. L. Arias, M. B. Mayor, J. Pou, B. Leon, and M. Perez-Amor, *Appl. Surf. Sci.* **154** (2000) 434
161. J. L. Arias, F. J. Garcia-Sanz, M. B. Mayor, S. Chiussi, J. Pou, B. Leon, and M. Perez-Amor, *Biomaterials* **19** (1998) 883;
162. J. M. Fernandez-Pradas, L. Cleries, G. Sardin, and J. L. Morenza, *Biomaterials* **23** (2002) 1989
163. E. N. Antonov, V.N. Bagratashvili, V. K. Popov et al, *J. Biomed. Optics* **3** (1998) 423
164. G. Socol, **F. Miroiu**, N. Stefan, L. Duta, G. Dorcioman, I. N. M. Mihailescu, A. M. Macovei, S. M. Petrescu, G. E. Stan, D. A. Marcov, A. Chiriac, I. Poeata, *Hydroxyapatite thin films deposited by pulsed laser deposition and magnetron sputtering on PMMA substrates for medical applications*, *Mater. Sci. Eng. B* **169 1-3** (2010) 159-168
165. V. Nelea, C. Ristoscu, C. Chiritescu, C. Ghica, I. N. Mihailescu, A. Cornet, *Pulsed laser deposition of hydroxyapatite thin films on Ti and Ti alloys substrates with and without buffer layers*, *Applied Surface Science* **168(1-4)**, 127-131 (2000);
166. V. Nelea, M. Iliescu, V. Craciun, I. N. Mihailescu, C. Ristoscu, C. Ghica, H. Pelletier, J. Werckmann, *Calcium phosphate thin film processing by pulsed laser deposition and in-situ assisted ultraviolet pulsed laser deposition*, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, pp 1167-1173 (2002);
167. F. Sima, C. Ristoscu, N. Stefan, G. Dorcioman, I.N. Mihailescu, L. E. Sima, S. M. Petrescu, E. Palcevskis, J. Krastins, I. Zalite, *Shallow Hydroxyapatite coatings pulsed laser deposited on Al₂O₃ substrates with controlled porosity: correlation of morphological characteristics with in vitro testing results*, *Applied Surface Science*, **255** (2009) 5312–5317 ;
168. C. Capuccini, P. Torricelli, F. Sima, E. Boanini, C. Ristoscu, B. Bracci, G. Socol, M. Fini, I.N. Mihailescu, A. Bigi, *Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed laser deposition: in vitro osteoblast and osteoclast response*, *Acta Biomaterialia* **4** (2008) 1885–189;
169. Adriana Bigi, Elisa Boanini, Chiara Capuccini, Milena Fini, Ion N. Mihailescu, Carmen Ristoscu, Felix Sima, Paola Torricelli, *Biofunctional alendronate–hydroxyapatite thin films deposited by Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation*, *Biomaterials*, Volume **30**(31) (2009) 6168-6177;
170. Ion N. Mihailescu, Carmen Ristoscu, Adriana Bigi, Isaac Mayer, *Advanced biomimetic implants based on nanostructured coatings synthesized by pulsed laser technologies*, Chapter 10 in “*Laser-Surface Interactions for New Materials Production Tailoring Structure and Properties*”, Series: Springer Series in Materials Science, Vol. 130, Miotello, Antonio; Ossi, Paolo M. (Eds.), 2010, 235 – 260;
171. T. Nakayama, T. Tanaka, Y. Tsumoto, H. Katayama, M. Katto, *Appl. Phys. A* **79** (2004) 833
172. E. Jimenez, J. L. Arias, B. Leon, M. Perrz-Amor, *Thin Solid Films* **453/454** (2004) 422

173. G. C. Chițanu, I. Popescu and A. Carpov, *Synthesis and Characterization of Maleic Anhydride Copolymers and Their Derivatives. 2. New data on the copolymerization of maleic anhydride with vinyl acetate*, Rev. Roum. Chim., 2006, 51(9), 923-929;
174. G. C. Chițanu, I. Popescu and A. Carpov, *Synthesis and Characterization of Maleic Anhydride Copolymers and Their Derivatives. 3: Synthesis and characterization of maleic anhydride – methyl methacrylate copolymers*, Revue Roumaine de Chimie, 2007, 52(1–2), 135–141;
175. B. C. Trivedi and B. M. Culbertson, *Maleic Anhydride*, Plenum Pres, New York, 1982;
176. B. M. Culberson, *Maleic and Fumaric Polymers*, in: “Encycl. Polym. Sci. Eng.”, vol. 9, 2nd Edn., John Wiley and Sons, New York, 1987, p. 225-294;
177. G. C. Chitanu, *Sinteza si proprietatile copolimerilor anhidridiei maleice*, Teza de doctorat, Universitatea din Iasi, Romania, 1995;
178. H. Maeda, *Adv. Drug Delivery Rev.* 1991, 6, 181-202;
179. C. Flego, M. Lovrecich and F. Rubessa, *Drug. Develop. Ind. Pharm.*, 1988, 14, 1185-1202 si lucrările ulterioare, citate de 2.164
180. T. Sato, K. Kojima, T. Ihda, J. Sunamoto and R.M. Ottenbrite, *J. Bioact. Compat. Polym.*, 1986, 1, 448-460 and subsequent papers; citate in 2.164
181. Raphael M. Ottenbrite, Alan M. Kaplan, *Some Biologically Active Copolymers of Maleic Anhydride*, Annals of the New York Academy of Sciences 446 (1) (1985), 160–168
182. *Controlled drug delivery, challenges and strategies*, ACS Professional Reference Book, Washington
183. P. G. Klepetsanis, P.G. Koutsoukos, G.C. Chitanu and A. Carpov, *The inhibition of calcium carbonate formation by copolymers containing maleic acid*, in: “Water Soluble Polymers”, Amjad Z., Ed., Plenum Press, New York, 1998, p. 117-130;
184. G. C Chitanu, S. Chivulete and A. Carpov, *International Agrophysics*, 6, 1993, 203-211;
185. Anghelescu-Dogaru A. G., I. Popescu and G. C. Chitanu, *J. Environ. Prot. Ecol.*, 2004, 5, 265-270;
186. G. Aldea, G. C. Chitanu, B. C. Simionescu and A. Carpov, *Bull. St. Univ. Politehnica Timisoara*, 2001, 46, 1-2, 79-83;
187. G. Aldea, G. C. Chitanu, J. M. Nunzi, S. Dabos-Seignon and B. C. Simionescu, *Layer by Layer Deposition of Rhodamine 6G Films Using Maleic Acid Copolymers as Anionic Partners*, Nonlinear Optics and Quantum Optics, 32 (2004), 117-126;
188. R. M. Piticescu, G. C. Chitanu, M. L. Popescu, W. Lojkowski, A. Opalinska and T. Strachowski, *New hydroxyapatite based nanomaterials for potential use in medical field*, Annals of Transplantation, 2004, 9, 20-25
189. C. Beldie, I. Popa and G.C. Chitanu, *Mater. Plast.* 32, (1995) 31-37
190. G. C. Chitanu, A. Carpov, *Env. Sci. Technol.* 36 (2002) 1856-1860
191. E. Baciu et al, *Eur. Polymer J.* 38 (2002) 1509-1521;
192. C. N. Cascaval, C. G. Chitanu, A. Carpov, *Termochim. Acta* 275 (1996) 225-233;
193. C. G. Chitanu, G. C. Bumbu, A. Stoleriu, A. Carpov, C. Vasile, A. Anghelescu-Dogan, M. Rinaudo, *Polym. Degr. and Stab.* 65 (1999) 75-85
194. R. M. Piticescu, G. C. Chitanu, M. Albulescu, M.Giurginca, M. L. Popescu and W. Lojkowski, *Hybrid HAp-maleic anhydride copolymer nanocomposites obtained by in-situ functionalisation*, *Solid State Phenomena*, 106, (2005) 47-56
195. S. Itoh et al, *Biomaterials* 23 (2002) 3919-3926;
196. M. Chong and Y. Tanaka, *Biomaterials* 23 (2002) 4811-4818;
197. S. C. Lion et al, *Biomaterials* 25 (2004) 189-196;
198. J. Pena and M. Vallet-Regi, *J. Eur. Ceram. Soc.* 23 (2003) 1687-1696;
199. M. Wang, *Biomaterials* 24 (2003) 2133-2151;

200. N. Spanos et al, *Biomaterials* **23** (2002) 947-953; M. Kavasia et al, *Biomaterials* **24** (2003) 2477-2484;
201. Olveiro A. L. et al, *Biomaterials* **24** (2003) 2575-2584.
202. R. Riman, W. Suchanek, M. Lencka, *Ana. Chim. Sci. Mat.* **27(2)** 2002 15-36;
203. R. M. Piticescu, R. Piticescu, D. Taloi, V. Vadilita, *Hydrothermal synthesis of ceramic nanomaterials for functional applications*, *Nanotechnology* **14** (2003) 312-317
204. W. Suchanek, H. Suda, M. Yashima M. Kakihana, M. Yoshimura, *J. Mater. Res.* **10** (1995) 521-529
205. K. Bouropoulos, N. Bouropoulos, M. Melekos, P.G. Koutsoukos, G. C. Chitanu, A. G. Anghelescu-Dogaru and A. Carpov, *J. Urol.* **159** (1998) 1755
206. G. H Altman Gregory H. Altman, F Diaz, C Jakuba, T Calabro, R L. Horan, J Chen, H Lu, J Richmond, D. L. Kaplan, *Silk-based biomaterials*, *Biomaterials* **24** (2003) 401-416
207. John G. Hardy and Thomas R. Scheibel, *Bionanotechnology II: from Biomolecular Assembly to Applications; Silk-inspired polymers and proteins*, *Biochemical Society Transactions* (2009) **37 (4)**, 2009, 677-681
208. Vasconcelos A., G. Freddi, A. Cavaco-Paulo, *Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin*, *Biomacromolecules* **9** (2008) 1299–1305
209. M. Mondal, K. Trivedy and S. Nirmal Kumar Caspian J. Env. Sci. 2007, Vol. 5 No. 2 pp. 63-76, *The silk proteins, sericin and fibroin in silkworm, Bombyx mori Linn.*, - a review; John G. Hardy, BST 2009 **37**
210. N. Minoura, M. Tsukada, M. Nagura, *Physico-chemical properties of silk fibroin membrane as a biomaterial* *Biomaterials* **11**, (1990) 430-434
211. N. Minoura, M. Tsukada, M. Nagura, *Fine structure and oxygen permeability of silk fibroin membrane treated with methanol*, *Polymer* **31(2)** (1990) 265-269
212. Y. Tsuboi, M. Goto, A. Itaya, *Pulsed laser deposition of silk protein: Effect of photosensitized-ablation on the secondary structure in thin deposited films*, *J. Appl. Phys.* **89(12)**, (2001) 7917-7923
213. K. Mita, S. Ichimura, M. Zama, T.J. James, *Specific codon usage pattern and its implications on the secondary structure of silk fibroin mRNA*, *Mol Biol.* **203(4)** (1988) 917-25
214. Cong-Zhao ZHOU, F. Confalonieri, M. Jacquet, R. Perasso, Z. Li, *Silk fibroin: Structural implications of a remarkable amino acid sequence*, *Proteins* **44(2)** (2001) 119-122
215. Chunling Du, Jun Jin, Yucheng Li et al, *Novel silk fibroin/hydroxyapatite composite films: structure and properties*, *Materials Science and Engineering C* **29** (2009) 62-68
216. David Kaplan (Ed.), *Biopolymers from renewable sources*, Springer,_Heidelberg, 1998
217. D. B. Fraser and T. P. MacRae, in *Conformation in Fibrous Proteins and Related Synthetic Polypeptides*, Academic Press, New York, 1973, p. 293; citat de G Freddi, P Monti, M Nagura, Y Gotoh, M Tsukada, *Structure and Molecular Conformation of Tussah Silk fibroin films: Effect of Heat Treatment*, *Journal of Polymer Science B* **_35(5)** (1997) 841-847
218. K. Yamada , Y. Tsuboi and A. Itaya, AFM observation of silk fibroin on mica substrates: morphologies reflecting the secondary structures, *Thin Solid Films* **440** 2003 208-216,
219. S. Inoue, J. Magoshi, T. Tanaka, Y. Magoshi, M. Becker, *Atomic force microscopy: Bombyx mori silk fibroin molecules and their higher order structure*, *J. Polym. Sci. B* **38(11)** (2000) 1436-39
220. S.J. He, R. Valluzzi, S.P. Gido, *Silk I structure in Bombyx mori silk foams*, *Int. J. Biol. Macromol.* **24(2-3)** (1999) 187-195

221. R. Valluzzi, S.J. He, S.P. Gido; D. Kaplan, *Bombyx mori silk fibroin liquid crystallinity and crystallization at aqueous fibroin-organic solvent interfaces*, International Journal of Biological Macromolecules, **24**(2) (1999) 227-236
222. Moonsri, P., Watanesk, R., Watanesk, S., Niemsup, H., Deming, R.L, *Fibroin membrane preparation and stabilization by polyethylene glycol diglycidyl ether*, Journal of Applied Polymer Science, **108** (2008) 1402-1406
223. Um, I. C.; Kweon, H. Y.; Kwang, G. L.; Park, Y. H., *The role of formic acid in solution stability and crystallization of silk protein polymer*, Int. J. Biol. Macromol. **33**(4-5) (2003) 203-213
224. C. Sobajo, F Behzad, X-F Yuan, A. Bayat, Silk: A Potential Medium for Tissue Engineering,
http://www.eplasty.com/index.php?option=com_content&view=article&id=243&catid=145
<http://ukpmc.ac.uk/articles/PMC2567119;jsessionid=17717E6DD2EF60EC3A56C44DC3AA3B1C.jvm4>
225. Dal Pra I, Freddi G, Minic J, Chiarini A, Armato U., *De novo engineering of reticular connective tissue in vivo by silk fibroin nonwoven materials*, Biomaterials **26****14** 2005; 1987-1999.
226. Vepari C, Kaplan DL. *Silk as a Biomaterial*, Prog Polym Sci. 2007;32(8-9):991-1007,
227. Wang Y, Kim HJ, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL, *Stem cell-based tissue engineering with silk biomaterials*, Biomaterials 27(36) (2006) 6064-82
228. Meinel, L., S. Hofmann, V. Karageorgiou, C. Kirker-Head, J. McCool, G. Gronowicz, L. Zichner, R. Langer, G. Vunjak-Novakovic and D.K. Kaplan, *Evaluation of inflammatory responses of silk films: in vitro cell culture model and in vivo implantation*, Biomaterials **26**(2) (2005) 147-155
229. Cunniff PM, Fossey SA, Auerbach MA, Song JW, Kaplan DL, Adams WW, Eby RK, Mahoney D, Vezie DL., *Mechanical and thermal properties of dragline silk from the spider, Nephila Clavipes*, Polym Adv Technol 1994;5:401-10
230. Minoura, N., Aiba, S., Higuchi, Y., Tsukada, M. and Imai, Y. *Attachment and growth of fibroblast cells in silk fibroin*, Biochem. Biophys. Res. Commun., **208** (1990) 511-516
231. Yamaguchi I., K. Tokuchi, H. Fukuzaki, Y. Koyama, K. Takakuda, H. Monma and J. Tanaka, *Preparation and microstructure analysis of chitosan/hydroxyapatite nanocomposites*, J. Biomed. Mater. Res. 55 (2001) 20-27;
232. J. Yao and T. Asakura, in Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering, edited by G. E. Wnek and G. L. Bowlin (Marcel Dekker, Inc., New York, 2004) p. 1363; citat de 2.3.[10] C. Du, Materials Science and Engineering C (2009)
233. X. D. Kong, F.Z. Cui, X.M. Wang, M. Zhang, W. Zhang, *Silk fibroin regulated mineralization of hydroxyapatite nanocrystals*, Journal of Crystal Growth **270** (2004) 197-202
234. Takeuchi A., C. Ohtsuki, T. Miyazaki, S. Ogata, M. Tanihara, H. Tanaka, Y. Furutani and H. Kinoshita, *Apatite Formation on Silk Fiber in a Solution Mimicking Body Fluid*, Key Engineering Materials **240** (2003) 31-34.
235. H. Mori, M. Tsukada, *New silk protein: modification of silk protein by gene engineering for production of biomaterials*, Rev. Mol. Biotechnol. **74** (2000) 95-103].
236. Moy RL, Lee A, Zalka A. Commonly used suture materials in skin surgery. Am Fam Physician 1991;44:2123-8, citat de 2.3.[1] G. H. Altman, Biomaterials 2003]].
237. G H Altman, RL Horan, H. Lu , J Moreau, I Martin, JC Richmond, DL Kaplan, *Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments*. Biomaterials **23** 2002:4131-41
238. Minoura N, Aiba S, Gotoh Y, Tsukada M, Imai Y, *Attachment and growth of cultured fibroblast cells on silk protein matrice*, J Biomed Mater Res 1995;29:1215-21

239. Sofia S, McCarty MB, Gronowicz G, Kaplan DL. Functionalized silk-based biomaterials for bone formation. *J Biomed Mater Res* 2001; **54**: 139–48
240. Y. Miyaguchi and Jianen Hu, *Technical paper: Physicochemical Properties of Silk Fibroin after Solubilization Using Calcium Chloride with or without Ethanol*, *Food Sci. Technol. Res.*, **11**(1) (2005) 37-42
241. Brian D. Lawrence, Mark Cronin-Golomb, Irene Georgakoudi, David L. Kaplan and Fiorenzo G. Omenetto, *Bioactive Silk Protein Biomaterial Systems for Optical Devices*, *Biomacromolecules*, 2008, **9** (4), pp 1214–1220]
242. Min BM, Lee G, Kim SH, Nam YS, Lee TS, Park WH. *Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro*, *Biomaterials* **25** (2004) 1289–97.
243. Jonathan Eytouyo AYUTSEDE, *Regeneration of Bombyx Mori Silk Nanofibers and Nanocomposite Fibrils by the Electrospinning Process*, PhD Thesis of Drexel University, 2005, http://idea.library.drexel.edu/bitstream/1860/546/13/Ayutsede_Jonathan.pdf
244. Yu-Wen Huang and V. K. Gupta, *A SPR and AFM Study of the Effect of Surface Heterogeneity on the Adsorption of Proteins*, *J Chemical Physics*, **121**(5) (2004) 2264-2271
245. Pamula, E., De Cupere, V., Dufrêne, Y.F. and Rouxhet, P.G., *Nanoscale organization of adsorbed collagen: influence of substrate hydrophobicity and adsorption time*, *J. Colloid Interf. Sci.* **271** (2004) 80-91
246. Mackie AR, Gunning AP, Wilde PJ, Morris VJ., *Orogenic displacement of protein from the oil/water interface*, *Langmuir* **16** (2000) 2242-2247
247. J. Sanchez- Gonzalez, J.R. Garcia, M.J.G. Ruiz, *Langmuir–Blodgett films of biopolymers: a method to obtain protein multilayers*, *J. Colloid Interface Sci.* **267** (2003) 286-293
248. O. Rathore, D.Y. Sogah, *Nanostructure Formation through β -Sheet Self-Assembly in Silk-Based Materials*, *Macromolecules* **34**(5) (2001) 1477-1486.
249. S. Nakayama, S. Nagare, M. Senna, *Development of micro-structural units in the silk fibroin thin films prepared by near-infrared pulsed laser deposition*, *Thin Solid Films* **515** (2006) 2582-2586
250. Y. Tsuboi, M. Goto, A. Itaya, *Thin film formation of a protein by laser ablation deposition technique*, *Chem. Lett.* 1998, 521-522;
251. Y. Tsuboi and A. Itaya, *Deposition of a thin polystyrene film by anthracene-photosensitized laser ablation at 351 nm*, *Appl. Phys. Lett.* **74**(25) (1999) 3896
252. Tsuboi Y., H. Adachi, K. Yamada, H. Miyasaka, A. Itaya, *Laser Ablation of Silk Protein (Fibroin) Films*, *Jpn. J. Appl. Phys.* **41** (2002) 4772–4779;
253. R. Srinivasan, B. Braren, *Ultraviolet laser ablation and etching of polymethyl methacrylate sensitized with an organic dopant*, *Appl. Phys. A: Solids Surf.* **45**(4) (1988) 289-292
254. T. Lippert, R. L. Webb, S. C. Langford, J. T. Dickinson, *Dopant induced ablation of poly(methylmethacrylate) at 308 nm*, *J. Appl. Phys.* (1999) **85**, 1838
255. D.M. Bubb, M.R. Papantonakis, B. Toftmann, J.S. Horwitz, R.A. McGill, D.B. Chrisey, R.F. Haglund Jr., *Effect of ablation parameters on infrared pulsed laser deposition of polyethylene glycol. Films*, *J. Appl. Phys.* **91** (2002) 9809
256. Vogel A., V. Venugopalan, *Mechanisms of Pulsed Laser Ablation of Biological Tissues*, *Chem. Rev.* **103**(2) (2003) 577-644
257. Taketani I, S. Nakayama, S. Nagare, M. Senna, *The secondary structure control of silk fibroin thin films by post treatment*, *Applied Surface Science* **244** (2005) 623-626
258. Moore A., M. Koch, K. Mueller, M. Stuke, *Precise laser ablation processing of black widow spider silk*, *Appl. Phys. A* **77** (2003) 353-357
259. Lin Liu, Jinying Liu, Mingqi Wang, Sijia Min, Yurong Cai, Liangjun Zhu, Juming Yao, *Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/silk fibroin porous scaffolds*, *Journal of Biomaterials Science Polymer Edition*, **19**(3) (2008) 325-338

260. Yong Zhao, Jing Chen, Alex H K Chou, Gang Li, Racquel Z Legeros, *Nonwoven silk fibroin net/nano-hydroxyapatite scaffold: Preparation and characterization*, Journal of Biomedical Materials Research A **91A**(4) (2009) 1140-1149
261. T. G. T. Nindhia, Y. Koyoshi, A. Kaneko et al, *Hydroxyapatite-Silk Functionally Graded Material by Pulse Electric Current Sintering*, Trends Biomater. Artif. Organs, **22**(1) (2008) 28-33
262. T. Furuzono, J. Tanaka and A. Kishida, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **15** (2004) 19; A. Korematsu, T. Furuzono, S. Yasuda, J. Tanaka and A. Kishida, *J. Mater. Sci. Lett.* **39** (2004) 3221
263. Li Wang, R. Nemoto and M. Senna, *Effects of alkali pretreatment of silk fibroin on microstructure and properties of hydroxyapatite-silk_fibroin_nanocomposite*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine **15**(3) (2004) 261-265
264. Korematsu A, T. Furuzono, S. Yasuda, J. Tanaka and A. Kishida, *Nano-scaled hydroxyapatite/polymer composite III. Coating of sintered hydroxyapatite particles on poly(4-methacryloyloxyethyl trimellitate anhydride)-grafted silk fibroin fibers*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, **16**(1) 2005, 67-71
265. Rikako Kino, Toshiyuki Ikoma, Shunji Yunoki, Nobuhiro Nagai, Junzo Tanaka, Tetsuo Asakura, Masanobu Munekata, *Preparation and characterization of multilayered hydroxyapatite/silk fibroin film*, Journal of Bioscience and Bioengineering **103**(6) (2007) 514-520
266. Kaiyong Cai, Yan Hu, Klaus D. Jandt, *Surface engineering of titanium thin films with silk fibroin via layer-by-layer technique and its effects on osteoblast growth behavior*, *J Biomed Mater Res*, 2007
267. I.N. Mihailescu, E. Gyorgy, *Pulsed Laser Deposition: An Overview*, in: *International Trends in Optics and Photonics*, T. Asakura (Ed.), Springer, Heidelberg, 1999
268. A Leonid V. Zhigilei, Prasad B. S. Kodali, and Barbara J. Garrison, *Microscopic View of Laser Ablation*, *J. Phys. Chem. B* **1998**, *102*, 2845-2853
269. P. R. Willmott, J. R. Huber, *Pulsed laser vaporization and deposition*, *Reviews of Modern Physics*, Vol. 72, No. 1, 2000
270. L.V. Zhigilei, B.J. Garrison, *Mechanisms of laser ablation from molecular dynamics simulations: dependence on the initial temperature and pulse duration*, *Appl. Phys. A* **69** Suppl. (1999) S75–S80
271. S Amoruso, R Bruzzese, N Spinelli, R Velotta, *Characterization of laser-ablation plasmas*, *J. Phys. B: At. Mol. Opt. Phys.* **32** (1999) R131–R172;
272. Puretzky A., D. B. Geohegan, G. B. Hurst, M. V. Buchanan, B. S. Luk'yanchuk, *Imaging of Vapor Plumes Produced by Matrix Assisted Laser Desorption: A Plume Sharpening Effect*, *Physical Review Letters* **83** (2), 1999;
273. S. S. Harilal, C. V. Bindhu, M. S. Tillack, F. Najmabadi, and A. C. Gaeris, *Internal structure and expansion dynamics of laser ablation plumes into ambient gases*, *Journal of Applied Physics* **93**(5), 2003
274. Yaroslava G. Yingling, Leonid V. Zhigilei, Barbara J. Garrison, *The role of the photochemical fragmentation in laser ablation: a molecular dynamics study*, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **145** (2001), 173–181
275. Yaroslava G. Yingling, Barbara J. Garrison, *Photochemical induced effects in material ejection in laser ablation*, *Chemical Physics Letters*, **364**, (2002), 237–243
276. R.D. Schaeffer, *A Closer Look at Laser Ablation*, *Laser Focus World* **37** (6), June 2001, 217-219
277. Michael I. Zeifman, Barbara J. Garrison, Leonid V. Zhigilei, *Multiscale simulation of laser ablation of organic solids: evolution of the plume*, *Applied Surface Science* **197–198** (2002) 27–34
278. J.C. Miller, R.F. Haglund, Jr., (Eds.), *Laser Ablation and Desorption*, Academic Press, 1998

279. N. van Kampen, *Stochastic Processes in Physics and Chemistry*, North-Holland, Amsterdam, 1981
280. J. Neamtu, I. N. Mihailescu, Carmen Ristoscu, J. Hermann, "Theoretical Modelling of Phenomena in the Pulsed-Laser Deposition Process: Application to Ti Targets Ablation in Low-Pressure N₂", Journal of Applied Physics **86**(11), (1999), 6096-6106
281. Toftmann A., J. Schou, T. N. Hansen, J. G. Lunney, *Angular Distribution of Electron Temperature and Density in a Laser-Ablation Plume*, Physical Review Letters **84**(17), 2000;
282. Leonid V. Zhigilei and Barbara J. Garrison, *Velocity distributions of molecules ejected in laser ablation*, Appl. Phys. Lett. **71** (4), 1997
283. Rajiv K. Singh, *Transient plasma shielding effects during pulsed laser ablation of materials*, Journal of Electronic Materials, **25**(1) (1996) 125 - 129
284. Barbara J. Garrison, Tatiana E. Itina, Leonid V. Zhigilei, *Limit of overheating and the threshold behavior in laser ablation*, Physical Review E **68** (2003), 041501
285. Gabriel Socol, *Straturi subtiri de biomateriale obtinute prin metoda de depunere laser pulsata pentru o noua generatie de implanturi medicale*, Teza de doctorat, Universitatea din Bucuresti, 5.12.2006
286. K. Sokolowski-Tinten, J. Bialkowski, A. Cavalleri, D. von der Linde, A. Oparin, J. Meyer-ter-Vehn, S. I. Anisimov, *Transient States of Matter during Short Pulse Laser Ablation*, **81**(1), Physical Review Letters, 1998
287. T.E. Itina, J. Hermann, Ph. Delaporte, M. Sentis, *Modeling of metal ablation induced by ultrashort laser pulses*, Thin Solid Films, 453 –454, (2004), 513–517;
288. Leonid V. Zhigilei, Prasad B. S. Kodali, Barbara J. Garrison, *Molecular Dynamics Model for Laser Ablation and Desorption of Organic Solids*, J. Phys. Chem. B **101** (1997) 2028-2037.
289. E.G. Gamaly, A.V. Rode, V.T. Tikhonchuk, B. Luther-Davies, *Electrostatic mechanism of ablation by femtosecond lasers*, Applied Surface Science, 8094, (2002), 1–6.
290. P.E. Dyer, A. Issa, P.H. Key, Applied Physics Letters **57**, 186-8 (1990); R. K. Singh and J. Narayan, Physical Review B **41**, 8843-59 (1990)
291. S. M. Metev and V. P. Veiko, *Laser Assisted Microtechnology*, Springer, Berlin, Heidelberg (1994); S. Metev and K. Meteva, *Appl. Surf. Sci.* **43** (1989), 402
292. D.B. Chrisey and G.K. Hubler (Ed.), *Pulsed Laser Deposition of Thin Films*, John Wiley & Sons Wiley-Interscience, New York, 1994;
293. H M Christen and G Eres, *Recent advances in pulsed-laser deposition of complex oxides*, Journal of Physics: Condensed Matter **20**(26) (2008)
294. D Craciun, G. Socol, N. Stefan, **M. Miroiu**, I. N. Mihailescu, A. Galca, V. Craciun, *Structural investigations of ITO-ZnO films grown by the combinatorial pulsed laser deposition technique*, Applied Surface Science, **255**(10) (2009) 5288 – 5291
295. Apostol I., N. Stefan, C.R. Luculescu, R. Barjega, M. Socol, **M. Miroiu** and I.N. Mihailescu, *Pulsed laser deposition of semiconducting crystalline double-doped barium titanate thin films on nickel substrates*, Applied Surface Science **257**(8), 2011, 3570-3576
296. J. Perrière, C Boulmer-Leborgne, R. Benzerga and S Tricot, Nanoparticle formation by femtosecond laser ablation, *J. Phys. D: Appl. Phys.* **40**(22) (2007) 7069
297. S. Barcikowski, A. Hahn, A.V. Kabashin and B.N. Chichkov, *Properties of nanoparticles generated during femtosecond laser machining in air and water*, Applied Physics A: Materials Science & Processing **87**(1) (2007) 47-55
298. R.A. McGill, R.Chung, D.B. Chrisey, P.C. Dorsey, P. Matthews, A. Pique, T.E. Mlsna, and J. I. Stepnowski, *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* **45**(5), (1998) 1370-1380;
299. McGill A. and D.B. Chrisey, *Patent No. 6,025,036* (2000);
300. T.E. Itina, L.V. Zhigilei, B.J. Garrison, Nucl. Instr. & Meth. Phys. Res. B 180, (2001) 238-244

301. Toftmann, Bo; Katarzyna Rodrigo, Jørgen Schou, Roman Pedrys, *High laser-fluence deposition of organic materials in water ice matrices by ‘‘MAPLE’’,* Applied Surface Science **247** (2005) 211–216
302. K.Rodrigo, B.Toftmann, J. Schou, and R.Pedrys, *Laser Irradiation of Polymer-Doped Cryogenic Matrices,* Journal of Low Temperature Physics, **139**(5/6) (2005) 683-692
303. E. György, A. Pérez del Pino, G. Sauthier, A. Figueras, Biomolecular papain thin films grown by matrix assisted and conventional pulsed laser deposition: A comparative study, *J. Appl. Phys.* **106** (2009) 114702 (**6 pages**)
304. D.M. Brunette, P. Tengvall, M.Textor, and P. Thomsen (EdS), *Titanium in medicine,* Berlin: Springer; 2001
305. Rodica Cristescu, Ion N. Mihailescu, Miroslav Jelinek, Douglas B. Chrisey, *Functionalized Thin Films & Structures Obtained by Novel Laser Processing Issues*, in “Functionalized Properties of Nanostructured Materials” editat de Rainer Kassing, Plamen Petkov, Wilhelm Kulisch, Cyril Popov, NATO Science Series by Springer, Series II: Mathematics, Physics and Chemistry – Vol. 223, (2006) 211-226;
306. D.B. Chrisey, *Materials Processing - The Power of Direct Writing*, *Science* **289** (5481), (2000) 879-881;
307. B.R. Ringeisen, D.B. Chrisey, A. Pique, H.D. Young, R. Modi, M. Bucaro, J. Jones-Meehan, and B.J. Spargo, *Biomaterials* **23**, (2002) 161-166;
308. Rodica Cristescu, *Interactiunea radiatiei laser cu substanta: procesarea laser a filmelor subtiri de polimer pentru aplicatii biomedicale*, Teza de doctorat, Universitatea din Bucuresti, 2005
309. R. Cristescu, I. Stamatin, D.E. Mihaiescu, C. Ghica, M. Albulescu, I.N. Mihailescu, D.B. Chrisey, *Pulsed Laser Deposition of Biocompatible Polymers: a Comparative Study in Case of Pullulan*, *Thin Solid Films* **453-454** C, (2004) 262-268.
310. R. Cristescu, G. Dorcioman, C. Ristoscu, E. Axente, S. Grigorescu, A. Moldovan, I.N. Mihailescu, T. Kocourek, M. Jelinek, M. Albulescu, T. Buruiana, D. Mihailescu, I. Stamatin, D.B. Chrisey, *Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation Processing of Triacetate-Pullulan Polysaccharides Thin Films for Drug Delivery Systems*, *Applied Surface Science* **252**(13), (2006) 4647-4651
311. R Cristescu, M Jelinek, T Kocourek, E Axente, S. Grigorescu, A Moldovan, D E Mihaiescu, M Albulescu, T Buruiana, J. Dybal, I Stamatin, I N Mihailescu, D B Chrisey, *Matrix assisted pulsed laser evaporation of pullulan tailor-made biomaterial thin films for controlled drug delivery systems*, *J. Phys.: Conf. Ser.* **59** (2007) 144-149
312. M Jelinek, R Cristescu, E. Axente, T Kocourek, J Dybal, J Remsa, J Plestil, D. Mihaiescu, M. Albulescu, T. Buruiana, I. Stamatin, I N Mihailescu, D B Chrisey, *Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation of Cinnamate- and Tosylate-Pullulan Polysaccharide Derivative Thin Films for Pharmaceutical Applications*, *Applied Surface Science* **253**(19), (2007) 7755-7760.
313. L. Stamatin, R. Cristescu, G. Socol, D. Mihaiescu, I. Stamatin, I.N. Mihailescu, D.B. Chrisey, *Laser Deposition of Fibrinogen Blood Proteins Thin Films by Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation*, *Applied Surface Science* **248**, (2005) 422–427.
314. R. Cristescu, T. Kocourek, A. Moldovan, L. Stamatin, D. Mihaiescu, M. Jelinek, I. Stamatin, I.N. Mihailescu, D.B. Chrisey, *Laser deposition of cryoglobulin blood proteins thin films by matrix assisted pulsed laser evaporation*, *Applied Surface Science* **252**(13) (2006) 4652-4655
315. R. Cristescu, D. Mihaiescu, G. Socol, I. Stamatin, I.N. Mihailescu, D.B. Chrisey, *Deposition of biopolymer thin films by matrix assisted pulsed laser evaporation*, *Applied Physics A: Materials Science & Processing* **79**(4-6), 1023-1026
316. R. Cristescu, T. Patz, R. Narayan, N. Menegazzo, B. Mizaikoff, D. Mihaiescu, P.B. Messersmith, I. Stamatin, I.N. Mihailescu, D.B. Chrisey, *Processing of Mussel Adhesive*

- Proteins Analog Thin Films by Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation*, Applied Surface Science **247**(1-4), (2005) 217-224.
317. R. Cristescu, I.N. Mihailescu, I. Stamatin, A. Doraiswamy, R.J. Narayan, G. Westwood, J.J. Wilker, S. Stafsljen, B. Chisholm, D.B. Chrisey, *Thin films of polymer mimics of cross-linking mussel adhesive proteins deposited by matrix assisted pulsed laser evaporation*, Applied Surface Science **255** (2009) 5496–5498
318. R. Cristescu, C. Popescu, A. Popescu, S. Grigorescu, L. Duta, G. Caraene, A. Ionescu, D. Mihaiescu, R. Albulescu, T. Buruiana, A. Andronie, I. Stamatin, I.N. Mihailescu, D.B. Chrisey, *Functionalized Polyvinyl Alcohol Derivatives Thin Films for Controlled Drug Release and Targeting Systems: Laser Deposition and Morphological, Chemical and In Vitro Characterization*, Applied Surface Science **255**(10), (2009) 5600–5604.
319. R. Cristescu, C. Popescu, A.C. Popescu, S. Grigorescu, L. Duta, I.N. Mihailescu, A. Andronie, I. Stamatin, O.S. Ionescu, D. Mihaiescu, T. Buruiana, D.B. Chrisey, *Laser processing of polyethylene glycol derivative and block copolymer thin films*, Applied Surface Science **255**(10), (2009) 5605–5610.
320. R. Cristescu, C. Popescu, A.C. Popescu, I.N. Mihailescu, A.A. Ciucu, A. Andronie, S. Iordache, I. Stamatin, E. Fagadar-Cosma, D.B. Chrisey, *Functional porphyrin thin films deposited by matrix assisted pulsed laser evaporation*, Materials Science and Engineering B **169** (2010) 106–110
321. R. Cristescu, A. Doraiswamy, G. Socol, S. Grigorescu, E. Axente, D. Mihaiescu, A. Moldovan, R. J. Narayan, I. Stamatin, I. N. Mihailescu, B. J. Chisholm, D. B. Chrisey, *Polycaprolactone biopolymer thin films obtained by matrix assisted pulsed laser evaporation*, Applied Surface Science **253**, 6476, (2007)
322. György E, Axente E, Mihailescu IN, Predoi D, Ciucu S, Neamtu J. *Creatinine biomaterial thin films grown by laser techniques*, J Mater Sci Mater Med. 2008 Mar; **19**(3):1335-9. Epub 2007 Oct 4
323. Gyorgy, Eniko; Jose Santiso, Albert Figueras, Gabriel Socol, Ion N.Mihailescu, *Biomolecular papain thin films growth by laser techniques*, Journal of Materials Science-Materials n Medicine, **18**(8), 1643-1647, 2007
324. György E, Sima F, Mihailescu IN, Smausz T, Megyeri G, Kékesi R, Hopp B, Zdrentu L, Petrescu SM, *Immobilization of urease by laser techniques: synthesis and application to urea biosensors*, Journal of Biomedical Materials Research A **89**(1) 2009 186-91.
325. F. Sima, C. Ristoscu, A. Popescu, I.N. Mihailescu, T. Kononenko, S. Simon, T. Radu, O. Ponta, R. Mustata, L.E. Sima, S.M. Petrescu, *Bioglass –polymer thin coatings obtained by MAPLE for a new generation of implants*, Journal of Optoelectronics and Advanced Materials, **11**(9) (2009) 1170-1174
326. Felix Sima, Emanuel Axente, Carmen Ristoscu, Ion N. Mihailescu, Taras V. Kononenko, Ilya A. Nagovitsin, Galina Chudinova, *Tailoring immobilization of immunoglobulin by excimer laser for biosensor applications*, Journal of Biomedical Materials Research Part A **96**(2) 2011 384–394
327. Constantinescu, Catalin; Alexandra Palla-Papavlu, Andrei Rotaru, Paula Florian, Florica Chelu, Madalina Icriverzi, Anca Nedelcea, Valentina Dinca, Anca Roseanu and Maria Dinescu, *Multifunctional thin films of lactoferrin for biochemical use deposited by MAPLE technique*, Applied Surface Science **255**(10) (2009) 5491-5495
328. Constantinescu, Catalin; Ana Emandi, Cristina Vasiliu, Catalin Negrila, Constantin Logofatu, Costel Cotarlan, Mihail Lazarescu, *Thin films of Cu(II)-o,o'-dihydroxy azobenzene nanoparticle-embedded polyacrylic acid (PAA) for nonlinear optical applications developed by matrixassisted pulsed laser evaporation (MAPLE)*, Applied Surface Science **255**(10) (2009) 5480–5485

329. Purice A, Schou J., Kingshott P., Pryds N, Dinescu M., *Characterization of lysozyme films produced by matrix assisted pulsed laser evaporation (MAPLE)*, Applied Surface Science **253**(15) (2007) 6451-6455
330. Socol, Gabriel; Ion N. Mihailescu, Ana-Maria Albu, Stefan Antohe, Florin Stanculescu, Anca Stanculescu, Lucian Mihut, Nicoleta Preda, Marcela Socol, Oana Rasoga, *MAPLE prepared polymeric thin films for non-linear optic applications*, Applied Surface Science **255**(10) (2009) 5611-5614
331. Bigi A, Boanini E, Cojazzi G, Falini G, Panzavolta S., *Morphological and structural investigation of octacalcium phosphate hydrolysis in presence of polyacrylic acids: effect of relative molecular weights*, Cryst Growth Design 2001; 1:239–44
332. Bigi A, Cojazzi G, Gazzano M, Ripamonti A, Roveri N. Thermal conversion of octacalcium phosphate into hydroxyapatite. J Inorg Biochem 1990; 40:293–9
333. G. C. Chitanu, I. Popescu, A. Carpov, Rev. Roum. Chim. **50** (2005) 589; G. C. Chitanu, I. Popescu, A. Carpov, Rev. Roum. Chim. **51** (2006) 915
334. R. M. Piticescu, G. C. Chitanu, M. L. Popescu, W. Lojkowski, A. Opalinska and T. Strachowski, Ann. Transplant. **9** (2004) 20
335. Yu-Qing Zhang et al, Journal of Biotechnology 120 (2005) 315-326;
336. Zuo A., L. Liu, Z. Wu Journal of Applied Polymer Science, 106, (2007) 53-59
337. G. Socol, P. Torricelli, B. Bracci, M. Iliescu, **F. Miroiu**, A. Bigi, J. Werckmann, I. N. Mihailescu, *Biocompatible nanocrystalline octacalcium phosphate thin films obtained by pulsed laser deposition*, Biomaterials **25**(13) (2004) 2539-2545,
338. I.N. Mihailescu, P. Torricelli, A. Bigi, I. Mayer, M. Iliescu, J. Werckmann, G. Socol, **F. Miroiu**, F. Cuisinier, R. Elkaim, G. Hildebrand, *Calcium phosphate thin films synthesized by pulsed laser deposition: physico-chemical characterization and in vitro cells response*, Applied Surface Science **248** (2005) 344-348
339. Gabriela Negrioiu, Roxana M. Piticescu, Gabrielle C. Chitanu, Ion N. Mihailescu, Livia Zdrentu, **Marimona Miroiu**, *Biocompatibility evaluation of a novel hydroxyapatite-polymer coating for medical implants (in vitro tests)*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, **19**(4) (2008) 1537-1544,
340. L. E. Sima, A. Filimon, R.M. Piticescu, G.C.Chitanu, D.M.Suflet, **M. Miroiu**, G. Socol, I.N. Mihailescu, J. Neamtu, G. Negrioiu, *Specific biofunctional performances of the hydroxyapatite-sodium maleate copolymer hybrid coating nanostructures evaluated by in vitro studies*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine **20** (2009) 2305- 2316,
341. **F. Miroiu**, G. Socol, A. Visan, N. Stefan, D. Craciun, V. Craciun, G. Dorcioman, A. Andronie, I. Stamatin, L.E. Sima, S. M. Petrescu, S. Moga, C. Ducu, I.N. Mihailescu, *Composite biocompatible hidroxiapatite-silk fibroin coatings for medical implants obtained by matrix assisted pulsed laser evaporation*, Mater. Sci. Eng. B **169** (2010) 151–158.
342. Mihailescu I. N., S. Lamolle, G. Socol, **F. Miroiu**, H.J. Roenold, A. Bigi, I. Mayer, F. Cuisinier, S.P. Lyngstadaas, *In vivo tensile tests of biomimetic titanium implants pulsed laser coated with nanostructured calcium phosphate thin films*, Journal of Optoelectronics and Advanced Materials, **2**(6) (2008) 337 – 341
343. *Human osteoblast response to pulsed laser deposited calcium phosphate coatings*, Bigi, A.; Bracci, B.; Cuisinier, F.; Elkaim, R.; Fini, M.; Mayer, I.; Mihailescu, I.N.; Socol, G.; Biomaterials **26**(15) **2005**, 2381-2389
344. Thomas, K.A., S. D. Cook, *An evaluation of variables influencing implant fixation by direct bone apposition*, J Biomed Mater Res. **19** (1985) 875-901
345. Ronold H. J., Ellingsen J. E., *The use of a coin shaped implant for direct in situ measurement of attachment strength for osseointegrating biomaterial surfaces*, Biomaterials 2002; **23**: 2201-2209
346. Ronold H. J., Ellingsen J. E., Lyngstadaas S. P., *Tensile force testing of optimized coin-shaped titanium implant attachment kinetics in the rabbit tibiae*, Journal of Materials Science: Materials in Medicine 2003; **14**:843-849;

347. Ronold H. J. and Ellingsen J. E., *Effect of micro-roughness produced by TiO₂ blasting-tensile testing of bone attachment by using coin-shaped implants*, Biomaterials 2002; 23:4211-4219
348. Scholzen T, Gerde J., *The Ki-67 protein: from the known and the unknown*. J Cell Physiol. 2000;182:311–22
349. Saunders RM, Holt MR, Jennings L, Sutton DH, Barsukov IL, Bobkov A, et al., *Role of vinculin in regulating focal adhesion turnover*, J Cell Biol. 2006; 85: 487–500
350. Lim JY, Dreiss AD, Zhiyi Z, Hansen JC, Siedlecki CA, Hengstebeck RW, et al., *The regulation of integrin-mediated osteoblast focal adhesion and focal adhesion kinase expression by nanoscale topography*, Biomaterials 28 2007; 1787–97
351. Iliescu, M; Nelea, V.; Werckmann, J.; Mihailescu, I.N.; Socol, G.; Bigi, A; Bracci, B, *Electron microscopy studies of octa-calcium phosphate thin films obtained by pulsed laser deposition*, Thin Solid Films 453-454, (2004), 157-161;
352. Suvorova E.I.; Buffat P.A., *Electron diffraction from micro- and nanoparticles of hydroxyapatite*, J. Microscopy (1999), 196, 46–58;
353. Panda, R.N.; Hsieh, M.F.; Chung, R.J.; Chin, T.S., *X-ray diffractometry and X-ray photoelectron spectroscopy investigations of nanocrystalline hydroxyapatite synthesized by a hydroxide gel technique*, Jpn. J. Appl. Phys. 40 (2001) 5030–5035;
354. Rossi, A.M.; Ramirez, A.J. , *High-resolution transmission electron microscopy study of nanostructured hydroxyapatite*, Microsc. Microanal., 14, (2008) 433–438;
355. E. György, P. Toricelli, G. Socol, M. Iliescu, I. Mayer, I. N. Mihailescu, A. Bigi, J. Werckman J., *Biocompatible Mn²⁺-doped carbonated hydroxyapatite thin films grown by pulsed laser deposition*, Biomed. Mater. Res. A, 71A (2004) 353-358;
356. Monica Iliescu, V. Nelea, J. Werckmann, G. Socol, I.N. Mihailescu, I. Mayer, F. Cuisinier, *Morphological and structural characterisation of osseointegrable Mn²⁺ and CO₃²⁻ doped hydroxylapatite thin films*, Materials Science and Engineering C (2006);
357. Bigi, A.; Bracci, B.; Cuisinier, F.; Elkaim, R.; Fini, M.; Mayer, I.; Mihailescu, I.N.; Socol, G.; *Human osteoblast response to pulsed laser deposited calcium phosphate coatings*, Biomaterials: 26(15) (2005) 2381-2389;
358. Popescu, Laura Madalina, *Materiale nanocompozite hibride pe bază de hidroxiapatită și copolimeri maleici*, lucrare de doctorat, Universitatea Politehnica din Bucuresti, (2008);
359. Juliano RL., *Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members*. Ann Rev Pharmacol Toxicol. 49 (2002) 283–323;
360. Clark EA, Brugge JS, *Integrins and signal transduction pathways: the road taken*, Science, (1995) 268, 233–9
361. Buttery LD, Bourne S, Xynos JD, Wood H, Hughes FJ, Hughes SP, et al., *Differentiation of osteoblasts and in vitro bone formation from murine embryonic stem cells*, Tissue Eng. 2001; 7: 89–99
362. Q. Lv, C. Cao and H. Zhu, *Clotting times and tensile properties of insoluble silk fibroin films containing heparin*, Polymer International 54, (2005) 1076-1081
363. Yesim Iridag, Murat Kazancı, *Preparation and Characterization of Bombyx mori Silk Fibroin and Wool Keratin*, J.Appl. Polym. Sc. 100 (2006) 4260-4264;
364. G. Freddi, G. Pessina, M. Tsukada, *Swelling and dissolution of silk fibroin (Bombyx mori)*, International Journal of Biological Macromolecules 24 (1999) 251-263;
365. X. Chen, D. P. Knight, Z. Shao, F. Vollrath, *Regenerated bombyx silk solutions studied with rheometry and FTIR*, Polymers 42 (2001) 9969–9974;

366. G.Freddi, Patrizia Monti, M. Nagura, Y Gotoh, M Tsukada, *Structure and Molecular Conformation of Tussah Silk fibroin films: Effect of heat treatment*, Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics, **35**(5) (1997) 841-847
367. P. Layrolle and G. Daculsi in Betty Leon, John Jansen, (Ed,) *Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants*, Springer, 2008, Chapter 2, p. 13
368. Rina Nazarov, Hyoung-Joon Jin, and David L. Kaplan, *Porous 3-D scaffolds from regenerated silk fibroin*; Biomacromolecules **5** (3) (2004) 718–726
369. E.N. Antonov, V.N. Bagratashvili, V.K. Popov, E.N. Sobol, S.M. Howdle, *Determination of the stability of laser deposited apatite coatings in phosphate buffered saline solution using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy*, Spectrochim. Acta A: Mol. Biomol. Spectrosc. **52** (1) (1996) 123–127.
370. M. Katto, M. Nakamura, T. Tanaka, T. Nakahyama, *Hydroxyapatite coatings deposited by laser-assisted laser ablation method*, Appl.Surf.Sci. **197–198** (2002) 768–771
371. J. Homola, S. S. Yee and G. Gauglitz, *Surface plasmon resonance sensors: review*, Sensors and Actuators B **54**(1-2) (1999) 3-15;
372. J.-S. Sun, H.-C. Liu, W.H.-S. Chang, J. Li, F.-H. Lin, H.-C. Tai, Influence of hydroxyapatite particle size on bone cell activities: An in vitro study, J. Biomed. Mater. Res. **39**(3) (1998) 390–397;
373. Y. Cai, Y. Liu, W. Yan, Q. Hu, J. Tao, M. Zhang, Z. Shic, R. Tang, *Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation*, J. Mater. Chem. **17**(36) (2007) 3780–3787