

Universitatea din București
Facultatea de Fizică
Catedra de Optică, Spectroscopie, Plasmă, Laseri

REZUMAT

*Structurări de polimeri prin metode laser pentru crearea de
bio-interfețe cu aplicații biomedicale*

Doctorand:

Laurențiu – Nicolae Rusen

Conducător științific:

Prof. Univ. Dr. Tiberiu Tudor

București 2013

UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI
FACULTATEA DE FIZICĂ

CATRE

.....
Vă facem cunoscut că în ziua de, ora.....
în
va avea loc susținerea publică a tezei de doctorat intitulată

***Structurări de polimeri prin metode laser pentru crearea de
bio-interfețe cu aplicații biomedicale***

Elaborată de

LAURENȚIU-NICOLAE RUSEN,

în vederea acordării titlului științific de doctor în:

ȘTIINȚE EXACTE - FIZICĂ

cu următoarea comisie:

PREȘEDINTE:

Prof. Dr. Daniela Dragoman,
Directorul Școlii Doctorale de Fizică,
Universitatea din București

CONDUCĂTOR ȘTIINȚIFIC:

Prof. Dr. Tiberiu TUDOR,
Facultatea de Fizică,
Universitatea din București

MEMBRI:

Dr. Maria Dinescu,
Cercetător Științific Gradul I,
Institutul Național de Cercetare Dezvoltare pentru
Fizica Laserilor, Plasmei și Radiației

Dr. Aurel Stratan,
Cercetător Științific Gradul I,
Institutul Național de Cercetare Dezvoltare pentru
Fizica Laserilor, Plasmei și Radiației

Prof. Dr. Ștefan Antohe,
Facultatea de Fizică,
Universitatea din București

Prefață

În cadrul acestei lucrări sunt prezentate rezultatele obținute privind obținerea de suprafețe bi-dimensionale și tri-dimensionale bio-funcționale cu ajutorul metodelor și tehnicilor având la bază fasciculul laser.

Adresez mulțumiri tuturor celor care m-au ajutat în această activitate de cercetare și în elaborarea acestei lucrări.

Mulțumesc conducătorului meu științific Prof. Univ. Dr. Tiberiu Tudor pentru ajutorul acordat în timpul perioadei de doctorat, cât și pentru sfaturile în elaborarea acestei lucrări. De asemenea mulțumesc Doamnei dr. Maria Dinescu în grupul careia am realizat o mare parte din datele experimentale cât și analizele AFM. Mulțumiri speciale pentru Dr. Bogdana Mitu, Dr. Mihaela Filipescu, Dr. Andreea Matei și Dr. Cătălin Luculescu pentru investigațiile facute filmelor subțiri. Mulțumiri domnului Dr. Marian Zamfirescu pentru ajutorul oferit. Mulțumesc domnului Cosmin Mustaciosu din cadrul IFIN-HH pentru ajutorul dat la efectuarea testelor *in vitro*.

Mulumiri colegilor din cadrul grupului în care activez (Laboratorul ISOTEST) pentru înțelegerea și sprijinul acordat pe perioada elaborării prezentei teze.

Nu în ultimul rând, aș dori să mulțumesc Dr. Valentina Dinca - Carmen pentru ajutorul acordat în ultimii doi ani pentru realizarea și elaborarea acestei teze, cât și pentru răbdare și sprijinul deosebit în finalizarea cu succes a tezei mele.

Structurări de polimeri prin metode laser pentru crearea de bio-interfețe cu aplicații biomedicale

Capitolul I: Introducere și justificare	7
Capitolul II: Materiale, tehnici utilizate și metode de investigație	9
Capitolul III: Rezultate privind obținerea și caracterizarea filmelor obținute prin evaporarea laser asistată de o matrice – MAPLE	15
Capitolul IV: Rezultate privind procesarea filmelor de polimer cu laser în femtosecunde.	37
Capitolul V: Rezultate privind folosirea tehnicii de Transfer indus înainte cu laserul - LIFT pentru crearea de interfețe specifice pentru aplicații biologice	41
Capitolul VI: Concluzii și contribuții personale	44
Bibliografie selectivă	46
Lista de lucrări și prezentări	46

Introducere

Obiectivul acestei teze a fost acela de a combina metode laser (evaporarea laser pulsată asistată de o matrice, iradiere directă cu laserul în aer-MAPLE, transferul indus înainte cu laserul-LIFT) cu caracteristici specifice ale biomaterialelor (polimeri naturali și sintetici, factori bioactivi: proteine) pentru crearea de biointerfețe care să permită studiul și controlul interacțiunilor dintre celule și suprafața biomaterialelor. O direcție complementară urmărită în această teză a fost corelarea și studiul influenței modificării topografiei și a proprietăților suprafețelor asupra adeziunii, creșterii, inhibării și a interacțiilor celulare *in vitro*.

În aceasta teză am urmărit trei abordări:

1) obținerea prin MAPLE de biointerfețe sub forma de filme subțiri din polimeri sintetici și naturali, cu funcționalități multiple (și anume de la învelișuri rezistente la absorbția de proteine până la filme subțiri care îmbunătățesc funcțiile celulare: viabilitatea, aderența, proliferarea, etc.), caracterizarea morfologică și structurală și testarea lor *in vitro*,

2) obținerea, prin iradiere directă cu fascicul laser, de interfețe biopolimerice micro și nanostructurate pentru a induce o creștere orientată a celulelor, caracterizarea morfologică și structurală dar și testarea lor *in vitro* cu diverse linii celulare mamaliene și microbiene,

3) obținerea prin transfer laser LIFT de interfețe sub forma de matrici polimerice din diverse materiale bioactive (polimeri sintetici, proteine) pe substraturi repelente moi pentru celule, caracterizarea morfologică și structurală și testarea lor *in vitro*.

În capitolul 1, Introducere și justificare, am făcut o scurtă trecere în revistă a tehnicilor pentru obținerea de biointerfețe care să producă un răspuns biologic adecvat, unde am discutat despre avantajele și dezavantajele fiecărei metode în parte.

Capitolul 2 descrie metodele experimentale și materialele folosite, incluzând metode de fabricare laser (Evaporarea laser pulsată asistată de o matrice-MAPLE, iradiere directă cu laserul, transferul indus înainte cu laserul-LIFT) și metode de caracterizare (microscopie de fluorescență, teste de viabilitate, microscopie optică și electronică (SEM)).

Cel de al treilea capitol prezintă rezultatele obținute folosind metoda laser *MAPLE* pentru obținerea de filme subțiri multifuncționale (filme subțiri polimerice care să reziste absorbției de proteine dar care să nu inhibe dezvoltarea și proliferarea celulară; filme subțiri polimerice inteligente, care să permită aplicarea de stimuli pentru detașarea celulelor într-un mod neinvaziv; filme subțiri biodegradabile polimerice cu activitate anti-tumorală îmbunătățită și filme subțiri din compuși bioactivi (colagen, chitosan, laminină) care să producă o interfață îmbunătățită pentru aderența și rata de proliferare a celulelor.

În plus, am urmărit corelarea parametrilor de depunere prin MAPLE cu caracteristicile morfologice – structurale ale filmelor obținute și cu răspunsul biologic *in vitro*.

Cel de al patrulea capitol conține rezultatele obținute folosind iradierea directă cu laserul a biopolimerilor utilizați, punând accent pe corelarea caracteristicile morfologice (structuri tip șanțuri, gropi, spongios, etc.) cu orientarea și aderența celulelor.

În cel de al cincilea capitol, metoda de *Transfer Indus Înainte cu Laserul-LIFT* am folosit-o pentru obținerea de suporturi complexe cu componente polimerice microstructurate, din materiale biocompatibile organice, pentru creșterea orientată de celule.

În ultimul capitol am prezentat concluziile generale și o listare concisă a contribuțiilor personale cuprinse în cadrul tezei.

Rezultatele experimentale înglobate în aceasta teză au fost obținute, începând din octombrie 2011, în cadrul grupului “Procesare laser de filme subțiri” din Secția Laseri, INFLPR, grup condus de D-na dr. Maria Dinescu în colaborare cu grupul Laseri cu Corp Solid din Secția Lasere, INFLPR. O bună parte din rezultatele obținute în această teză au fost obținute în cadrul unui proiect de Tinere Echipe TE 43/2011 dintr-un program de cercetare finanțat de CNCS – UEFISCDI, Project Number PN-II-RU-TE-2011-3-0289 “Substraturi hibride biodegradabile și antibacteriene cu morfologie controlată și bio-activare localizată-Antimicrobial and degradable biohybrid substrates with controlled surface architecture combining localized bio activation with antifouling properties“, în INFLPR.

Capitolul I: INTRODUCERE ȘI JUSTIFICARE

În domeniul aplicațiilor biomedicale, posibilitatea de a controla atât forma, răspândirea și proliferarea celulelor atașate cât și a contactelor celulă-celulă, prin modificarea precisă a suprafeței substraturilor de cultură celulară, este extrem de importantă. În acest mod se pot dezvolta testele biologice celulare complexe care pot oferi noi perspective asupra factorilor topologici și chimici care controlează adeziunea, proliferarea și diferențierea celulelor.

Modificarea suprafețelor din punct de vedere chimic și topografic reprezintă o abordare valoroasă nu doar în cadrul studiilor biologice fundamentale, dar și pentru proiectarea unor substraturi de cultură celulară ce vizează ingineria țesuturilor. Din punct de vedere al ingineriei materialelor, aceste abordări s-au bazat în special pe combinarea tehnologiilor de micro-fabricare cu cele de funcționalizări bio-chimice, pentru obținerea de suprafețe bi-dimensionale și tri-dimensionale bio-funcționale pentru studii *in vitro*, și *in vivo* [I.1-I.2].

Interacțiunile și răspunsul celulelor la diverse suprafețe (de exemplu: adeziunea, proliferarea, diferențierea, migrația sau apoptoza) sunt influențate și ghidate de repererele multiple ale suprafețelor testate [I.3]. În plus, absorbția de diverse proteine care poate să activeze o aderență îmbunătățită a celulelor pe acea suprafață sau din contră, să inducă apariția de biofilme, apare tot la interfața biomaterial-celule sau biomaterial-țesut, iar proprietățile fizico-chimice ale suprafeței materialului pot modula aceste evenimente biologice.

Înțelegerea modificărilor morfologice și metabolice a celulelor sau țesutului induse de caracteristicilor suprafeței substratului este de o importanță enormă pentru domeniile de biomateriale și inginerie tisulară. Modificarea suprafețelor biomaterialelor reprezintă o cale promițătoare de inginerie a biofuncționalității la interfața material-țesut, pentru a modula răspunsurile biologice. Au fost dezvoltate numeroase metode de modificare a suprafeței pentru toate clasele de materiale pentru a modula răspunsurile biologice și îmbunătățirea performanței [I.5-I.8].

Modificările de suprafață se împart în două categorii generale:

I. modificările fizico-chimice care implică modificări la nivelul moleculelor de la suprafață. Modificările fizico-chimice includ reacții chimice (de exemplu oxidare, reducere, silanizarea, acetilare), erodarea suprafeței și modificarea rugozității acesteia prin metode

mecanice (ex. lustruire) și structurare. În cadrul utilizării **modificărilor chimice**, pentru a modifica suprafețele biomaterialelor, au fost dezvoltate reacții chimice specifice și non specifice, de la implantarea de molecule de interes pe suprafață (de exemplu foto-grafting, depunere cu plasmă), reacții non-covalente (de exemplu, depunere în atmosferă de vapori, evaporare solvent), depunere strat-cu-strat de polielectroliți, filme auto-asamblate până la adsorbție pasivă a biomoleculilor [I.2].

II. acoperiri de suprafață constând dintr-un material diferit de cel folosit drept suport.

Acoperirile includ inserarea de factori bioactivi (ex. biomolecule), acoperiri non-covalente și covalente, precum și depuneri de straturi subțiri de materiale bioactive pe substratul folosit în studiile biomedicale.

Metodele de prelucrare a suprafețelor cu ajutorul metodelor laser prezintă avantaje distincte, comparativ cu metode alternative de prelucrare a materialelor, care pot fi rezumate după cum urmează:

(a) versatilitate, deoarece poate fi aplicate pentru o gamă largă de materiale.

(b) rapiditate, adaptabilitate și scalabilitate, prin procesare paralelă.

(c) non contact.

(d) flexibilitate în selecția de parametri care pot permite manipularea materialelor biologic sensibile și a celulele vii fără pierderea activității lor.

(e) caracteristici de înaltă rezoluție, până la dimensiuni de ordinul zecilor nanometri.

Tehnicile de procesare laser prezintă posibilitatea unică de a combina topografiile micro și nano, în cadrul aceleiași suprafețe, pentru aplicații de inginerie tisulară.

Printre tehnicile pe bază laser de micro-și nano fabricare implicate în fabricarea de construcții micro pentru ingineria țesuturilor se pot enumera: (a) transfer cu laser de biomateriale pentru fabricație de bio-micro-dispozitive (ce include tehnici de scriere-directă (DW) cum ar fi scrierea directă prin evaporare laser pulsată asistată de o matrice (MAPLE DW), transfer laser-indus înainte (LIFT), (b) laser-based solid-free-form (SFF) și (c) prelucrare în câmp apropiat și depărtat (NSOM).

Pentru a evita deteriorarea fotochimică și de descompunere a materialelor cauzate de metoda PLD, a fost introdusă o nouă tehnică de depunere laser pe baza de matrice-asistată evaporare laser pulsată (MAPLE), care va fi discutată în aceasta teză.

Capitolul II: Materiale, tehnici utilizate și metode de investigație

II.1. Materiale polimerice biocompatibile

Materialele polimerice sintetice sunt des folosite în locul celor naturale datorită proprietăților acestora favorabile în ceea ce privește prelucrarea, procesarea suprafețelor și controlul asupra chimiei produsului, și nu în ultimul rând, lipsa contaminării și posibilitatea sterilizării. În funcție de tipul de aplicație, există o mare varietate de polimeri care poate fi folosită pentru îmbunătățirea proliferării celulare, a minimalizării absorbției de proteine, etc.

Au fost folosiți următorii polimeri:

- pNIPAM (PNIPAM, pNIPAAm) poly(N-isopropylacrylamide) este un polimer ce răspunde la modificările de temperatură.
- Poly(ethylene glycol)-block-poly(ϵ -caprolactone) methyl ether PEG average Mn ~5,000, polycaprolactone average Mn ~5,000, PEG-PCL este un copolimer care se caracterizează printr-o biodegradabilitate și hidrofobicitate îmbunătățită [II.1.2].
- Chitosanul (CS) este un polimer cationic natural biocompatibil, ce prezintă o toxicitate redusă, stabilitatea mecanică, permeabilitatea la gaze, buna absorbție.
- Colagenul este cea mai abundentă proteină existentă pe Pământ cu o paletă largă de aplicabilitate, de la industria alimentară până la diverse aplicații în medicină.
- Laminina este o proteină ce intră în alcătuirea *Matricii extracelulare* (ECM), este esențială în creșterea de celule, cât și în vindecarea rănilor.
- Cisplatina (Cs) este un medicament chimioterapeutic folosit în tratarea cancerului.
- Lactoferina este o proteină multifuncțională din familia transferinelor, un grup de proteine din compoziția plasmei sanguine ce controlează nivelul de fier din organismul uman. având totodată o puternică activitate antimicrobiană

II.2. Metode bazate pe radiația laser pentru structurări de polimeri

Sunt prezentate metodele laser (Evaporare Laser Pulsată Asistată de o Matrice - MAPLE, Transfer Indus Înainte cu Laserul-LIFT și iradierea directă/procesarea materialului) ce conduc la obținerea de suporturi polimerice hibride complexe micro și nano structurate, folosite ca platforme pentru creșterea orientată de celule.

II.2.1. Evaporarea Laser Pulsată Asistată de o Matrice (Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation - MAPLE)

Pentru tehnica MAPLE, ținta este formată din materialul ce urmează a fi depus (în proporție de 1 - 5 %) dizolvat într-un solvent (matrice). Amestecul obținut este înghețat într-un suport de țintă (în aceste experimente am utilizat un vas de cupru) folosindu-se azot lichid. Alegerea solventului este foarte importantă, astfel încât materialul de depus/transferat (polimerul) să se poată dizolva (fără interacții chimice care să îi modifice structura), în același timp solventul fiind capabil să absoarbă energia laserului. Suportul țintă este răcit continuu în timpul depunerii, pentru aceasta folosindu-se azot lichid. Distanța dintre suportul țintei și substratul pe care este depusă este de 30mm-40mm ($\pm 5\%$).

În urma iradierii cu fasciculul laser focalizat pe țintă, se formează un strat care provine de la moleculele polimerului evaporat ce se depune pe un substrat, în timp ce moleculele volatile ale solventului se evaporă, fiind evacuate prin pompa din camera de depunere [II.2.3]. Procesul are loc într-o incintă de vid, presiunea folosită în cadrul experimentelor fiind de ordinul a 10^{-4} mbar – 10^{-5} mbar.

În figura II.2.1 este prezentat principiul MAPLE.

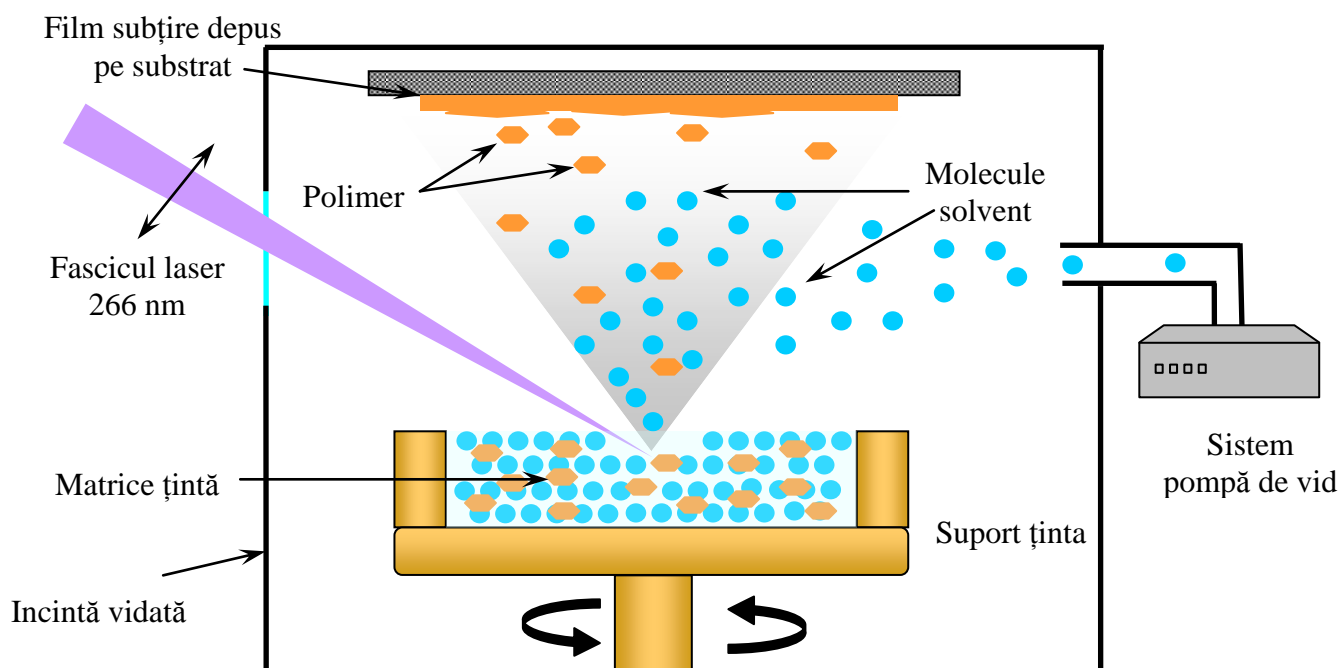


Figura II.2.1 Reprezentarea schematică a tehnicii MAPLE

II.2.2. Transfer Indus Inainte cu Laserul (Laser Induced Forward Transfer - LIFT)

Transferul controlat de “arhitecturi” sau de structuri de polimeri într-o locație aleasă se poate realiza prin “transfer laser indus înainte” (Laser Induced Forward Transfer - LIFT).

Metoda LIFT are loc în 3 etape:

1. îndepărtarea cantității de film subțire de pe stratul donor,
2. transferul filmului subțire în condiții normale de atmosfera și presiune,
3. depunerea filmului pe stratul acceptor.

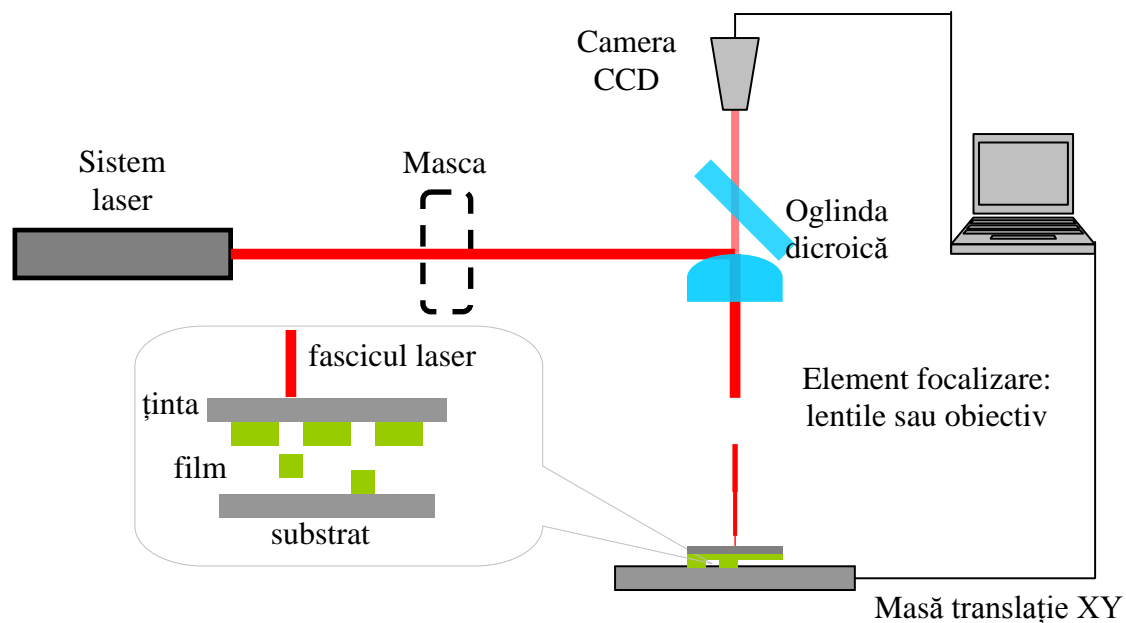


Figura II.2.2 Reprezentarea schematică a tehnicii LIFT

În cazul tehnicii LIFT-DRL (transfer laser indus înainte în prezența unui strat dinamic de sacrificiu – **Dinamic Release Layer**), ținta o reprezintă un suport transparent la lungimea de undă folosită, care este acoperit cu materialul de transferat sau cu un strat de sacrificiu peste care este pus materialul de transferat. Straturile (dinamice sau de sacrificiu) de transfer sunt folosite pentru a evita iradierea directă a compușilor sensibili, spre deosebire de metoda LIFT clasică (Figura II.2.4), ele constând dintr-un material ce absoarbe radiația laser.

II.2.3. Sistemul de texturare directă cu laserul

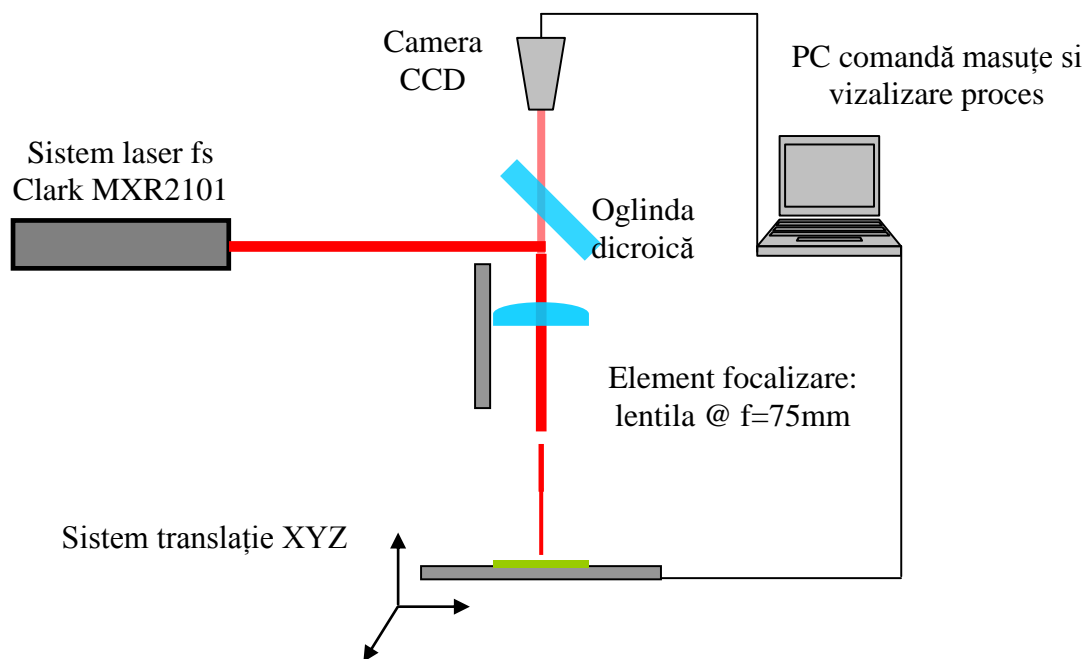


Figura II.2.3 Stația de lucru cu pulsuri de ordinul femtosecundelor

Microprocesarea de biopolimeri a fost efectuată folosindu-se instalația prezentată mai jos, din cadrul grupului *Lasere cu Corp Solid*, Secția Lasere, Institutul Național pentru Fizica Laserelor, Plasmei și Radiației, grup condus de Dr. Razvan Dabu.

În figura II.3.5 este prezentat schematic stația de lucru cu pulsuri de ordinul fs. Elementele principale sunt în continuare prezentate pe scurt, acest sistem cât și aplicațiile fiind descrise pe larg în articolul „*Laser Processing and Characterization with Femtosecond Laser Pulses*”, M. Zamfirescu et al. publicat în 2010 în *Romanian Reports in Physics*, Vol. 62, No. 3, P. 594–609. Sistemul de atenuare permite o variație continuă și precisă a energiei laser. El constă dintr-o lamă $\lambda/2$ dispusă într-o montură motorizată și un polarizor Glan. Sistemul de transport și focalizare constă dintr-o serie de oglinzi HR la 775 nm și la 387 nm. Elementul de focalizare îl reprezintă o oglinda *BestShape* cu distanța focală de 75 mm. Pentru lungimea de undă de 775 nm, diametrul spotului focalizat este de aproximativ 27 micrometri.

Sistemul de transport al probei este alcătuit din trei mese de translație tip Thorlabs LNR50M prevăzute cu actuatori motorizate de tip Thorlabs DRV014. Deplasarea minimă este mai mică de 0.20 micrometri, viteza de deplasare fiind de până la 2 mm/s [II.3.11-12]. Mesele de translație sunt controlate prin intermediul unui software dezvoltat în cadrul grupului *Lasere cu Corp Solid*, de către Dr. Marian Zamfirescu.

II.3. Sisteme laser folosite.

Au fost folosite 2 tipuri de sisteme laser pentru obținerea structurilor de bio-polimeri în aceasta teză :

- Sistemul laser în femtosecunde Clark-MXR CPA-2101 bazat pe tehnica CPA (Chirped Pulsed Amplification)

În tabelul de mai jos sunt prezentați parametrii fasciculului original în aproximația fascicul stigmatic.

Parametrii spațiali ai fasciculului	Valoarea medie	Unitați masura	Abaterea standard	Unitați masura
Locatia taliei z_{01}	800	mm	19	%
Diametrul fascicul la talie $d_{\sigma 01}$	3.1	mm	2.5	%
Lungimea Rayleigh z_{R1}	3950	mm	5	%
Unghiul de divergență $\theta_{\sigma 1}$	0.8	mrاد	3.5	%
Factorul de propagare M^2	2.51	-	4	%

Pentru determinarea caracteristicilor temporale (duratei efectivă a pulsurilor laser de femtosecunde) s-a folosit dispozitivul GRENOUILLE 8-50 (Swamp Optics, LLC) și programul software asociat *QuickFrog* (Femtosoft Technologies, LLC). Rezultatele sunt următoarele: $t_{\text{eff}}=282$ fs, $u_{A\text{teff}}=\sigma t_{\text{eff}}\approx 4\%$ și $t_{\text{FWHM}}=256$ fs, $u_{A\text{tFWHM}}=\sigma t_{\text{FWHM}}\approx 6$.

- Sistemul laser în nanosecunde Surelite II Continuum.

Caracteristicile spațiale, energetice și temporale ale sistemului laser au fost măsurate conform standardelor ISO, mai precis ISO 11554 și ISO 11146-1. Folosindu-se montajele experimentale prezentate în capitolul II.3.1, au fost obținute următoarele caracteristici ale laserului.

Energia (mJ): 650@1064 nm, 100@366 nm; 80@256 nm.

Durata pulsului (ns): 6 @ 1064 nm, 366 nm; 256 nm.

Diametrul pulsului (mm): 7 @ 1064 nm, 366 nm; 256 nm.

Divergența (mrاد): 0.5 @ 1064 nm, 366 nm; 256 nm.

Stabilitatea energetică ($\pm\%$): 2.5@1064 nm, 4@366 nm; 7@256 nm.

II.4. Metode de analiză utilizate

- Microscopia de forță atomică (AFM) și microscopia electronică cu baleiaj (SEM) au fost folosite pentru analiza aspectului și al rugozității suprafeței filmelor. Această metodă ne oferă o imagine topografică de înaltă rezoluție a suprafețelor prelucrate cu laserul, datorită rezoluțiilor imaginii până la scara atomică. Imaginile suprafețelor caracterizate prin tehnica AFM prezentate în aceasta lucrare sunt obținute în modul non-contact; acest mod de lucru fiind preferat pentru a nu se influența artificial topografiile suprafețelor polimerice.
- Structura chimică a filmelor a fost studiată folosindu-se spectroscopia de infraroșu cu transformata Fourier (Fourier Transform InfraRed FTIR). Spectroscopia de infraroșu cu transformată Fourier este o tehnică nedistructivă de analiză chimică. Este una din cele mai folosite metode folosite în caracterizarea filmelor subțiri, permițând identificarea compușilor chimici organici sau anorganici. Aceasta tehnică are la baza proprietatea diferitelor grupări chimice de a avea frecvențe de rezonanță specifice în domeniul IR al spectrului electromagnetic (prezintă benzi de absorbție/transmisie).
- Microscopia electronică cu baleiaj (SEM–Scanning Electron Microscopy) este o tehnică utilizată pe scară largă în analiza suprafețelor, oferindu-ne informații importante asupra morfologiei suprafeței investigate, cât și asupra compoziției chimice. Rezoluții de ordinul nanometrilor (1-10 nm) pot fi obținute la momentul actual folosindu-se acest tip de aparate.
- Microscopia de fluorescență este o metodă de analiză des folosită în domeniul biotehnologiilor cât și în cel al științei materialelor datorită particularităților în modul de operare, particularități ce nu se găsesc în microscopia tradițională. Folosirea unor substanțe fluorochrome (compuși chimici fluorescenți ce absorb o radiație la o anumită lungime de undă, reemițând-o la o lungime de undă mai mare) fac posibilă identificarea celulelor și a componentelor subcelulare. Microscopia de fluorescență a fost folosită în cadrul acestei lucrări pentru studiul celulelor.

Capitolul III. Rezultate privind obținerea și caracterizarea filmelor obținute prin metoda MAPLE pentru aplicații biomedicale

În cadrul acestui capitol am urmărit 4 direcții de cercetare, în funcție de aplicația vizată, și anume:

- i) Obținerea de filme subțiri polimerice care să reziste absorbției de proteine dar care să nu inhibe dezvoltarea și proliferarea celulară;
- ii) Obținerea de filme subțiri polimerice inteligente, care să permită aplicarea de stimuli pentru detașarea celulelor într-un mod neinvaziv;
- iii) Obținerea de filme subțiri biodegradabile polimerice cu activitate anti-tumorală îmbunătățită;
- iv) Obținerea de filme subțiri din compuși bioactivi (colagen, chitosan, laminină) care să producă o interfață îmbunătățită pentru aderența și rata de proliferare a celulelor.

În plus, s-a urmărit corelarea parametrilor de depunere prin MAPLE cu caracteristicile morfologice - structurale ale filmelor obținute și cu răspunsul biologic *in vitro*.

III.1.1 Obținerea de filme subțiri polimerice prin metoda MAPLE care să reziste absorbției de proteine

La momentul actual există un mare interes în dezvoltarea de acoperiri polimerice biomedicale care pot rezista adsorbției de proteine, în special pentru unele aplicații supuse la un mediu biologic, cum ar fi sistemele *lab-on-chip* sau acoperirile de implant. Tehnica MAPLE (i.e. Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation) este o tehnică ce permite controlul asupra omogenității și grosimii acoperirii precum și asupra structurii chimice și stabilității fizice într-un mediu aspru. Luând în considerare aceste cunoștințe, abordarea mea a fost de a combina avantajele oferite de caracteristicile unui copolimer pe bază de PEG care conține grupări funcționale de metil-eter cu metoda laser MAPLE pentru obținerea de acoperiri stabile care resping proteinele.

Caracterizarea chimică a filmelor de copolimer a fost obținută folosindu-se metoda FTIR. structura chimică a filmelor depuse prin MAPLE e asemănătoare cu cea a filmului depus prin drop-casting.

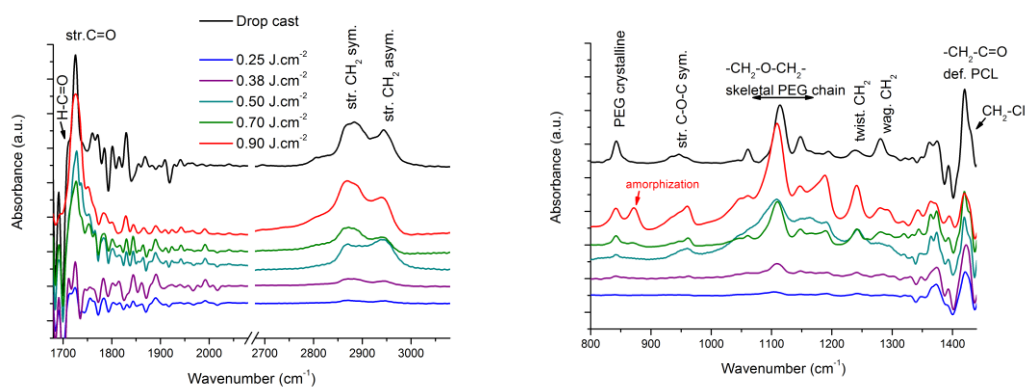


Figura III.1 Spectrele filmelor de copolimer PEG -PCL Me (10k pulsuri) depuse la diferite fluențe laser, cu negru fiind filmul depus prin drop-cast (1%)
 [L. Rusen et al., *Applied Surface Science*, 278, (2013): 198–202]

În figura III.1 sunt prezentate spectrele filmelor depuse la diferite fluențe laser. Ca referință s-a folosit un spectru pentru copolimer PEG-block-PCL Me depus prin metoda drop-cast. Nu a fost observat în nici unul din cazuri, în timpul procesării prin metoda MAPLE, o descompunere semnificativă datorată radicalilor liberi de Cl din compunerea cloroformului. Semnătura specifică a legăturii $\text{CH}_2 - \text{Cl}$ este observată în jurul vârfului la 1430 cm^{-1} suprapusa cu deformarea vibrațională a legăturii $\text{CH}_2\text{-C=O}$.

III.1.2 Analiza morfologică a copolimerului PEG-PCL

Investigații AFM au fost efectuate pentru a evalua organizarea la nivel micro și nano a filmelor depuse. Filmele depuse prin metoda drop-casting se caracterizează printr-o suprafață iregulară, polimerul formând structuri gen insule și crăpături după evaporarea solventului, chiar și atunci când evaporarea a fost încetinită prin păstrarea probei într-o incintă umedă.

În figura III.2a este prezentată morfologia filmului de copolimer obținut prin drop-cast, ce se caracterizează printr-o rugozitate accentuată, mai mare de 400 micrometri.

Folosind o fluență laser în intervalul $0.2 \text{ Jcm}^{-2} - 0.4 \text{ Jcm}^{-2}$ suprafețe netede cu o rugozitate sub 12 nm au fost obținute (figura III.2b). Mărind fluența laser în jurul valorii de

0.5 Jcm^{-2} , se poate observa că suprafețele au o morfologie complexă, structuri gen insulă cu diametre de ordinul a 1 micron apărând pe filmul depus (figura III.2c).

De asemenea, în afara fluenței laser, și compoziția țintei joacă un rol important în obținerea de rugozități scăzute. Formarea de structuri cu forma iregulară am redus-o prin micșorarea compoziției polimerului în țintă, de la o concentrație de polimer de 1.5 % la o concentrație a polimerului de 0.5 %. [AI]

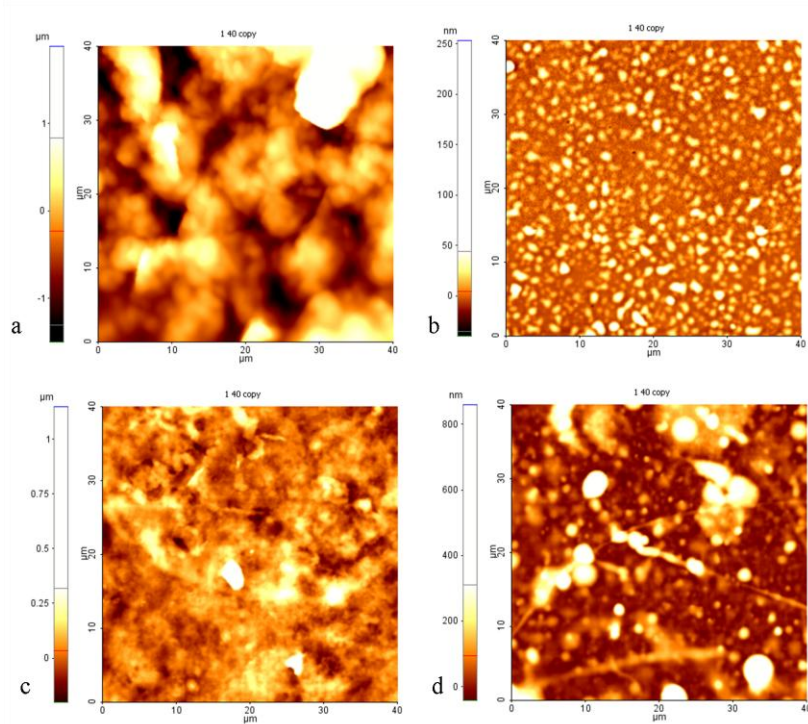


Figura III.2 Imagini AFM ale filmelor depuse prin: a) drop-cast (referința) și MAPLE [L. Rusen et al., *Applied Surface Science*, 278, (2013): 198–202]

III.1.3 Studiul absorbției de proteine

Proprietatea acoperirilor de a respinge proteinele este dependentă de proprietățile suprafeței sale cum ar fi morfologia, umectabilitatea și caracteristicile de interfață.

Valori mari ale unghiului de contact corelate cu suprafețe rugoase sunt caracteristice pentru valori ale fluenței peste valoarea 0.5 Jcm^{-2} , în timp ce pentru fluențe joase suprafețele sunt caracterizate de unghiuri de contact mici și rugozități scăzute. În figura III.3 este prezentată corelația dintre fluența și unghiul de contact.

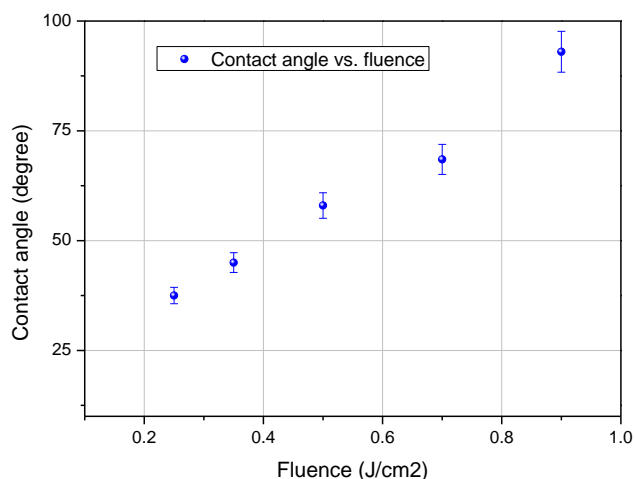


Figura III.3 Relația dintre fluența și unghiul de contact absorbția de proteine.

Absorbția proteinelor BSA pe acoperirile obținute prin metoda MAPLE au pus în evidență două direcții: absorbție scăzută pe filmele cu rugozitate mică obținute cu fluențe laser sub 0.4 Jcm^{-2} și o absorbție mare pe acoperirile obținute cu fluențe peste valoarea de 0.5 Jcm^{-2} , după cum se poate observa în figura III.4. Totodată absorbția de proteine este corelată și cu rugozitatea suprafeței.

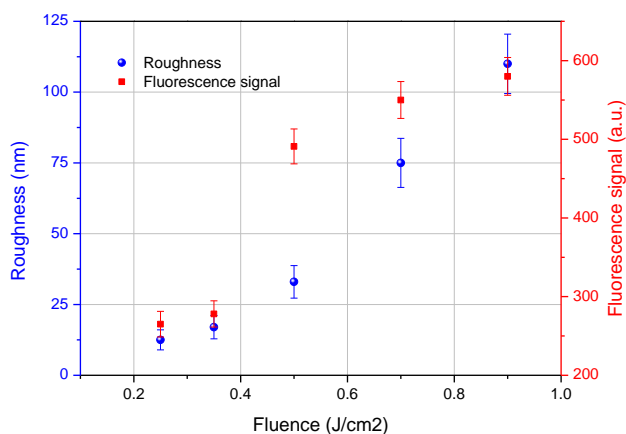


Figura III.4 Relația dintre fluența, rugozitate și absorbția de proteine.

Iregularitățile înălțimilor filmelor subțiri pot influența mobilitatea proteinelor absorbite. În figura III.5 este prezentată dependența rugozității de fluența radiației laser.

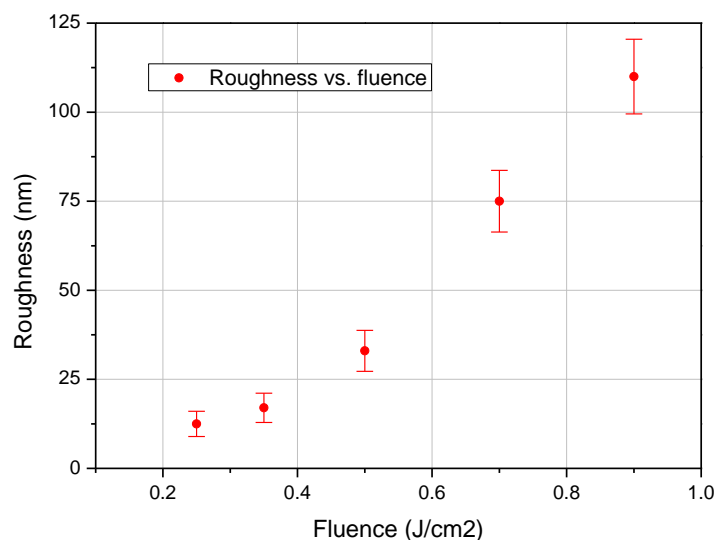


Figura III.5 Relația dintre fluența radiației laser și rugozitate.

Se poate observa că pentru rugozități scăzute (de aproximativ 12 nm, comparabile cu dimensiunea BSA de 4nm/4nm/14nm), materialul are oportunități limitate pentru reorganizare și hidratare, prezentând astfel o suprafață non-absorbabilă; în contrast cu suprafețe cu rugozitate mare ce prezintă o suprafață mare pentru hidratare și reorganizare celulară.

III.1.4 CONCLUZII

Rezultatele prezentate în acest subcapitol dovedesc că copolimerul *PEG- PCL Me* poate fi folosit ca o acoperire rezistentă la acțiunea proteinelor. Totodată tehnica MAPLE se dovedește a fi potrivită pentru obținerea unor acoperiri cu caracteristici fizice și chimice adaptabile conform cerințelor noastre. Calitatea suprafeței și densității filmelor obținute prin această metodă este modificabilă funcție de fluența fasciculului laser, numărul pulsurilor cât și compoziția țintei. Filmele de polimeri obținuți prin această metodă prezintă o structură chimică similară cu cea a filmului de referință, mici modificări ale benzilor de absorbție la FTIR fiind întâlnite doar la fluențe înalte. Studiile biofizice referitoare la absorbția proteinelor BSA pe suprafețe cu diferite umectabilități (wettability) au arătat că suprafețele hidrofobe au tendința de a absorbe proteinele din soluții pe când suprafețele hidrofile sunt mult mai rezistente.

Rezultatele finale arata ce prezența coplimerului pe post de acoperire reduce semnificativ absorbția de proteine. Proteinele au un efect cunoscut prin facilitarea atașării microbiana și formarea ulterioară de biofilme pe suprafețe care în final duce la facilitarea unor culturi microbiene, efect nedorit în cazul implanturilor. [A1]

III.2 Obținerea de filme subțiri polimerice inteligente, care să permită aplicarea de stimuli pentru detașarea celulelor într-un mod neinvaziv

Filmele subțiri multifuncționale folosite ca substraturi sensibile la temperatură pentru obținerea de suprafețe celulare reprezintă o parte importantă în cadrul ingineriei țesuturilor. Morfologia și compoziția chimică a suprafețelor sunt date atât de natura materialului folosit dar și de metoda de fabricație. Poly(N-isopropyl acrylamide) sau mai pe scurt pNIPAM-ul, face parte din categoria materialelor inteligente, fiind un polimer ce răspunde la modificările de temperatură. Acest polimer prezintă un interes special în domeniul bio-tehnologiilor datorită unei proprietăți și anume schimbarea fazei pe care o suferă la variația de temperatură.

III.2.1. Caracterizare structurală

În figura III.6 sunt prezentate spectrele FTIR ale filmelor de pNIPAM obținute prin tehnica MAPLE. Caracteristicile de vibrație ale grupărilor funcționale din filmele subțiri au fost analizate și comparate cu cele ale filmului depus prin drop-cast. Spectrele FTIR confirmă faptul că grupările funcționale ale filmelor de pNIPAM depuse prin MAPLE coincid cu cele ale referinței.

De exemplu absorbțiile caracteristice 3292 cm^{-1} (corespunzătoare grupării N-H stretching), 2970 cm^{-1} (corespunzătoare grupării -CH₃ asymmetric stretching), 1650 cm^{-1} (corespunzătoare grupării C=O), și la 1550 cm^{-1} (corespunzătoare grupării C=O stretching, pentru legătura amide II bond) cât și benzile de deformare ale grupării isopropil metil (-CH(CH₃)₂) la 1368 and 1388 cm^{-1} , intensitățile mari fiind datorate creșterii grosimii filmelor datorită fluențelor laser mărite. Această proprietate permite un control simplu al adeziunii celulare: la temperaturi înalte pNIPAM-ul devine hidrofobic și interacționează mai rapid cu proteinele și celulele, pe când la temperaturi mai joase grupările hidrofile sunt predominante și împiedică interacțiunea cu proteinele.

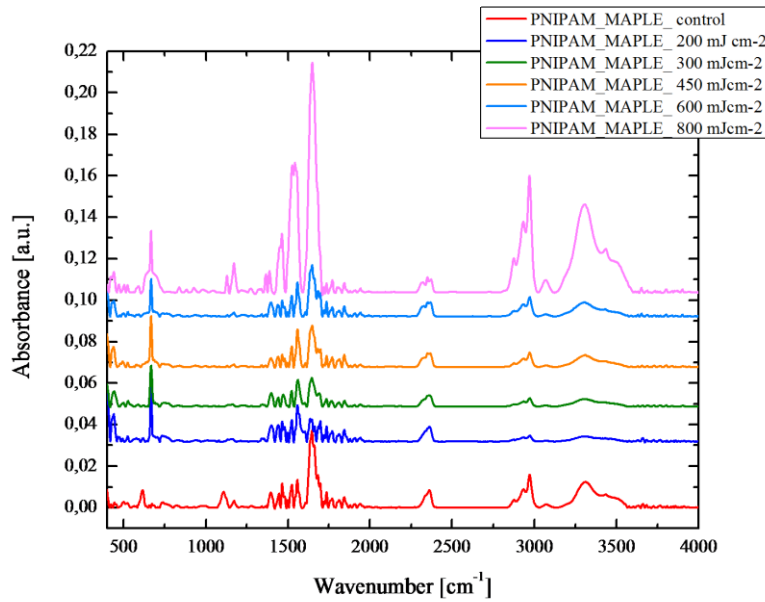


Figura III.6 Spectrele FTIR ale filmelor subțiri de pNIPAM
 [L. Rusen et al., *Applied Surface Science*, 302, (2014): 134–140]

III.2.2 Caracterizarea morfologică a filmelor subțiri

Tehnica MAPLE ne permite un control ușor asupra morfologiei și grosimii filmului prin variația fluenței laser și a numărului de pulsuri. Figura III.7 prezintă imagini AFM ale acoperirilor de pNIPAM obținute prin drop-cast (referința) și la diferite fluențe laser 200 mJ cm⁻² (b), 300 mJ cm⁻² (c), 600 mJ cm⁻² (d) și 800 mJ cm⁻² (e).

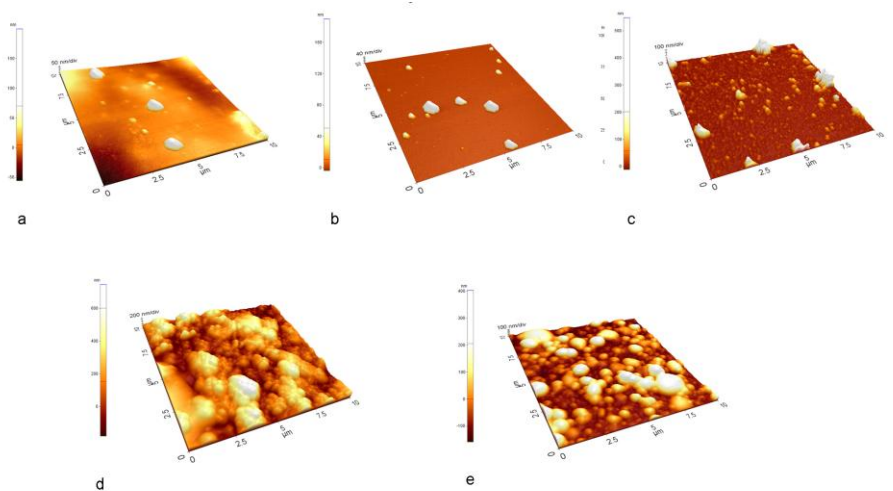


Figura III.7 Imagini AFM ale acoperirilor de pNIPAM obținute prin drop-cast (referința) și la diferite fluențe laser
 [L. Rusen et al., *Applied Surface Science*, 302, (2014): 134–140]

III.2.3 Studiul *in vitro* al filmelor subțiri de pNIPAM

Pentru a monitoriza atașamentul celulelor L929, am comparat comportarea celulelor pe filmele subțiri de pNIPAM obținute prin MAPLE cu suprafață de control (o lamelă de sticlă) și cu filmul obținut prin drop-cast.

Celulele prezintă caracteristici diferite funcție de suprafața pe care au fost testate. Pentru suprafețele de control (sticla sau polistiren tratat), forma tipică prezentă este cea poligonală, formă adoptată de celule și pe filmele de pNIPAM depuse în intervalul de fluențe 200-600 mJcm^{-2} . În schimb, pe suprafețele obținute prin evaporarea picăturii de polimer, sau prin MAPLE dar cu fluențe mai mari de 600 mJcm^{-2} , celulele au tendința de a se rotunji, sugerând faptul că aceste suprafețe nu permit aderența și proliferarea celulară.

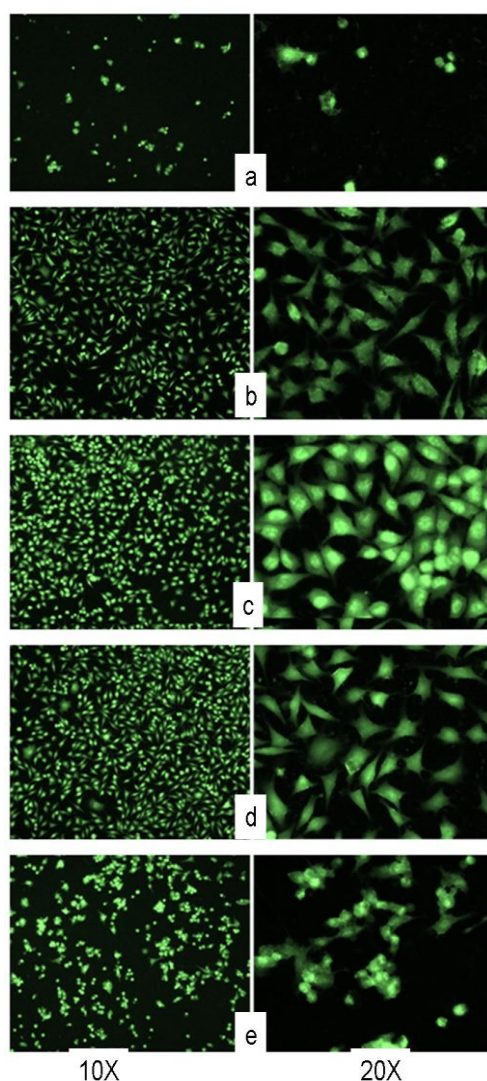


Figura III.8 Imagini de fluorescență ale celulelor L929 pe suprafețele de bio-polimer pNIPAM (scală 20 μm)

[*L. Rusen et al., Applied Surface Science, 302, (2014): 134–140*]

III.2.4 Studiul detașării celulare

Figura III.9 arată procentul de celule desprinse din ambele filme subțiri de pNIPAM în funcție de scăderea temperaturii mediului de cultură pentru diverse intervale de timp.

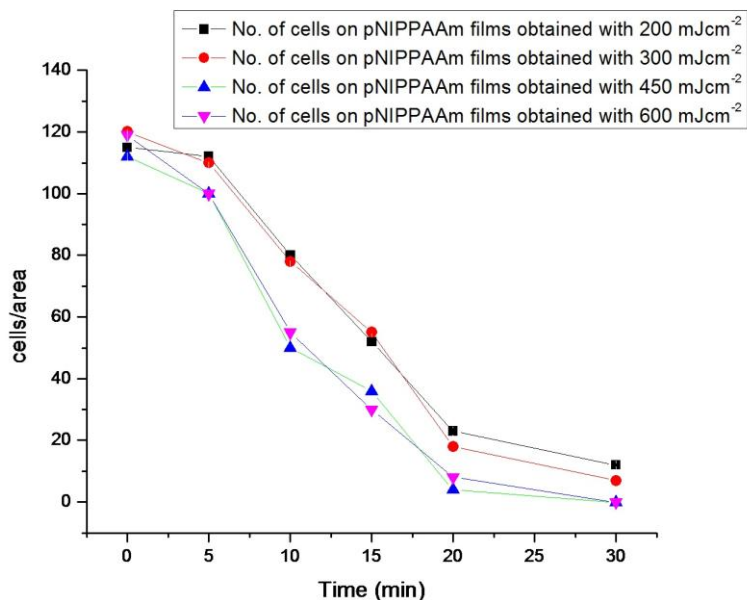


Figura III.9 Procentul de celule desprinse de pe filmele subțiri de pNIPAM obținute prin MAPLE la diferite intervale de timp
[L. Rusen et al., *Applied Surface Science*, 302, (2014): 134–140]

În figura III.10 este prezentată o secvență de imagini reprezentând desprinderea celulelor de pe suprafața unui film de pNIPAM (450 mJcm^{-2}).

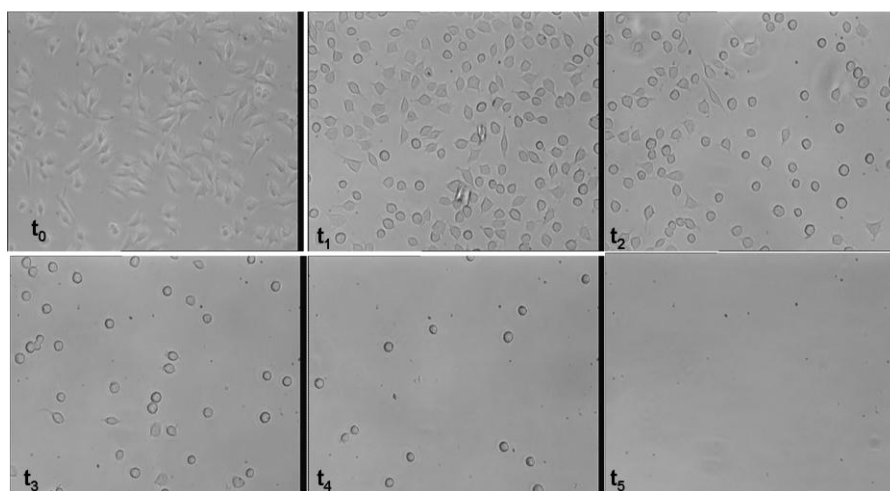


Figura III.10 Secvență de imagini ce prezintă desprinderea celulelor de pe suprafața unui film de pNIPAM
[L. Rusen et al., *Applied Surface Science*, 302, (2014): 134–140]

Pentru a testa dacă s-au produs modificări de natură structurală sau funcțională ale celulelor L929 în timpul detașării, celulele desprinse au fost recuperate și analizate după incubarea lor la 37°C pe filme noi subțiri de PNIPAM. În urma analizării celulelor, s-a observat că acestea au crescut și proliferat, indicând faptul că nu s-au produs deteriorări structurale sau funcționale ale celulelor. [A2]

III.2.3 Concluzii

În urma acestui studiu, am demonstrat că metoda MAPLE este o metodă fezabilă pentru a obține suprafețe cu răspuns termic pentru studii de adeziune și detașare celulară. MAPLE ne permite un control ușor asupra grosimii filmului subțire prin variația fluenței laser și a numărului de pulsuri. Avantajul adus este că se pot fabrica filme subțiri cu grosimi de sute de nanometri (400-500 nm) capabile pentru găzduirea celulelor.

Rezultatele și studiile efectuate ne arată că celulele fibroblaste L939 aderă și se înmulțesc pe filmele subțiri obținute la fluențe laser între 200-600 mJcm⁻², comparativ cu cele obținute la 800 mJcm⁻² unde atașamentul celular este scăzut. De asemenea rugozitatea filmelor subțiri joacă un rol important în culegerea celulelor prin influența asupra duratei de detașare a celulelor. S-a observat ca filmele cu o suprafața fină grăbesc acest interval de timp cu 25%.

În toate cazurile s-a observat în schimb că celulele colectate nu erau modificate din punct de vedere al viabilității sau formei lor, ceea ce ne arată ca controlul atașamentului și desprinderii de celule prin schimbarea temperaturii este reversibil și reproductibil. [A2]

III.3 Obținerea de filme subțiri biodegradabile polimerice cu activitate anti-tumorală îmbunătățită prin metoda MAPLE

S-a demonstrat potențialul tehnicii MAPLE pentru încorporarea unor multipli factori bioactivi, cum ar fi Cis și Lf, într-un film subțire polimeric sintetic policaprolactona (PCL), într-un singur pas și în condiții de vid, astfel încât solvenții sau condițiile de depunere să influențeze cât mai puțin funcționalitatea acoperirilor finale. Efectul *in vitro* al morfologiei și proliferării celulelor melanom B16-F10 a fost investigat și rezultatele interacțiunilor celulelor cu filmele subțiri funcționalitate au fost corelate atât cu chimia suprafeței cât și cu topografia ei.

Țintele au fost pregătite prin omogenizarea unei soluții de PCL în toluen (0.5 wt. %) și a unei soluții de Apo-rLF și Cis în apa (1.5 wt. %) și înghețarea rapidă prin punerea amestecului în suportul țintei și răcirea lor cu azot lichid.

Ținta multi-compartimentată ce conține soluțiile înghețate permite fascicului laser să baleieze suprafețele celor 2/3 soluții în aceleași condiții de vid. Ținta a fost plasată în camera de reacție și ținută înghețată în timpul depunerii. Substratul l-am plasat la o distanță de aproximativ 30 mm de țintă.

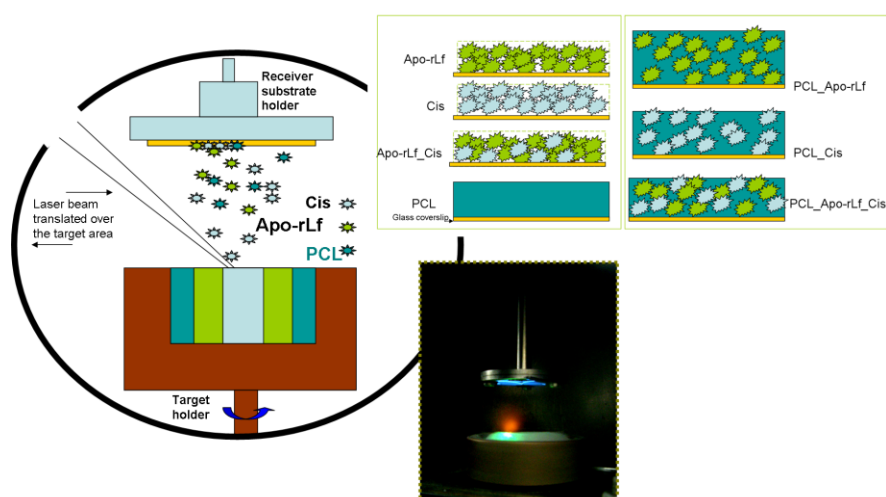


Figura III.11 Sistemul de depunere MAPLE (inserată este o imagine din interiorul camerei în timpul depunerii) și depunerile corespunzătoare.

[V.Dinca, L.E.Sima, L.Rusen et al, *Biomedical Microdevices*, 16, (2014): 11-21]

Filmele obținute prin MAPLE le-am comparat cu cele obținute prin metoda drop-cast, ce reprezintă suprafețele de referință. Din figura III.12 a,b se poate observa că spectrele FTIR nu prezintă o diferență semnificativă între grupările funcționale ale filmelor subțiri. Diferența între vârfurile intensităților este cauzată de diferența între grosimile filmelor obținute prin drop cast și prin MAPLE.

Benzile tipice în IR pentru modurile de întindere ale PCL-ului sunt observate pentru ambele probe (drop cast și MAPLE). Acestea includ 2923 cm^{-1} (asymmetric $-\text{CH}_2-$ stretching), 2857 cm^{-1} (symmetric $-\text{CH}_2-$ stretching), 1720 cm^{-1} (legătura dubla carbonyl, $>\text{C}=\text{O}$), 1293 cm^{-1} (C-O și C-C în faza cristalină) și 1240 cm^{-1} . Vârfurile la 1420 cm^{-1} și 1725 cm^{-1} sunt datorate deformărilor $-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$ și respectiv vibrațiilor $>\text{C}=\text{O}$ ale grupului eter carbonil din PCL (asymmetric C-O-C stretching). Benzile de absorbție ale

legăturii moleculare C–O–H apar între 1000cm^{-1} și 1160cm^{-1} . Vârful observat la 947cm^{-1} este atribuit vibrațiilor simetrice ale legăturii C–O–C.

Benzile în IR între 1490cm^{-1} până la 1580cm^{-1} sunt datorate vibrațiilor deformaționale ale legăturii N–H. O banda de absorbție similară se poate observa între 3200cm^{-1} și 3400cm^{-1} având legătură cu vibrațiile moleculare tip stretching ale grupării N–H.

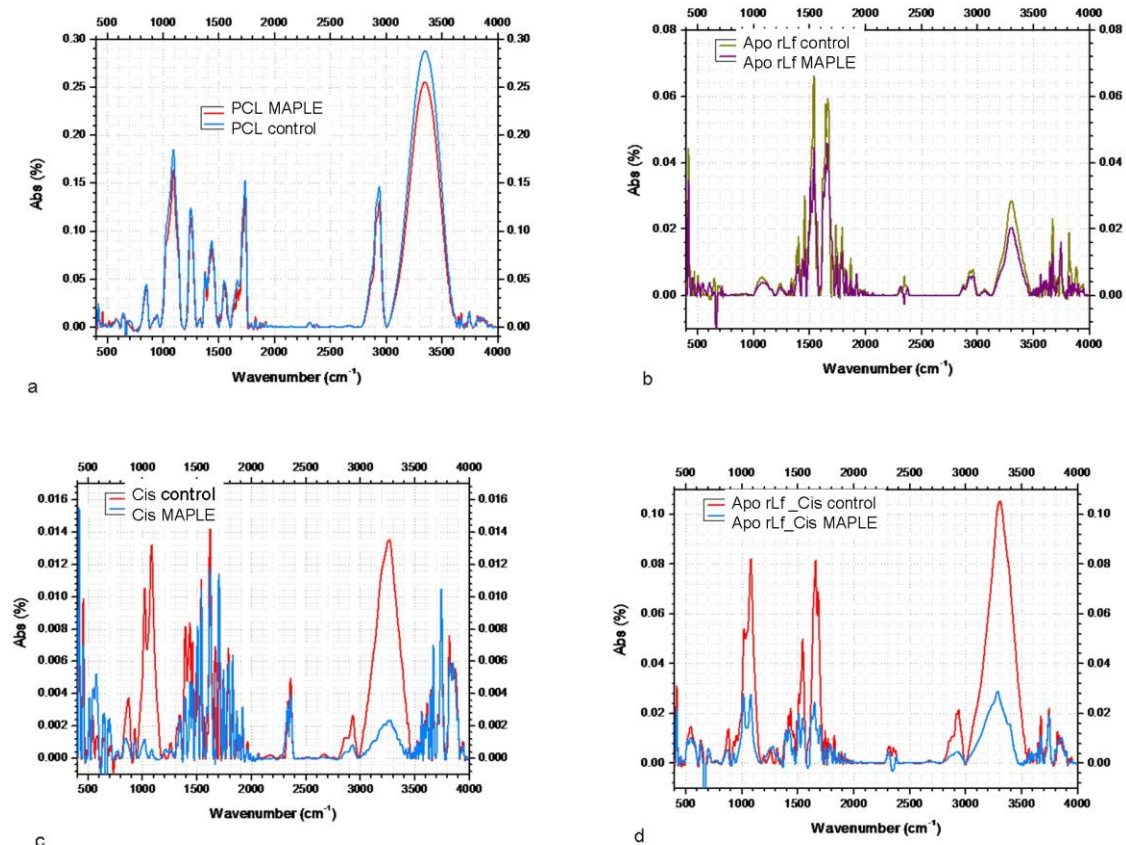


Figura III.12a Spectrele FTIR ale soluțiilor de control și a filmelor obținute prin MAPLE: PCL(a), Apo-rLf(b), Cis(c), Apo-rLf_Cis(d)

[V.Dinca, L.E.Sima, L.Rusen et al., *Biomedical Microdevices*, 16, (2014): 11-21]

Schimbările în spectru prin adăugarea de Cis și Apo-rLf în filmele subțiri de PCL duc la apariția unui vârf –O–H la 3450cm^{-1} (figura III.11 d, e și f). Acest vârf se datorează Lf, ce conține multe grupări funcționale –O–H. Vârful C–H prezente la 1750cm^{-1} și 2850cm^{-1} la PCL-ul depus prin MAPLE rămân neschimbate atât în prezența Cis cât și a Lf. Analizele FTIR au demonstrat că filmele obținute prin MAPLE la fluența de 400mJcm^{-2} prezintă structuri similare cu materialele inițiale.

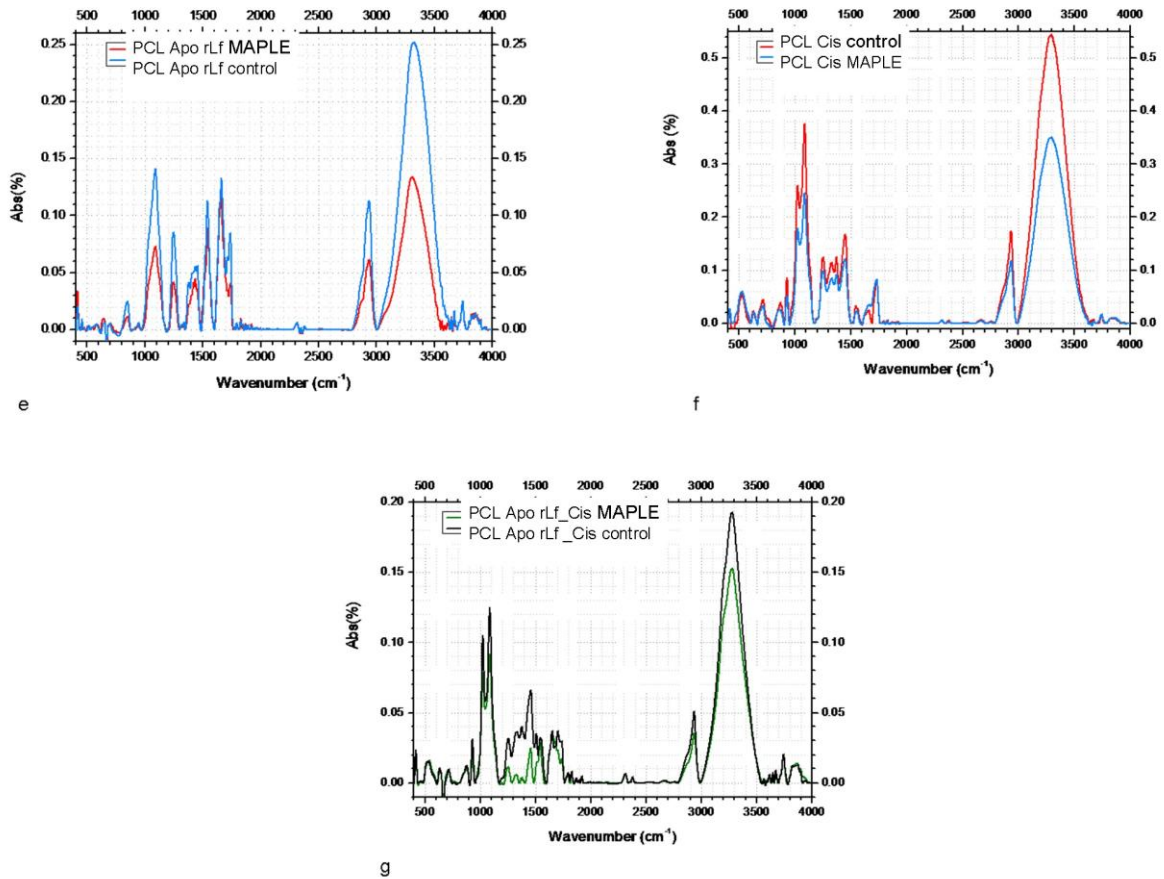


Figura III.12b Spectrele FTIR ale soluțiilor de control și a filmelor obținute prin MAPLE: PCL_Apo-rLf(e), PCL_Cis(f), PCL_Apo-rLf_Cis(g).
[V.Dinca, L.E.Sima, L.Rusen et al., Biomedical Microdevices, 16, (2014): 11-21]

Totodată spectrele FTIR pun în evidență faptul că structura filmelor de Apo-rLf cât și a filmelor Cis nu a fost influențată de prezența solventului PCL în filmele obținute prin MAPLE. Modificări ale benzilor de absorbție reprezentative pentru fiecare material se întâlnesc cazul încorporării directe a proteinelor în PCL. În plus, în cazul de față, încorporarea Cis Apo-rLf în filmele subțiri de PCL într-o manieră uniformă nu ar fi posibilă, datorită faptului că solvenții nu sunt miscibili. [A3]

III.3.1 Caracterizări morfologice și de suprafață ale filmelor obținute

Scanările AFM ce au fost efectuate pe diferite zone ale filmelor depuse prin MAPLE arată o acoperire uniformă. Totuși, se poate observa ca morfologia suprafețelor depuse diferă funcție de compoziția lor.

În figura III.13 sunt prezentate imaginile AFM ale structurilor obținute, unde (a) Cis; (b) Cis încorporat în PCL; (c) Apo-rLf; (d) Apo-rLf încorporat în PCL, (d) Cis-Apo-rLf și (e)

Cis-Apo-rLf încorporate în PCL. Suprafața scanată a fost de $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ (a-d și f); $45\mu\text{m} \times 45\mu\text{m}$ (e);

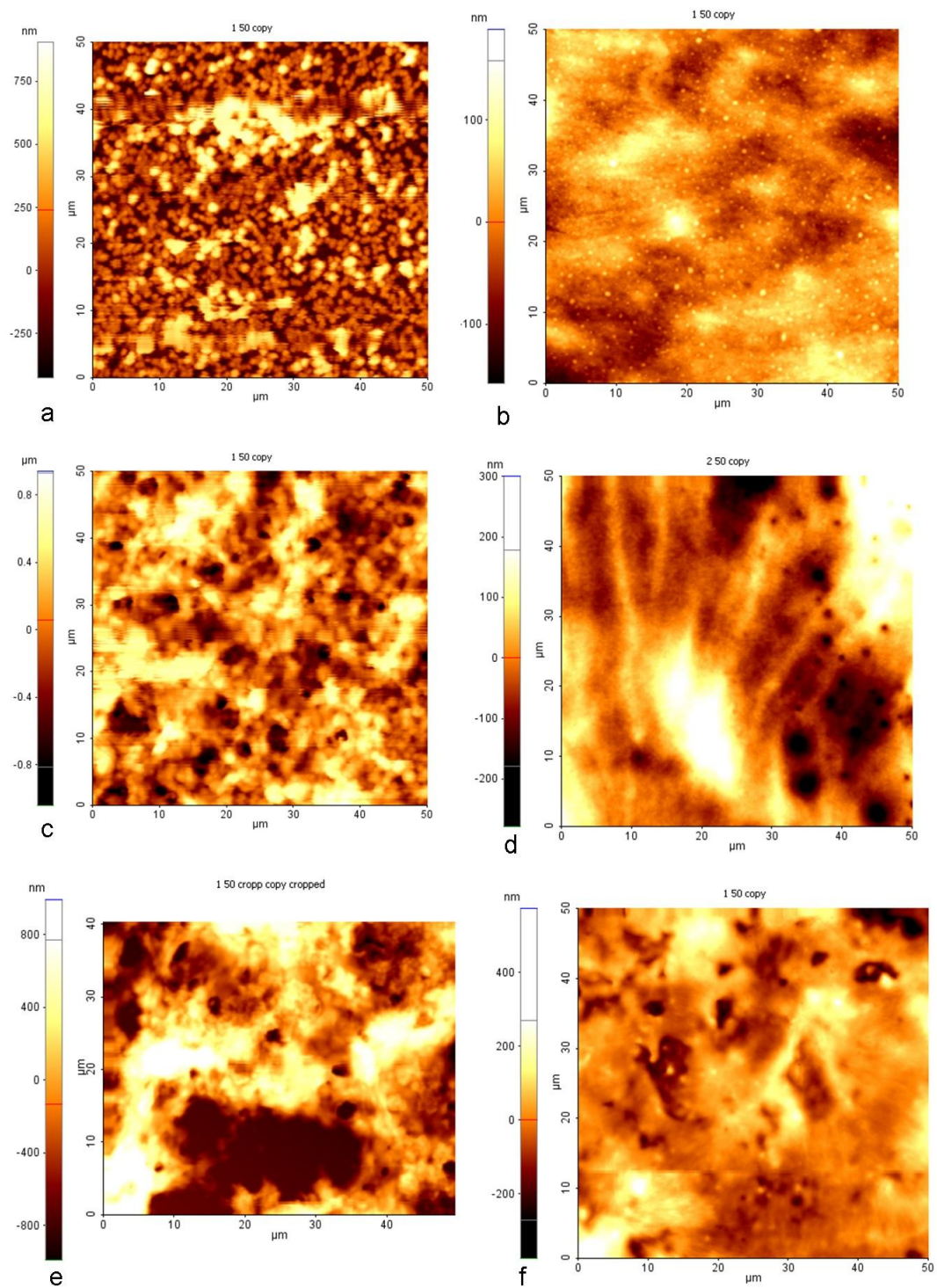


Figura III.13 Imagini AFM ale Apo-rLF, Cis și PCL
[V.Dinca, L.E.Sima, L.Rusen et al., Biomedical Microdevices, 16, (2014): 11-21]

III.3.2 Efectul anti-melanom al structurilor PCL

Viabilitatea celulelor de melanom în prezența filmelor subțiri de PCL ce conțin Cis și Apo-rLf a fost evaluată folosindu-se un test de proliferare celulară ne-radioactiv MTS CellTiter 96® Aqueous. Testul de proliferare a arătat o viabilitate scăzută în cazul culturilor de celule crescute pe filme PCL_Apo-rLf sau PCL_Cis pentru 24-48 ore. Combinația Cis cu Apo-rLf a îmbunătățit acest efect, inhibarea proliferării celulelor fiind de mai mult de 50% după cum se poate observa în figura III.17. Descreșterea viabilității a fost mai mică în cazul substraturilor hibride, indicând faptul că factorii activi au fost supuși celulelor. Se observă un efect îmbunătățit al inhibării celulare pentru depunerile hibride conținând atât Cis și Apo-rLf în matricea de PCL dacă ne comparăm cu depunerile hibrid conținând doar Apo-rLf sau doar Cis.

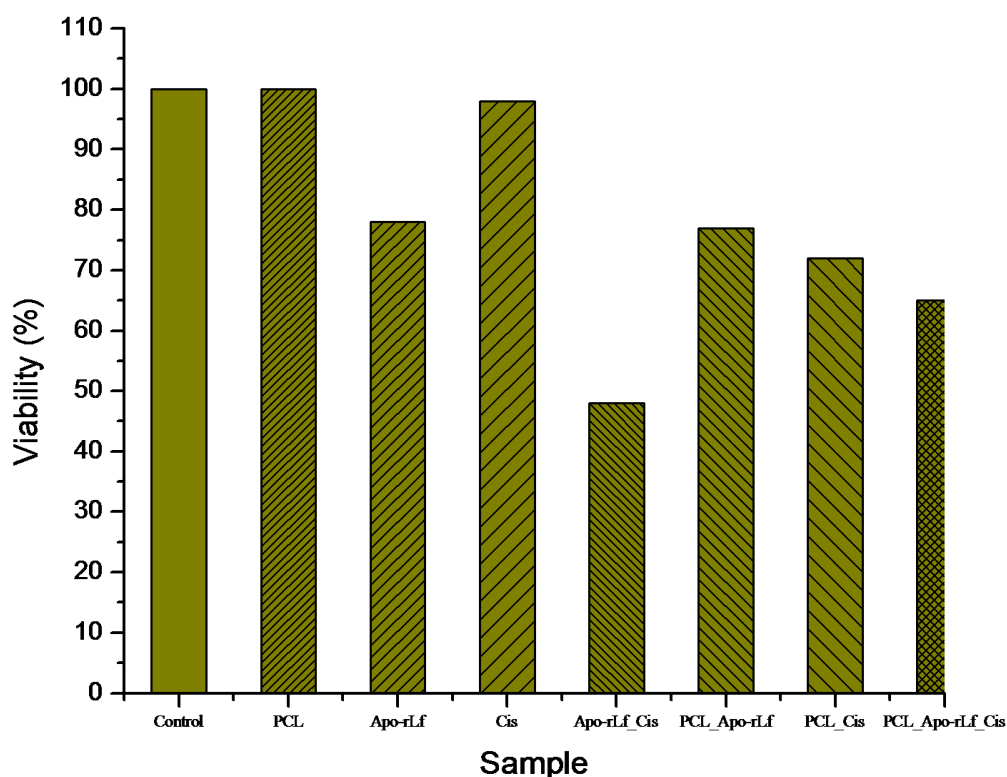


Figura III.14 Viabilitatea celulară a celulelor de melanom B16-F10 determinată în urma efectuării testului MTS

[V.Dinca, L.E.Sima, **L.Rusen** et al., *Biomedical Microdevices*, 16, (2014): 11-21]

Folosind Ki67, un marker de proteine pentru proliferarea celulară, am investigat proliferarea și adeziunea celulară. Morfologia și proliferarea celulelor of B16-F10 crescute în 24 ore pe filmele subțiri de PCL au pus în evidență apariția unui model specific de filamente actinice lungi și paralele ce indica faptul că celulele aderă ferm pe substrat.

O reducere a citoplasmei și detectarea unei condensări nucleice sugerează un proces de apoptoza în Cis-ul depus pe probele de PCL. Amestecul PCL-Apo-rLf induce de asemenea modificări morfologice după un interval de 24 ore, cum ar fi modificarea formei axiale și aderente a celulelor la o formă rotundă. [A3]

De asemenea asocierea de Apo-rLf are un efect dramatic asupra proliferării și adeziunii celulare. Analiza la microscop a evidențiat celule plutind în mediu și de asemenea apariția unor clusteri a fost detectată, lucru ce sugerează că combinarea de Apo- rLf cu Cis pe filmele subțiri de PCL a fost cea mai eficientă (daca ne comparăm cu fiecare element in parte) în a inhiba adeziunea celulelor testate.

III.3.3 Stabilitatea filmelor subțiri

Una din problemele principale este stabilitatea filmului subțire pentru studiile de scurtă sau lungă durată.

În figura III.15 sunt prezentate imaginile AFM ale filmelor obținute prin MAPLE după imersia în soluție salină pentru 24 ore, unde (a) film Cis; (b) film Cis încorporat în PCL; (c) film Apo-rLf; (d) film Apo-rLf încorporat în PCL, (e) film Cis_Apo-rLf și (f) film Cis_Apo-rLf încorporat în PCL.

În figura III.16 sunt prezentate imaginile AFM ale filmelor obținute prin MAPLE după imersia în soluție salină pentru 48 ore, unde (a) film Cis; (b) film Cis încorporat în PCL; (c) film Apo-rLf; (d) film Apo-rLf încorporat în PCL, (e) film Cis_Apo-rLf și (f) film Cis_Apo-rLf încorporat în PCL.

Comparând cu morfologiile suprafețelor după depunere, acoperirile hibride imersate în soluție salină prezintă numeroase modificări.

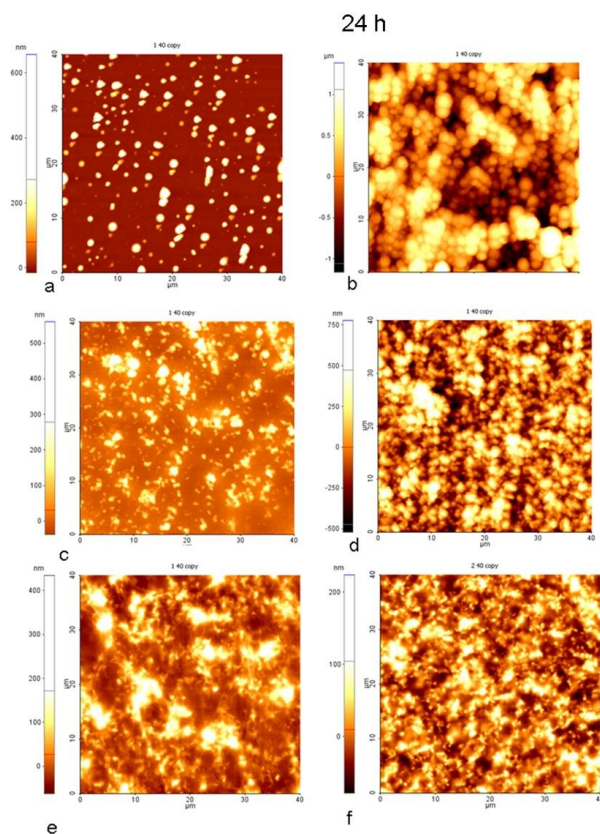


Figura III.15 Imagini AFM ale filmelor după imersia în soluție salină 24 ore
 [V.Dinca, L.E.Sima, L.Rusen et al., *Biomedical Microdevices*, 16, (2014): 11-21]

Acoperirile cu Cis suferă o schimbare dramatică, după doar 24 ore în imersie doar câteva particule mai rămân la suprafața, numărul și dimensiunile lor scăzând și mai mult după 48 ore. Măsurătorile FTIR confirmă aceste rezultate. Benzile tipice în IR pentru Apo-rLf și Cis cât și modurile stretching ale PCL-ului sunt observate pentru toate probele hibride. Probele obținute prin depunerea a unuia sau două componente active, după imersie, prezintă modificări ale spectrelor în special în cazul Cis-ului.

Filmele subțiri ce conțin Apo-rLf sunt mult mai stabile și încorporând proteina în PCL duce la livrarea ei treptată în mediul de cultură

48 h

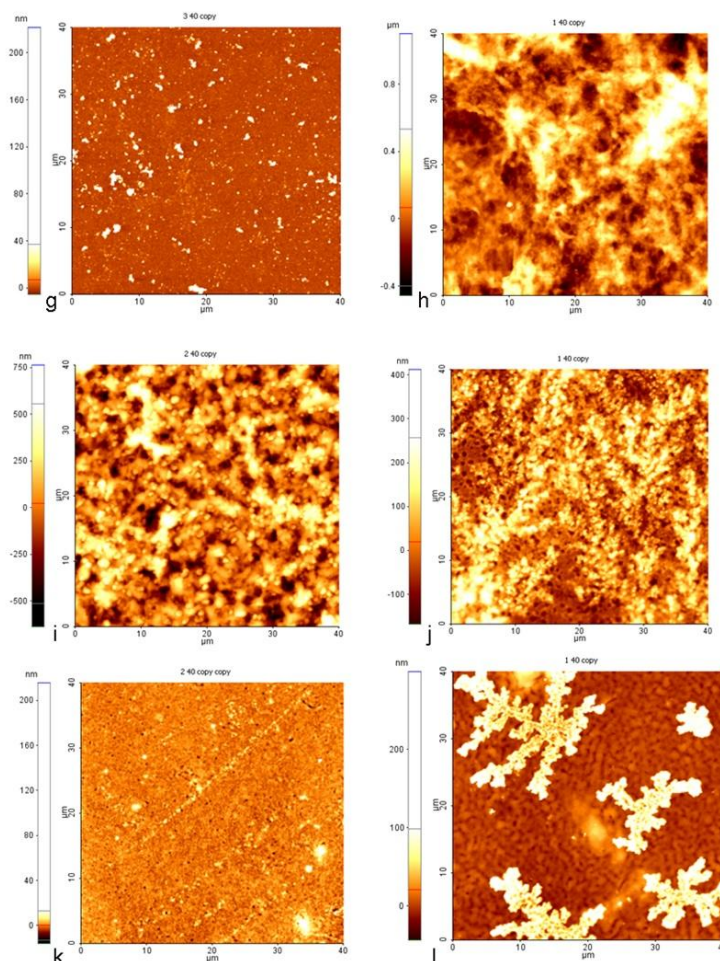


Figura III.16 Imagini AFM ale filmelor după imersia în soluție salină 48 ore
[V.Dinca, L.E.Sima, L.Rusen et al., *Biomedical Microdevices*, 16, (2014): 11-21]

III.3.4 CONCLUZII

În cadrul acestui capitol am prezentat și demonstrat o nouă abordare bazată pe tehnica MAPLE ce constă în folosirea unei matrici biodegradabile în care am inclus agenți biologici activi pentru obținerea de platforme biologice noi cu o eficiență antitumorală crescută.

Folosind această metodă, rezultatele obținute au arătat că compușii anti-tumorali au fost încorporați în filmul de PCL fără nici o modificare chimică semnificativă. S-a observat o viabilitate și proliferare scăzută, aderența mai mică, cât și modificări morfologice în cazul celulelor de melanom cultivate pe ambele straturi subțiri ce conțin Apo-RLF și Cis.

Efectul a fost îmbunătățit prin depunerea de Apo-RLF și Cis pe același film, indicând astfel posibilitatea de a utiliza o un film subțire care conține ambii compuși pentru o terapie antitumorală combinatorie.

Această abordare are un potențial de obținere a diferite acoperiri multi-component active, biodegradabile, în special în acele cazuri când agenții bioactivi încorporați nu sunt miscibili sau ar putea fi afectați de solventul matricii polimerice. [A3]

III.4 Obținerea de filme subțiri biodegradabile polimerice folosite ca interfețe pentru aderența și proliferarea celulară

Îmbunătățirea interacțiunilor celulare cu bio-materialele folosite în ingineria țesuturilor este crucială pentru aplicarea cu succes a construcțiilor celulare pentru repararea și regenerarea țesuturilor deteriorate.

În sub-capitolul următor este prezentată obținerea de acoperiri biofuncționale adezive, stabile, cu o topografie controlată, acoperiri ce încorporează factori activi pentru un răspuns celular optimizat.

III.4.1 Caracterizări morfologice și structurale ale filmelor obținute

În figura III.17 sunt prezentate imaginile 3D AFM ale probelor de collagen depuse prin MAPLE. Din vizualizarea acestor imagini, se poate observa că suprafața probelor nu prezintă nici o caracteristică topografică specială pentru fluențe joase, cu excepția unor structuri gen granule (*grain-like structures*).

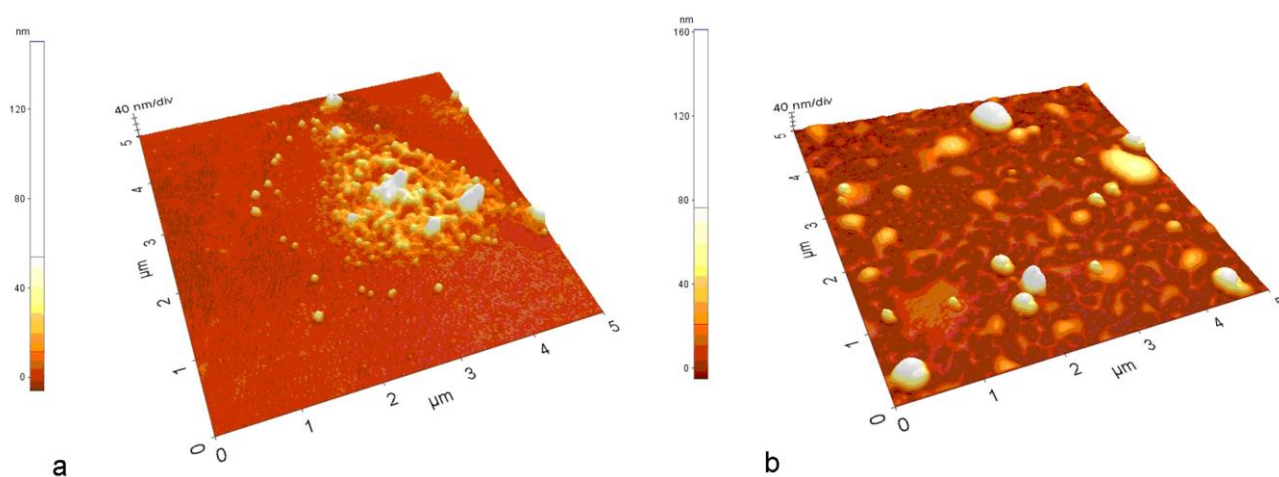


Figura III.17 Imagini 3D AFM ale probelor de collagen

Aceleași tendințe sunt observate și în cazul lamininei (Figura III.18 a-c) unde la fluență joasă se poate observa că suprafața probelor nu prezintă nici o caracteristică

topografică speciala, cu excepția unor structuri gen granule aliniate sub formă de microfibre (figura III.18 a,b,c).

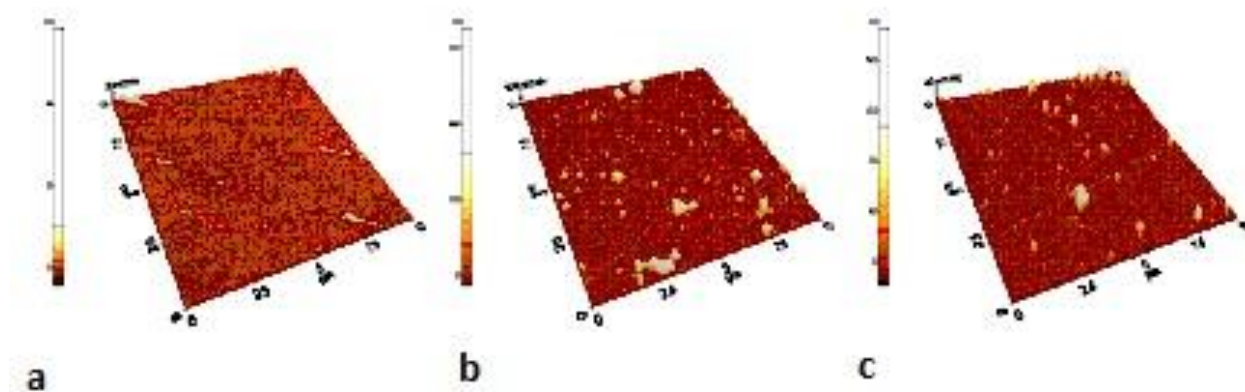
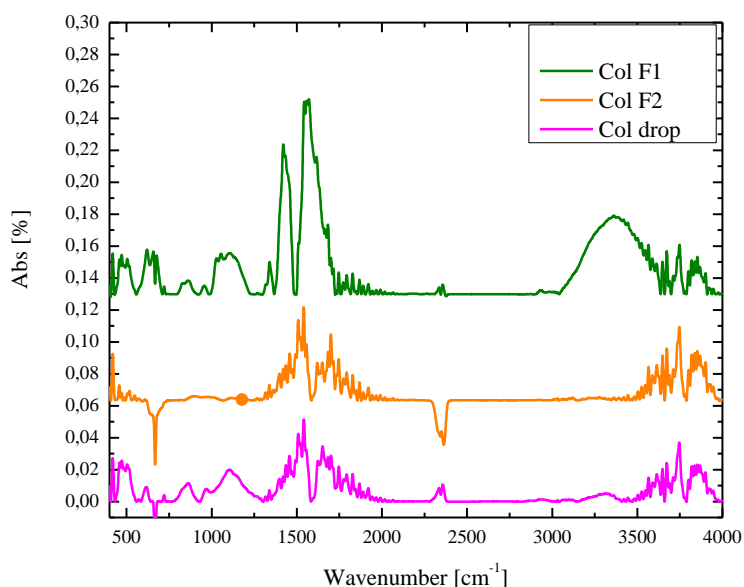


Figura III.18 Imagini 3D AFM ale probelor de laminină

Mărind fluența se poate observa că numărul structurilor gen granule începe să crească, aceste formațiuni fiind împrăștiate pe toată suprafața măsurată.

În figura III.19 sunt prezentate spectrele de absorbție ale lamininei depuse prin metoda MAPLE. Grupările amide, caracteristice pentru proteine, ce se caracterizează printr-o sensibilitate la modurile vibraționale ale proteinelor, au fost evidențiate în cadrul măsurătorilor. Regiunea amida 1 observată la 1654 cm^{-1} rezultă din vibrațiile stretching ale grupării $\nu(\text{C}=\text{O})$, cu o contribuție minoră din partea deformărilor C-C-N și N-H.



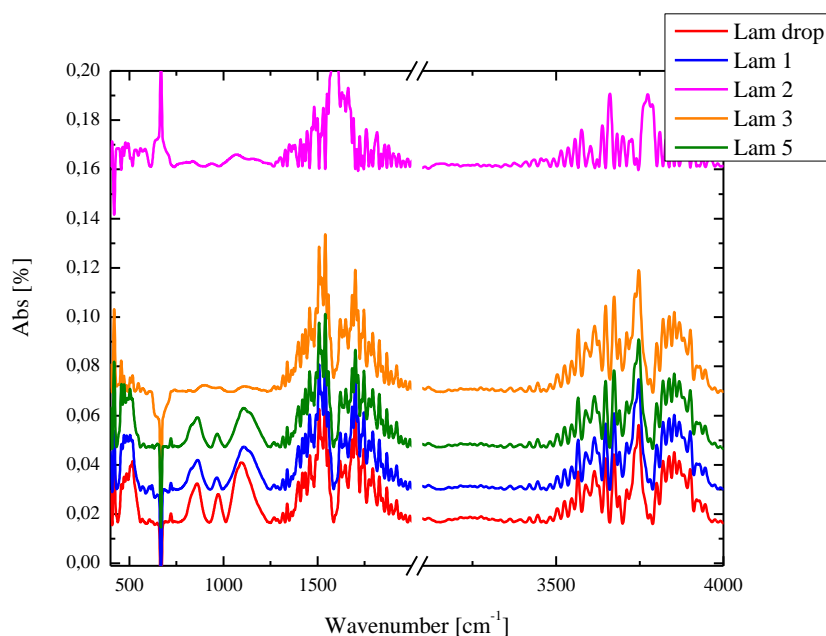


Figura III.19 Spectrele de absorbție FTIR ale lamininei (stanga) și collagenului(dreapta) obținute prin MAPLE și drop-cast (referința)

Regiunea amida II observată la 1540 cm^{-1} rezultă în urma combinațiilor N-H și a vibrațiilor stretching $\nu(\text{C-N})$. Benzilor vibraționale stretching simetrice ale $\nu(\text{C-H})$ de la 2854 cm^{-1} și cele asimetrice de la 2923 cm^{-1} ne indică faptul că gruparea CH_2 își păstrează funcționalitatea în lanțul proteinei. Vârful centrat în jurul valorii 3283 cm^{-1} , ce corespunde benzilor vibraționale stretching ale grupării $\nu(\text{C-H})$ din compoziția proteinei, a fost observat într-o bandă largă ce se întinde de la 3200 cm^{-1} la 3500 cm^{-1} .

III.4.2 Studiile in vitro al acoperirilor cu collagen și laminină

Pentru a monitoriza atașamentul celulelor L929, comportamentul celulelor pe substraturile depuse prin metoda MAPLE (fluente de la 400 mJcm^{-2} la 800 mJcm^{-2}) sunt comparate cele de pe suprafața de control (sticlă) și cele de pe suprafețele depuse prin drop-cast. Ratele de proliferare observate prin testul MTS pentru celulele crescute pe collagen sunt mai mari decât în cazul culturilor pe materiale standard. Același lucru s-a observat și în cazul lamininei, cu singura diferență că straturile de laminină au dus la o creștere a ratei de proliferare de până la 130%.

Anterior a fost prezentată și demonstrată o nouă abordare bazată pe tehnica MAPLE ce constă în folosirea unei matrici biodegradabile în care am inclus agenți biologici activi pentru obținerea de platforme biologice noi cu o eficiență antitumorală crescută. Folosind

aceeași abordare, am încorporat polimerii de collagen și laminină în filmul de PEG-PCL fără nici o modificare chimică semnificativă. S-a observat o aderență îmbunătățită, cât și modificări morfologice în cazul celulelor cultivate pe ambele straturi subțiri ce conțin collagen și laminină (figura III. 20).

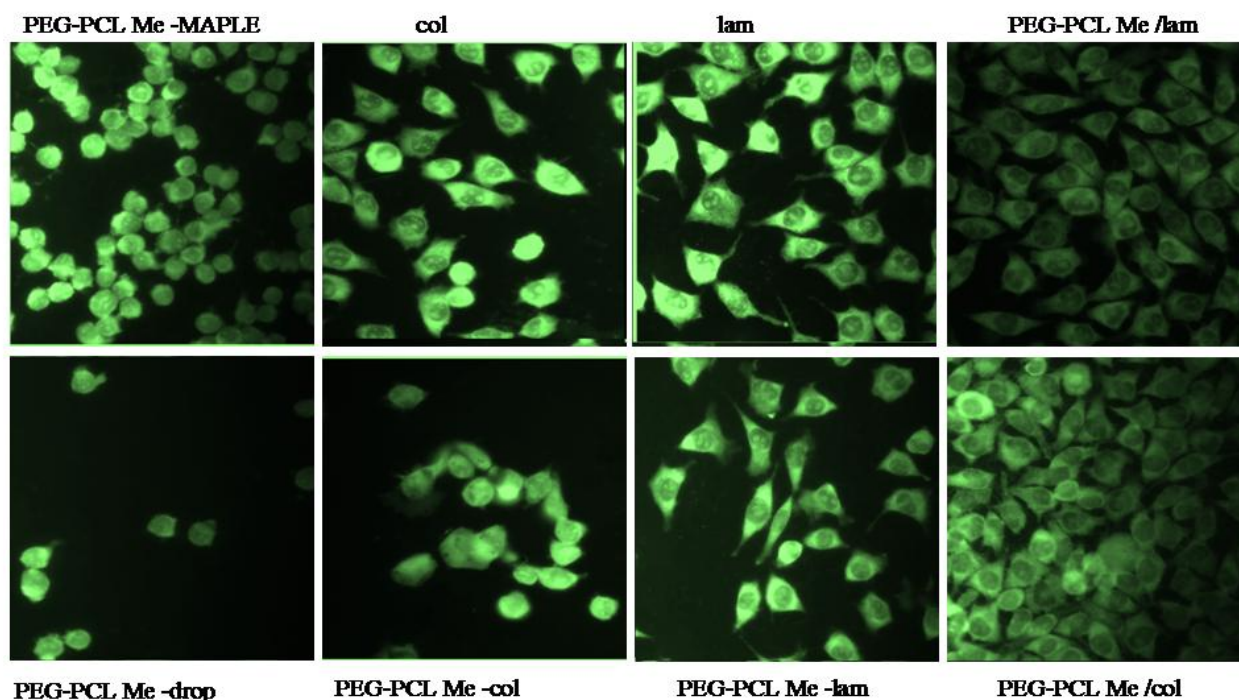


Figura III.20 Imagini de microscopie de fluorescență a celulelor L929 marcate cu acridină pe suprafețe copolimerice cu sau fără factori bioactivi (laminină și collagen)
[V. Dinca, L. Rusen et al., poster, EMRS2012, Strasbourg 2012]

Testele de viabilitate celulară și studiile de microscopie de fluorescență au confirmat faptul că suprafețele funcționalizate au fost capabile să sporească răspunsul celular.

III.4.3 Concluzii

Această abordare are un potențial de obținere a diferite acoperiri active, biodegradabile, (atât mono cât și multi-componente) în special când este necesară crearea unei interfețe îmbunătățite pentru un răspuns celular, implicând includerea de agenți bioactivi încorporați într-o matrice polimerică sintetică biodegradabilă.

În mod semnificativ, în comparație cu cele obținute prin simplă absorbție fizică, acoperirile obținute prin MAPLE prezintă caracteristici superioare, cu un maximum de viabilitate de 130% pentru laminină și 117 % pentru collagen pentru filme pe care le-am

obținut la o fluență de 500 mJ/cm^2 , fapt care dă indicații că MAPLE este o metodă facilă și eficientă pentru a modifica materiale inerte din punct de vedere biologic pentru fabricarea de structuri biomimetice.

Capitolul IV. Rezultate privind procesarea filmelor de polimer folosind sistem laser în femtosecunde

Un design controlat al arhitecturii suprafeței ce implică caracteristicile topografice ale suprafeței cum ar fi textura, geometria, forma, porozitatea și rugozitatea se poate obține folosindu-se **iradierea directă a materialului (ablația laser)**.

Principalii parametri studiați care au avut ca rezultat modificarea morfologiei suprafețelor iradiate au fost fluența laser, numărul de pulsuri și condițiile de focalizare ale fasciculului pe suprafața filmelor de chitosan. Ca o observație generală, iradierea cu laser a filmelor polimeri a cauzat diferite modificări ale caracteristicilor lor morfologice, putându-se observa o expansiune a materialului supus acțiunii fasciculului laser cât și „umflături” ale CS-ului pe suprafața iradiată până la topirea acestuia. Principalii parametri care influențează morfologia zonei iradiate de polimer sunt lungimea de undă laser, fluența și numărul de pulsuri.

Așadar, folosindu-se lungimea de undă 775 nm și un singur puls laser, am obținut structuri gen „*bubbles*” pentru fluențele investigate ($500\text{-}900 \text{ mJ/cm}^2$) (figura IV.1). Fluența minimă pentru care s-a observat o modificare a suprafeței polimerului am determinat-o experimental ca fiind în jurul valorii de 350 mJ/cm^2

Datorită fluenței joase, presiunea interioară nu poate depăși rezistența materialului, și bulele apărute în material nu se sparg, ci provoacă doar o deformare, o umflare a acestuia. După cum se poate observa în cazul unei fluențe de 500 mJ/cm^2 , structuri gen „*bubbles*” sunt obținute, însă nu în mod constant. Acest lucru se observă la o fluență de 650 mJ/cm^2 și în special la fluența de 900 mJ/cm^2 , unde structurile obținute au un caracter uniform și regulat, având drept efect o posibil aplicație în obținerea de matrici polimerice miniaturizate (de tip bulă/picătură) pentru suprafețe de studiu al influenței topografiei asupra comportamentului celular (Figura IV.1). [44]

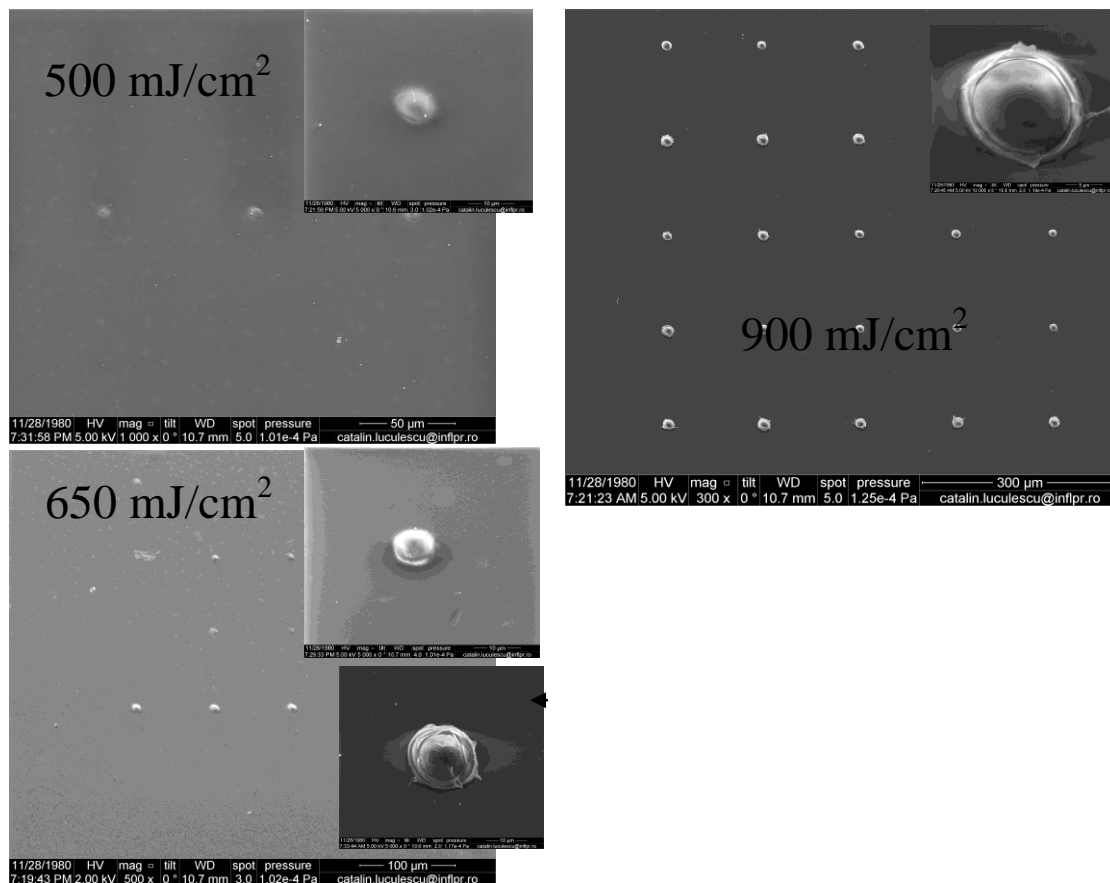


Figura IV.1 Structuri „bubbles” obținute prin iradierea cu un singur puls laser. [L. Rusen et al., *Applied Surface Science*, 302, (2014): 256-261]

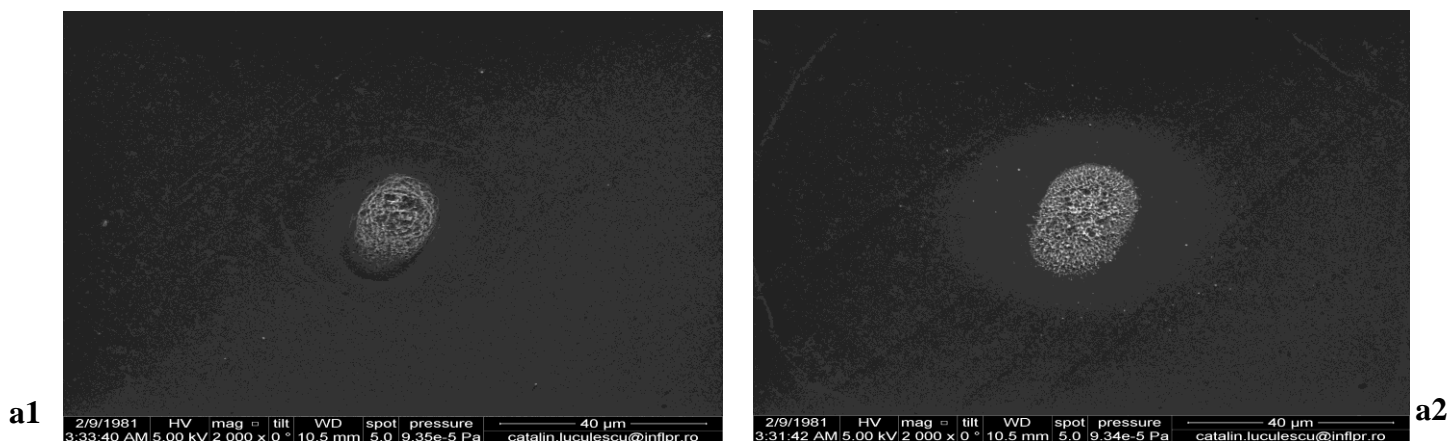


Figura IV.2 Imagini SEM ale structurilor obținute la următoarele condiții experimentale: a1) 1500 mJ/cm² 7 pulsuri, a2) 1500 mJ/cm² 10 pulsuri; [L. Rusen et al., *poster EMRS2012, Strasbourg, 2012*]

Folosindu-se armonica a II a sistemului laser in femtosecunde Clark CPA 2101, am observat aceleași tendințe (i.e. valori ale fluențelor, înălțimi ale structurilor obținute) în prelucrarea suprafețelor. Se observă însă schimbări semnificative în morfologia zonei iradiate:

pentru 1 puls laser au fost obținute structuri tip *finger tip* în timp ce pentru 4 sau mai multe pulsuri laser au fost obținute structuri tip *spongios*. Se poate observa că dimensiunile structurilor obținute sunt de ordinul zecilor de micrometri (40 μm diametru).

Pentru structurile tip *finger tip* variația fluenței duce la ușoare modificări ale suprafețelor *ripples* după cum se poate observa în figura IV.3. Dimensiunile structurilor sunt de ordinul micronilor (elipsa cu $a=8-10$ micrometri și $b=20-30$ micrometri)

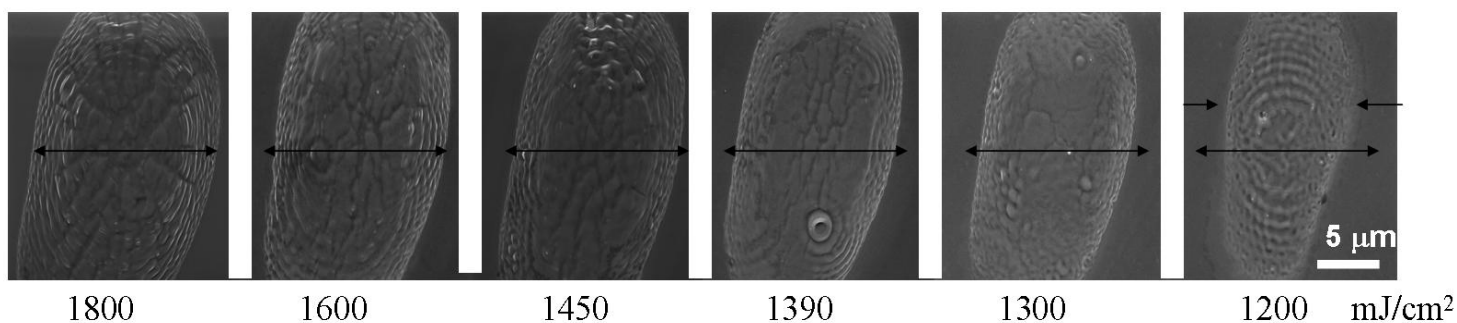


Figura IV.3 Imagini SEM ale structurilor tip *finger tip* obținute pentru diferite fluențe la lungimea de undă de 387 nm / 1 puls laser

[L. Rusen et al., *Applied Surface Science*, 302, (2014): 256-261]

IV.3 Analiza *in vitro* a structurilor obținute

În acest studiu, am urmărit influența topografiei substratului asupra modificărilor morfologice ale celulelor cât și posibilitatea modificării creșterii direcționale de celule. În figura IV.4 se pot vedea imagini obținute prin microscopia de fluorescență ale celulelor de OLN după o perioadă de cultură de 24 ore pe șanțuri structurate pe polimer CS. Se observă o adeziune preferențială de-a lungul și în interiorul canalelor (canale cu următoarele dimensiuni: adâncime 400 nm, lățime 30 μm). [A4]

A doua tendință observată în dezvoltarea celulelor este dată de topografia canalului creat în polimer. Canalele obținute cu fluențe ridicate și cu un număr de pulsuri laser mai mare (5 pulsuri laser, 1800 mJ/cm^2) prezintă o arhitectură rugoasă după cum se poate observa în figura IV.5a. În cazul acestor topografii, se poate observa că nu avem adeziune celulară în interiorul canalelor, ci doar în zona adiacentă porțiunilor iradiate cu fasciculul laser, după cum se observă în figura IV.5b. Această dezvoltare poate fi explicată prin modificarea sarcinii suprafeței [IV.14] împreună cu faptul că pereții prezintă o structură poroasă, exact genul de structură ce a fost prezentat ca inhibând dezvoltarea celulelor OLN.

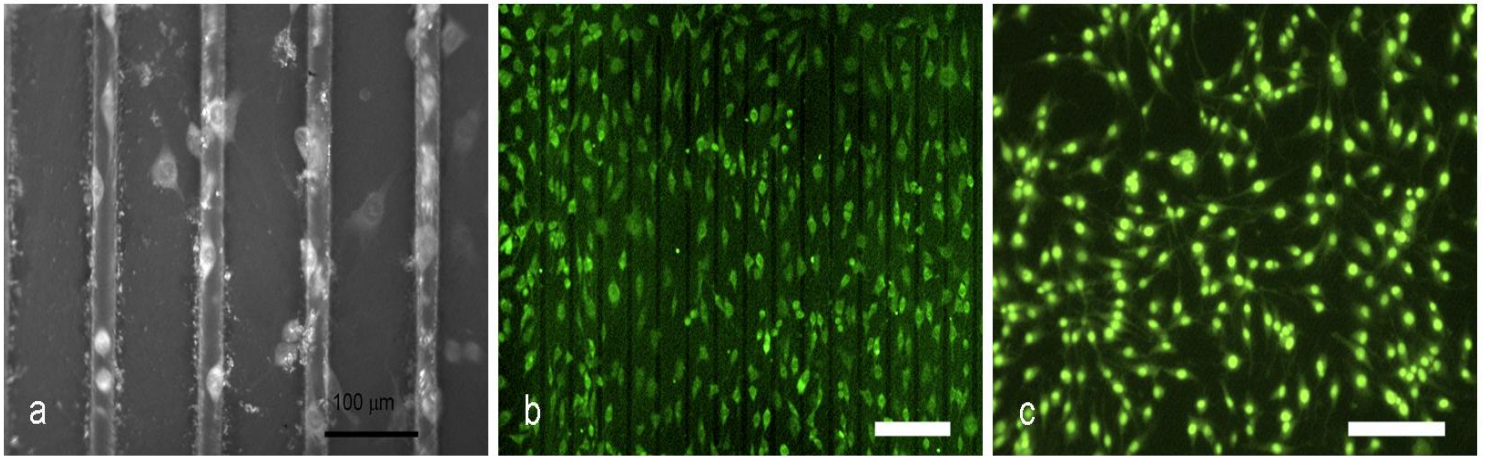


Figura IV.10 Imagini de microscopie optică ale celulelor OLN pe suprafețe structurate tip *ditches- șanțuri* a) adâncime 400 nm, lățime 30 μm; b) distanța între șanțuri 20 μm – 40 μm; c) suprafața de referință. [L. Rusen et al., *Applied Surface Science*, 302, (2014): 256-261]

În același timp, fibroblastele au fost confinate în structurile de tip groapă (figura IV.5 a) și au aderat în zonele delimitate de șanțuri, cu adeziune preferențială pe suprafața chitosanului neiradiat.

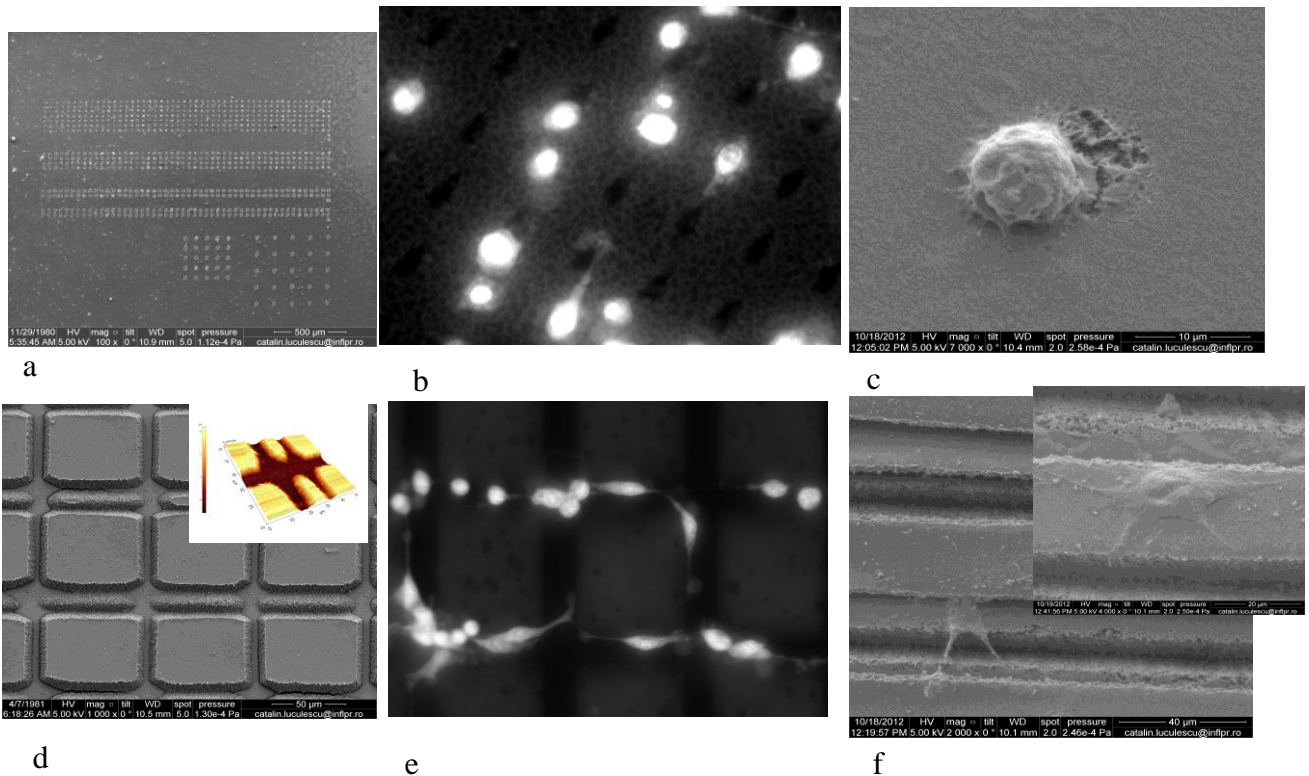


Figura IV.5. a) Imagine SEM a unei matrice de găuri, b) imagine de microscopie de fluorescență a celulelor L929 pe structuri de tip găuri, c) imagine SEM a unei celule restransă într-o zonă iradiată, d) Imagine SEM a unei matrice de linii cu insert de AFM, e) imagine de microscopie de fluorescență a celulelor L929 pe structuri de tip linii, f) imagine SEM a unei celule aderată într-o zonă iradiată.

IV.4 Concluzii

În această capitol am studiat limitele dar și versatilitatea metodei de iradiere cu fascicul laser în femtosecunde a suprafețelor de polimer CS pentru obținerea de structuri 2D și 3D de tip „bubble”, „sponge” și „ditches”.

În cazul structurilor de „bubble” și „ditches”, înălțimile structurilor din zonele iradiate sunt între câteva sute de nanometri până la câțiva micrometri și concomitent cu creșterea fluențelor laser (începând cu fluența de 1500 mJ/cm^2), au fost observate apariția unor structuri de tip „sponge”.

Celulele oligodendrocite și fibroblaste cultivate pe suprafața iradiată au arătat că creșterea timpurie a celulelor a fost condiționată de microtopografia specifică a suprafeței de CS, prezentând astfel o posibilă utilizare pentru platforme mobile de dezvoltare celulară.

Rezultatele preliminare din acest studiu referitoare la caracteristicile structurilor de CS obținute prin iradiere cu laser în femtosecunde arată că morfologia structurilor bazate pe chitosan pot fi reglate în mod corespunzător pentru diferite aplicații prin schimbarea parametrilor iradierii cu fascicul laser i.e. fluența laser și numărul de pulsuri laser.

Capitolul V. Transfer indus cu laserul (LIFT) pentru crearea de interfețe specifice pentru aplicații biologice

În acest capitol este descrisă obținerea de structuri polimerice (PEI) pe substraturi dure (sticla) și moi (Thermanox) și aplicabilitatea acestora în studiul aderenței de celule (ex: fibroblaste) pe suprafața transferată. Efectul parametrilor laser și a tipului de substrat sunt descrise în detaliu și corelate cu studiile *in vitro*.

Filmul donor multistrat constă dintr-un polimer triazenă (TP) și un strat liniar PEI au fost preparate utilizând tehnica *spin-coating* (tip SCS P6708) folosind ca substrat plăci de siliciu. Triazena a avut rol de strat de sacrificiu. **Filmele receptoare** constau din substraturi rotunde de Thermanox și lamele de sticlă, acestea având un diametru de 13 mm. S-a folosit un sistem laser de tip excimer XeCl (Compex, Lambda Physik, 308 nm, 30 ns). Filmele obținute au fost analizate folosindu-se tehnica SEM. Au fost realizate transferuri de material folosindu-se diferite fluențe laser (250, 300, 380 460, 520 și 650 mJ/cm^2).

În cazul transferului PEI pe substraturi de Thermanox, se poate observa că pentru fluențe laser ridicate, structurile (rezultate din transferul pixelilor PEI) prezintă o rugozitate pronunțată, dar și o structurare poroasă pe suprafața de pixeli.

Se obțin și micro-găuri sferice sub formă de pori distribuite aleator; structuri cu un diametru variind de la câteva sute de nm la câțiva μm în interiorul pixelilor transferați pe Thermanox pentru fluente laser mai mari de 400 mJ/cm^2 . [A5]

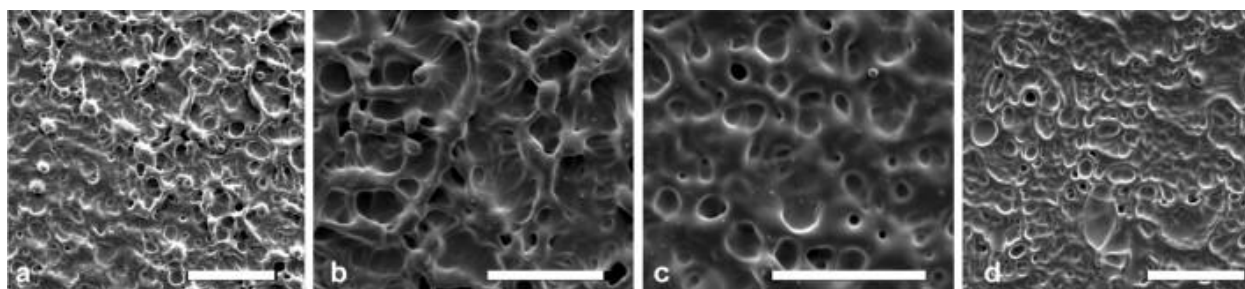


Figura V.1 Imagini SEM ale morfologiei pixelilor PEI pe Thermanox la fluența:
a) 590 mJ/cm^2 ; b) 500 mJ/cm^2 ; c) 450 mJ/cm^2 ; d) 400 mJ/cm^2
[V. Dinca, L. Rusen et al., *Applied Surface Science*, 278, (2013): 190-197]

S-au observat diferențe în aderența celulelor în funcție de tipul celulei dar și de morfologia suprafeței. De exemplu, o aderență preferențială se observă pe pixelii cu suprafețe microstructurate (fig. V.2a și c), în comparație cu suprafețe netede (fig. V.2b și d). Suprafața microstructurată a fost obținută prin transferul pixelilor PEI la o fluență de 380 mJ/cm^2 (a) iar prin transferul la o fluență de 250 mJ/cm^2 a fost obținută o suprafață netedă (b). Imaginile SEM ale pixelilor PEI transferați pe Thermanox înainte de acoperirile cu celule sunt în figura V.2c (corespunzător lui V.2a) și d (corespunzător lui V.8b). [A5]

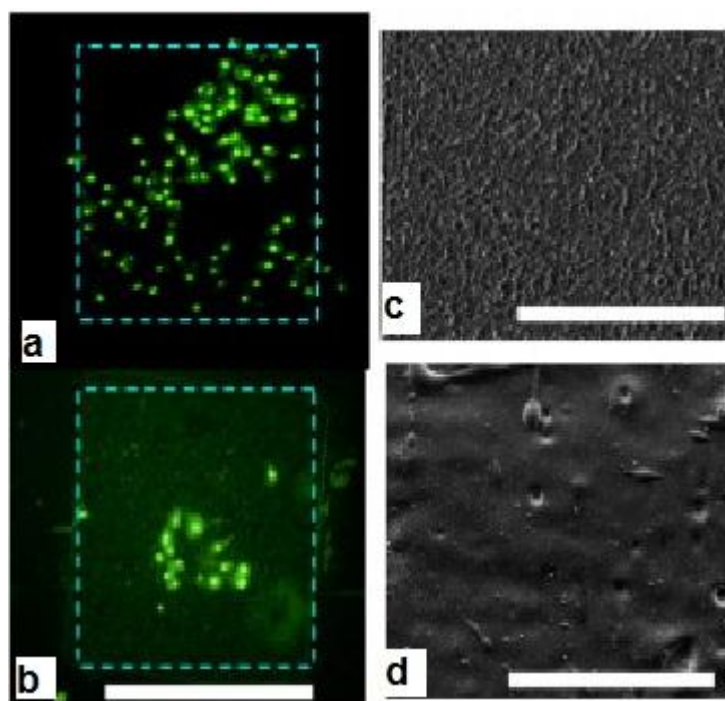


Figura V.2 Dezvoltarea celulelor OLN funcție de suprafață
[V. Dinca, L. Rusen et al., *Applied Surface Science*, 278, (2013): 190-197]

V.4 Concluzii

Am demonstrat că metoda LIFT poate fi folosită pentru a transfera pixeli polimerici PEI cu diferite morfologii pe substraturi moi flexibile pentru diferite studii de adeziune celulară. Rezultatele promițătoare pentru o fixare selectivă a celulelor sunt obținute prin utilizarea de diferite rugozități și morfologii ale pixelilor transferați prin LIFT.

Principalul parametru care trebuie să fie controlat pentru a influența adeziunea celulară este topografia suprafeței polimerului transferat. Prin varierea fluența laser s-au observat schimbări semnificative în topografia suprafeței pixelilor transferați.

În funcție de aplicația finală urmarită, tehnica LIFT poate fi combinată cu caracteristicile donorului și acceptorului pentru a obține texturarea suprafeței și funcționalizarea specifică.

Capitolul VI. CONCLUZII

În cadrul acestei lucrări am prezentat obținerea de suprafețe bi-dimensionale și tri-dimensionale bio-funcționale pentru studii *in vitro*, și *in vivo* cu ajutorul metodelor și tehnicilor având la bază fasciculul laser, acestea având avantajul flexibilității în fabricarea de caracteristici topografice definite pe o mare varietate de materiale.

În capitolul III am prezentat rezultatele având la baza tehnica de evaporare laser pulsată asistată de o matrice - MAPLE.

În cadrul subcapitolului III.1, rezultatele obținute dovedesc că copolimerul *PEG-block-PCL Me* poate fi folosit ca o acoperire rezistentă la acțiunea proteinelor. Calitatea suprafeței și densității filmelor obținute prin această metoda este modificabilă funcție de fluența fasciculului laser, numărul pulsurilor cât și compoziția țintei. Tehnica MAPLE s-a dovedit a fi potrivită pentru obținerea unor acoperiri cu caracteristici fizice și chimice adaptabile conform cerințelor noastre. Filmele de polimeri obținuți prin această metodă au prezentat o structură chimică similară cu cea a filmului de referință.

Studiile biofizice referitoare la absorbția proteinelor BSA pe suprafețe cu diferite umectabilități (wettability) au arătat că suprafețele hidrofobe au tendința de a absorbi proteinele din soluții pe când suprafețele hidrofile sunt mult mai rezistente. Rezultatele finale arată că prezența copolimerului pe post de acoperire reduce semnificativ absorbția de proteine.

În cadrul subcapitolului III.2, sunt prezentate rezultatele folosirii metodei MAPLE pentru obținerea de suprafețe cu răspuns termic pentru studii de adeziune și detașare celulară. Rezultatele obținute demonstrează că MAPLE este o metodă fezabilă pentru a obține suprafețe cu răspuns termic pentru studii de adeziune și detașare celulară.

Am obținut astfel filme subțiri cu grosimi de sute de nanometri (400-500 nm) capabile pentru găzduirea celulelor. Caracteristicile acoperirilor obținute au fost corelate cu creșterea celulelor fibroblaste de tip L929.

Rezultatele și studiile efectuate ne arată că celulele fibroblaste L939 aderă și se înmulțesc pe filmele subțiri obținute la fluențe laser între 200-600 mJcm⁻², comparativ cu cele obținute la 800 mJcm⁻² unde atașamentul celular este scăzut. Totodată am arătat că rugozitatea filmelor subțiri joacă un rol important în culegerea celulelor prin influența asupra duratei de detașare a celulelor, astfel filmele cu o suprafața fină grăbesc acest interval de timp cu 25%. În toate cazurile în schimb s-a observat că celulele colectate nu erau modificate din punct de vedere al viabilității sau formei lor, ceea ce ne arată că controlul atașamentului și desprinderii de celule prin schimbarea temperaturii este reversibil și reproductibil.

În cadrul subcapitolului III.3, am obținut diferite bio-platforme folosind tehnica MAPLE pentru studiile pe termen lung sau scurt al comportamentului celulelor canceroase expuse diferiților factori terapeutici /factori activi.

Astfel, folosind tehnica MAPLE (folosirea unei matrici biodegradabile în care am inclus agenți biologici activi, în acest caz Cisplatina și Lacoferina), am obținut platforme biologice noi cu o eficiență antitumorală crescută. Rezultatele obținute arată că compușii anti-tumoralii încorporați în filmul de *PolyCaproLactona* PCL obținuți prin MAPLE nu suferă nici o modificare chimică semnificativă. Se observă de asemenea o viabilitate și proliferare scăzută, aderență mai mică, cât și modificări morfologice în cazul celulelor de melanom cultivate pe ambele straturi subțiri obținute de asemenea prin MAPLE ce conțin Apo-RLf și Cis.

Acest efect a fost îmbunătățit prin depunerea de Apo-RLf și Cis pe același film, indicând astfel posibilitatea de a utiliza un film subțire care conține ambii compuși pentru o terapie antitumorală combinatorie.

Această abordare are un potențial de obținere a diferite acoperiri multi-component active, biodegradabile, în special în acele cazuri când agenții bioactivi încorporați nu sunt miscibili sau ar putea fi afectați de solventul matricii polimerice.

În cadrul subcapitolului III.4, am obținut filme subțiri biodegradabile polimerice folosite ca acoperiri biofuncționale adezive, stabile, cu o topografie controlată, acoperiri ce încorporează factori activi pentru un răspuns celular optimizat. Folosind tehnica MAPLE am realizat construcții (*scaffolds*) ce pot să imite structuri biologice complexe sau să ofere suport mecanic pentru a permite celulelor din țesuturile deteriorate să se remodeleze și să se repare prin formarea de structuri de țesut 3D ce seamănă cu cel original.

Aceste filme subțiri de collagen și laminina, au fost folosite pe post substrate îmbunătățite pe care celulele fibroblaste L929 să se poată atașa și prolifera, funcție de caracteristicile topografice ale chimice ale suprafețelor. Acoperirile obținute prin MAPLE au arătat caracteristici superioare, cu un maximum de viabilitate de 130% pentru laminină și 117 % pentru collagen pentru filme obținute la o fluență de 500 mJ/cm², fapt care dă indicații că MAPLE este o metodă facilă și eficientă pentru a modifica materiale inerte din punct de vedere biologic pentru fabricarea de structuri biomimetice.

În capitolul IV sunt prezentate rezultatele procesării/ texturării filmelor de biopolimer folosind sistem laser în femtosecunde.

În cazul acestui studiu, am combinat avantajele oferite de structurarea de material polimeric prin iradierea cu laser cu pulsuri de ordinul femtosecundelor (Clark CPA 2101), cu avantajele unui polimer natural, biodegradabil, și anume *chitosanul*-CS. Scopul l-a reprezentat obținerea de diferite suporturi celulare pentru studii de creștere, degradabilitate, porozitate, activarea interacțiunilor specifice celula-materiale cât și obținerea de structuri tridimensionale ce imită o matrice extracelulară.

În acest scop, am iradiat cu fascicul laser în femtosecunde suprafețe de polimer CS obținute prin metoda *drop-cast* pentru obținerea de structuri 2D și 3D de tip „*bubble*”, „*sponge*” și „*ditches*”.

În cazul structurilor de „*bubble*” și „*ditches*”, înălțimile structurilor din zonele iradiate sunt între câteva sute de nanometri până la câțiva micrometri și concomitent cu creșterea fluențelor laser (începând cu fluența de 1500 mJ/cm²), au fost observate apariția unor structuri de tip „*sponge*”.

Celulele oligodendrocite și fibroblaste cultivate pe suprafața iradiată au arătat că creșterea timpurie a celulelor a fost condiționată de microtopografia specifică a suprafeței de CS prelucrată, prezentând astfel o posibilă utilizare pentru platforme mobile de dezvoltare celulară. Morfologia structurilor bazate pe chitosan pot fi reglate în mod corespunzător pentru diferite aplicații prin schimbarea parametrilor iradierii cu fascicul laser i.e. fluența laser și numărul de pulsuri laser.

În capitolul V sunt prezentate rezultatele texturării filmelor de biopolimer folosind tehnica LIFT.

În cazul acestui studiu am transferat pixeli polimerici PEI cu diferite morfologii pe substraturi moi flexibile pentru diferite studii de adeziune celulară. Rezultatele promițătoare pentru o fixare selectivă a celulelor sunt obținute prin utilizarea de diferite rugozități și morfologii ale pixelilor transferați prin LIFT.

Am observat ca principalul parametru care trebuie să fie controlat pentru a influența adeziunea celulară este topografia suprafeței polimerului transferat. Prin varierea fluența laser s-au observat schimbări semnificative în topografia suprafeței pixelilor transferați

Bibliografie selectivă:

- Pradip Kumar Dutta, Joydeep Dutta and V.S. Tripathi, „Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications”, *Journal of Scientific & Industrial Research*, vol. 63, January 2004, pages 20-31.
- D. B. Chrisey, A. Piqué, R. A. McGill et al., “Laser deposition of polymer and biomaterial films,” *Chemical Reviews*, vol. 103, no. 2, pp. 553–576, 2003.
- J. Schou, “Fundamentals of Laser-Assisted Fabrication of Inorganic and Organic Films”, A. Vaseashta and I.N. Mihailescu (eds.), *Functionalized Nanoscale Materials, Devices and Systems*© Springer Science + Business Media B.V. 2008.
- V. Dinca et al., „Polyethyleneimine patterns obtained by laser-transfer assisted by a Dynamic Release Layer onto Thermanox soft substrates for cell adhesion study”, *Applied Surface Science*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsusc.2013.02.052>, 2013.
- N.V Ravi, „A review of chitin and chitosan applications”, *Reactive & Functional Polymers* 46, 1–27, 2000.
- M. Castillejo, E. Rebollar, M. Oujja, M. Sanz, A. Selimis, M. Sigletou, C. Fotakis, „Fabrication of porous biopolymer substrates for cell growth by UV laser: The role of pulse duration”, *Applied Surface Science* 258, 8919-8927, 2012.
- V. Dinca, A. Ranella, M. Farsari, D. Kafetzopoulos, M. Dinescu, A. Popescu, C. Fotakis, „Quantification of the activity of biomolecules in microarrays obtained by direct laser transfer”, *Biomedical Microdevices*, 10 (2008), pp. 719–725
- V. Dinca, A. Palla-Papavlu, M. Dinescu, J. Shaw Stewart, T.K. Lippert, F. Di Pietrantonio, D. Cannata, M. Benetti, E. Verona, “Polymer pixel enhancement by laser-induced forward transfer for sensor applications”, *Applied Physics A*, 101 (2010), pp. 559–56

Lista lucrări și prezentări:

1. Lucrări publicate în reviste ISI internaționale

- **L.Rusen**, C.Mustaciosu, B.Mitu, M.Filipescu, M.Dinescu, V.Dinca, „Protein-Resistant Polymer Coatings obtained by Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation”, *Applied Surface Science*, 278, Pages 198-202, 2013.
- **L.Rusen**, V.Dinca, B.Mitu, C.Mustaciosu, M.Dinescu, „Temperature responsive functional polymeric thin films obtained by matrix assisted pulsed laser evaporation for cells attachment–detachment study”, *Applied Surface Science*, 302, Pages 134-140, 2014.
- V.Dinca, P.E.Florian, L.E.Sima, **L.Rusen**, C.Constantinescu, R.W.Evans, M.Dinescu, A.Roseanu, „MAPLE-based method to obtain biodegradable hybrid polymeric thin films with embedded antitumoral agents”, *Biomedical Microdevices*, 16, Pages 11-21, 2014.
- L. Rusen, M. Cazan, C. Mustaciosu, M. Filipescu, S. Sandel, M. Zamfirescu, V. Dinca, M. Dinescu, „Tailored topography control of biopolymer surfaces by ultrafast lasers for cell - substrate studies”, *Applied Surface Science*, 302, Pages 256-261, 2014
- V.Dinca, T.Mattle, A.Palla-Papavlu, **L.Rusen**, C.Luculescu, T.Lippert, M.Dinescu, „Polyethyleneimine patterns obtained by laser-transfer assisted by a Dynamic Release Layer onto Thermanox soft substrates for cell adhesion study ”, *Applied Surface Science*, Volume 278, 1 August 2013, Pages 190-197.

2. Prezentări și postere

- V. Dinca, A.Palla-Papavlu, M. Filipescu, **L. Rusen**, T.Lippert, M. Dinescu, „*LIFT and MAPLE Methods for Obtaining Multicomponent Protein-Polymer Patterns with Controlled Cell Binding Properties*””, 12th International Conference on Laser Ablation, Octombrie, 6th-11th, 2013, Ischia, poster P3-61
- A. Palla Papavlu, V. Dinca, M. Filipescu, C. Luculescu, **L. Rusen**, P. Rotaru, M. Dinescu, „*Application of matrix-assisted pulsed laser evaporation for the fabrication of polymeric transdermal drug-delivery system incorporating captopril*”, European Materials Research Society **EMRS2013**, 27-31 Mai, Strasbourg - poster VPI28
- V. Dinca, **L. Rusen**, A. Palla-Papavlu, C. Mustaciosu, B. Mitu, M. Filipescu, M. Dinescu, „*Matrix assisted pulsed laser evaporation (MAPLE) of bioactive factors for stimulated cell adhesion interfaces*”, European Materials Research Society **EMRS2013**, 27-31 Mai, Strasbourg - poster VPI31
- L. Rusen, M. Filipescu, V. Dinca, M. Dinescu, „*Stimuli responsive functional polymeric thin films obtained by matrix assisted pulsed laser evaporation (MAPLE) for cell detachment studies*”, European Materials Research Society **EMRS2013**, 27-31 Mai, Strasbourg - poster, **Best Poster Award Symposium V VPI33**
- L. Rusen, V. Dinca, C. Luculescu, M. Filipescu, C. Mustaciosu, M. Bacalum, M. Zamfirescu, M. Dinescu
„*Tailored topography control of biopolymer surfaces by ultrafast lasers for cell - substrate studie*”s
European Materials Research Society **EMRS2013**, 27-31 Mai, Strasbourg - poster VPI28
- **L.Rusen**, M. Zamfirescu, C. Luculescu, V. Dinca, „*Changes on the Surface of Polymer Films Induced by Femtosecond Laser Irradiation*”, International Student Conference on Photonics - ISCP 2012, 8-12 Mai, Sinaia, Romania - poster
- **L. Rusen**, V. Dinca, C. Mustaciosu, C. Luculescu, M. Zamfirescu, M. Filipescu, M. Dinescu, „*Morphological characteristics of chitosan based structures obtained by nanosecond and femtosecond laser methods*”,
European Materials Research Society **EMRS2012**, 14-18 Mai, Strasbourg - poster 9 36.

- Dinca V., **Rusen L.**, A. Palla Papavlu, A. Matei, V. Ion, M. Dinescu, „*Polymer Multilayer obtained by Matrix Assisted Pulsed Laser Alternative Evaporation*”, European Materials Research Society **EMRS2012**, 14-18 Mai, Strasbourg - poster
- V. Dinca, C. Mustaciosu, A. Palla-Papavlu, **L. Rusen**, B. Mitu, M. Filipescu, M. Dinescu, „*Protein-Resistant Polymer Coatings obtained by Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation*”, European Materials Research Society **EMRS2012**, 14-18 Mai, Strasbourg - poster
- A. Zorila, **L. Rusen**, A. Stratan, G. Nemes, „*Simple method to measure the clip-level (threshold) area of a laser spot*”, Micro - to Nano-Photonics III - **ROMOPTO 2012**, Bucharest, 3 - 6 Septembrie, Romania - poster
- G. Nemes, A. Stratan, A. Zorila, **L. Rusen**, „*Effective area of pulsed laser spots within ISO 21254-1,2,3 standards: critical analysis, extensions, and measurements in near ultraviolet: near infrared domain*”, **2012 Laser Damage**, Boulder-Colorado, 23 - 26 Septembrie, USA - poster .
- V. Dinca, **L. Rusen**, M. Dinescu, „*Matrix Assisted Pulsed Laser Evaporation of biopolymers using 266 nm for biomedical applications*”, Micro - to Nano-Photonics III - **ROMOPTO 2012**, Bucharest, 3 - 6 Septembrie, Romania - poster .

Doctorand:

Rusen Laurențiu – Nicolae

Conducător științific:

Prof. Univ. Dr. Tiberiu Tudor