



Universitatea Titu Maiorescu
ȘCOALA DOCTORALĂ
DOMENIUL MEDICINĂ



TEZĂ DE DOCTORAT
(Rezumatul tezei de doctorat)

**Obținerea unui bionanocompozit și
demonstrarea proprietăților antimicrobiene,
antiinflamatoare, regeneratoare utile în
tratamentul plăgilor tegumentare**

Conducător de doctorat:

PROF. UNIV. DR. HABIL. Cristiana TĂNASE

Student-doctorand:

Stan Diana

București, 2024

CUPRINS

Corespunde Lucrării in-extenso

Introducere	10
I. PARTEA GENERALĂ.....	14
1. PERSPECTIVA INTEGRATĂ ASUPRA TEGUMENTULUI: ANATOMIE, FIZIOLOGIE ȘI MANAGEMENTUL RĂNILOR	14
1.1. Anatomia și fiziologia tegumentului	14
1.2. Funcțiile tegumentului.....	17
1.3. Metode pentru evaluarea rănilor.....	19
1.4. Clasificarea rănilor	21
1.5. Fizio-patologia vindecării rănilor	23
1.6. Informații esențiale în stabilirea planului terapeutic la pacienții cu răni tegumentare	26
2. POLIMERI UTILIZAȚI ÎN PRODUCȚIA DE PANSAMENTE	30
2.1. Polimeri naturali – alginatul	31
2.2. Polimeri sintetici – alcoolul polivinilic	33
3. TEHNICI DE RETICULARE A SUBSTANȚELOR POLIMERICE RELEVANTE PENTRU PRODUCȚIA DE PANSAMENTE	36
3.1. Metoda turnarea solventului.....	37
3.2. Metoda îngheț-desgheț	37
4. FORME DE PREZENTARE A PANSAMENTELOR ȘI INDICAȚIILE LOR ÎN FUNCȚIE DE TIPUL DE RANĂ.....	40
4.1 Hidrogeluri	43
5. SUBSTANȚE BIOACTIVE ÎNCORPORATE ÎN PANSAMENTE	46
5.1. Substanțe bioactive ce susțin procesele de vindecare.....	49
5.1.1. Colagenul.....	49
5.1.2. Acidul hialuronic	51
5.2. Substanțe cu activitate antimicrobiană	52
5.2.1. Doxiciclina	52
5.2.2. Nanoparticule de argint	57
6. PANSAMENTE CE PERMIT MONITORIZAREA VINDECĂRII RĂNILOR.....	60
6.1. Monitorizarea neinvazivă, în timp real, a pH-ului răni	60

CONCLUZII.....	62
II. CONTRIBUȚII ORIGINALE	64
Scopul și obiectivele tezei.....	64
CAPITOLUL 1. OBȚINEREA UNOR MEMBRANE DE HIDROGEL VERSATILE CU APLICAȚII ÎN VINDECAREA RĂNILOR.....	66
1.1. Studiu comparativ al influenței tipului și concentrației de plastifiant asupra comportamentului membranelor de hidrogel pe bază de alginat sau alcool polivinilic	66
1.1.1. Scop și obiective.....	66
1.1.2. Materiale și metode de obținere	67
1.1.3. Metode de caracterizare.....	70
- Analiza macroscopică	70
- Analiza variațiilor de grosime	71
- Analiza variațiilor de greutate	71
- Analiza pH-ului.....	71
- Conținutul de apă	71
- Gradul de umflare	72
- Frația de gel.....	72
- Degradarea hidrolitică.....	73
1.1.4. Analiza statistică.....	73
1.1.5. Rezultate și Discuții.....	73
1.1.5.1. Influența tipului și a concentrației de plastifiant asupra obținerii membranelor de hidrogel ...	73
1.1.5.2. Influența raportului polimer/glicerol asupra proprietăților membranelor de hidrogel	77
- Valoarea pH-ului hidrogelurilor	77
- Conținutul de apă	79
- Gradul de umflare	80
- Frația de gel.....	83
- Degradarea hidrolitică.....	85
1.1.6. Concluzii	87
1.2. Optimizarea stabilității și absorbției de exudat în cazul membranelor de hidrogel hibride: studiu comparativ al influenței raportului biopolimer/polimer sintetic.....	90
1.2.1. Scop și obiective.....	90
1.2.2. Materiale și metode de obținere	91
1.2.3. Metode de caracterizare.....	91
1.2.4. Rezultate și Discuții.....	92
1.2.4.1. Influența raportului PVA/alginat asupra proprietăților fizico-chimice	92
- Evaluarea macroscopică și pH	92

- Conținutul de apă	93
- Gradul de umflare	94
- Frația de gel.....	95
- Degradarea hidrolitică.....	96
1.2.5. Concluzii	97
1.3. Concluzii de etapă	98
CAPITOLUL 2. OBTINEREA UNOR MEMBRANE DE HIDROGEL BIOHIBRIDE ȘI EVALUAREA IMPACTULUI CONCENTRAȚIEI DE SUBSTANȚE BIOACTIVE ASUPRA PROPRIETĂȚILOR FIZICO-CHIMICE ȘI A BIOCOMPATIBILITĂȚII	102
2.1. Scop și obiective.....	102
2.2. Materiale și metode de obținere	103
2.3. Metode de caracterizare.....	105
2.3.1. Caractere fizico-chimice.....	105
- Captarea vaporilor de apă	105
- Degradarea enzimatică.....	105
- Viteza de transmitere a vaporilor de apă.....	106
- Morfologia de suprafață.....	106
- Analiza reologică.....	106
- Activitatea antiinflamatoare	107
2.3.2. Studiul biocompatibilității.....	107
2.3.2.1. Adsorbția proteinelor	107
2.3.2.2. Evaluarea citotoxicității – testul LDH.....	108
2.4. Rezultate și Discuții.....	108
2.4.1. Influența concentrației de collagen și acid hialuronic asupra proprietăților fizico-chimice ale membranelor de hidrogel biohibride	108
- Analiza macroscopică și pH.....	109
- Conținutul de apă	110
- Captarea vaporilor de apă	111
- Gradul de umflare	112
- Degradarea enzimatică.....	114
- Frația de gel.....	115
- Viteza de transmitere a vaporilor de apă.....	116
- Morfologia de suprafață.....	117
- Analiza reologică.....	119
2.4.2. Evaluarea influenței concentrației de collagen și acid hialuronic asupra proprietăților bioactive și a compatibilității celulare pentru membranele de hidrogel biohibride.....	122

- Activitatea antiinflamatoare	122
- Adsorbția de proteine	123
- Studiul citotoxicității – testul LDH.....	124
2.5. Concluzii de etapă	125
CAPITOLUL 3. SISTEME PENTRU ELIBERAREA TOPICĂ A AGENȚILOR CU ACTIVITATE ANTIBACTERIANĂ: DEZVOLTAREA ȘI EVALUAREA UNOR NOI MEMBRANE DE HIDROGEL BIOHIBRIDE COMPLEXE	128
3.1. Scop și obiective.....	128
3.2. Materiale și metode de obținere	129
3.3. Metode de caracterizare.....	131
3.3.1. Studii de reologie oscilatorie	131
3.3.2. Activitatea antioxidantă.....	132
3.3.3. Studii de eliberare de doxiciclină	133
3.3.3.1. Eliberarea cumulativă de doxiciclină	133
3.3.3.2. Cinetica de eliberare a doxiciclinei din membranele de hidrogel.....	134
3.3.4. Studiul activității antibacteriene prin metoda disc-difuzimetrică.....	135
3.3.5. Teste de biocompatibilitate și de evaluare a migrării celulare	136
3.3.5.1. Culturi Celulare și Evaluarea Migrării Celulare.....	136
3.3.5.2. Evaluarea proliferării celulare	137
3.4. Rezultate și Discuții.....	137
3.4.1. Evaluarea proprietăților fizico-chimice	137
- Evaluarea macroscopică și a pH-ului	137
- Gradul de umflare	138
- Captarea vaporilor de apă	140
- Frația de gel.....	141
- Degradarea hidrolitică.....	142
- Morfologia de suprafață	143
- Studii de reologie oscilatorie.....	144
3.4.2. Explorarea efectului bioactiv: potențialul terapeutic, activitatea antimicrobiană și biocompatibilitatea membranelor de hidrogel.....	150
3.4.2.1. Activitatea antiinflamatoare.....	150
3.4.2.2. Activitatea antioxidantă	151
3.4.2.3. Eliberarea cumulativă de doxiciclină	152
3.4.2.4. Cinetica de eliberare a doxiciclinei	154
3.4.2.5. Studiul activității antibacteriene prin metoda disc-difuzimetrică.....	157
3.4.2.6. Adsorbția de proteine.....	161

3.4.2.7. Studiu de proliferare celulară – testul MTS.....	162
3.4.2.8. Evaluarea migrării celulare – „scratch-wound assay”,.....	163
3.5. Concluzii de etapă	165
CAPITOLUL 4. DEZVOLTAREA UNOR NOI MEMBRANE DE HIDROGEL CU APLICAȚII ÎN	
MONITORIZAREA VINDECĂRII RĂNILOR ÎN TIMP REAL	168
4.1. Scop și obiective.....	168
4.2. Materiale și metode de obținere	169
4.3. Metode de caracterizare.....	171
4.3.1. Analiza viabilității celulare – live/dead assay	172
4.4. Rezultate și Discuții.....	172
4.4.1. Influența adității de indicatori de pH asupra proprietăților membranelor de hidrogel cu aplicații în monitorizarea vindecării rănilor	172
- Analiza caracterelor macroscopice și a pH-ului.....	172
- Conținutul de apă	173
- Captarea vaporilor de apă	174
- Gradul de umflare	175
- Degradarea hidrolitică.....	176
- Frația de gel.....	176
4.4.2. Abilitatea de indicare a schimbării valorii pH-ului mediului	177
4.4.3. Explorarea potențialului terapeutic al membranelor de hidrogel cu aplicații în monitorizarea vindecării rănilor	178
- Activitatea antiinflamatoare	178
- Activitatea antioxidantă.....	179
4.4.4. Analiza viabilității celulare - live/dead assay: selectarea membranelor de hidrogel performante cu aplicații în monitorizarea vindecării rănilor	180
4.5. Concluzii de etapă	181
CONCLUZII GENERALE	184
BIBLIOGRAFIE	190
Lista publicațiilor și diseminarea rezultatelor.....	252

INTRODUCERE

Este estimat că aproximativ 2% din populația mondială suferă de răni complicate. În SUA s-au raportat 10.5 milioane de cazuri în 2019, cu 2.3 milioane mai multe față de anul 2014 [1]. Impactul economic este uriaș, numai în SUA fiind raportate sume de peste 20 bilioane de dolari anual [2].

Deși în antichitate se utilizau pansamente din materiale naturale care acopereau rana, o bună perioadă de timp din epoca modernă s-a crezut că toate rănilile se vindecă mai repede dacă sunt lasate neacoperite. În anii 1960 cercetătorii Winter, Hinman și Maibach demonstrează în studiile lor independente faptul că menținerea unui mediu umed la nivelul rănilii îmbunătățește semnificativ rata de vindecare, contrar credinței de până atunci că o rană ținută uscată și neacoperită se vindecă mai repede [3–6].

Pentru a avea un rezultat terapeutic optim în procesul de vindecare al rănilor este important ca tratamentul și implicit pansamentul utilizat să fie adaptate atât tipului de rană cât și pacientului care suferă de acea rană. Tratamentul personalizat al rănilor începe încă din etapa de producție a pansamentului deoarece proprietățile materialului și modalitatea de prelucrare influențează caracteristicile și indicațiile sale, de exemplu capacitatea de absorbție a exudatului, permeabilitatea pentru gaze sau rezistența mecanică [7]. În plus, pansamentele pot avea încorporate substanțe bioactive cu rol antimicrobian, de sporire a efectului de vindecare și reepitelizare sau substanțe anestezice, cu scopul de a avea un produs performant [8–12]. Personalul medical trebuie să aleagă produsul cel mai eficient ținând cont de o serie de factori locali și externi, dintre care tipul de rană (de exemplu, acută, cronică, statusul contaminării) și etapa de vindecare în care se află, starea pacientului (comorbidități, mobilitate), condițiile socio-economice sau accesul la serviciile medicale specializate [7].

Tradițional, pentru tratamentul local al rănilor se folosește un pansament, care intră în contact cu rana și un bandaj, care fixează pansamentul [13,14]. Pansamentele pasive au rolul de a proteja rana contra factorilor agresori externi însă sunt adesea greu de îndepărtat și nu susțin procesele de vindecare. Pansamentele moderne sunt realizate din materiale noi, performante, adesea produse prin prelucrarea polimerilor naturali sau sintetici. Materialele polimerice prezintă caracteristici unice și revoluționare pentru tratamentul rănilor și permit, printre altele, absorbția unei cantități mari de exudat, aderența scăzută la patul rănilii, se mulează pe formele corpului, au permeabilitate pentru gaze și protejează împotriva contaminării. În plus, permit livrarea de substanțe bioactive la nivel local (antibiotice, antiinflamatoare sau analgezice). Recent, pansamentele moderne permit nu doar susținerea proceselor de vindecare dar și monitorizarea vindecării rănilor. În literatură sunt descrise dispozitive, integrate sau nu în pansamente, ce monitorizează parametrii ca pH [15,16], nivelul de oxigen [17,18], nivelul de umezeală [19], biomarkeri [20,21], temperatura [22] sau statusul contaminării [23]. Pe lângă aceste proprietăți revoluționare pansamentele moderne trebuie să fie accesibile și ușor de utilizat. În plus, un proces de producție cu impact negativ redus asupra mediului și utilizarea de substanțe cu toxicitate redusă devin tot mai relevante în contextul discuțiilor despre nivelul de poluare și impactul industriei asupra ecosistemului.

Hidrogelurile sunt materiale formate din rețele tridimensionale de polimeri reticulați, cu un conținut ridicat de apă (până la 99.5%). Hidrogelurile prezintă proprietăți excelente pentru utilizarea ca pansamente [14,24–29]: (1) absorb cantități moderate de exudat (în funcție de polimerul folosit în fabricație); (2) permeabile pentru gaze; (3) aplicare și îndepărtare nedureroasă; (4) modulează granulația; (5) modulează temperatura locală; (6) mențin mediu umed; (7) recomandate atât rănilor sănătoase cât și celor complicate ce necesită debridare autolitică; (8) suport excelent pentru substanțe bioactive.

Reticularea polimerilor cu scopul de a forma hidrogeluri se poate face prin metode fizice, chimice sau hibride. Tehnicile de reticulare influențează caracteristicile hidrogelului, de exemplu capacitatea de umflare sau activitatea biologică [30,31].

SCOPUL ȘI OBIECTIVELE LUCRĂRII

Având în vedere necesitatea tot mai mare de dispozitive medicale performante destinate vindecării rănilor care în același timp să fie accesibile și ușor de utilizat, **scopul** acestei lucrări a fost dezvoltarea unor membrane de hidrogel cu aplicații în tratamentul și monitorizarea rănilor, obținute printr-un proces de producție cu un impact negativ redus asupra mediului, ușor de utilizat și accesibil.

Având în vedere scopul studiului am urmărit următoarele **obiective** :

- Realizarea unei rețele polimerice sub formă de **membrane de hidrogel cu proprietăți superioare** prin analiza influenței tipului de plastifiant și a raportului polimer/plastifiant și polimer sintetic/polimer natural asupra proprietăților fizico-chimice ;
- Evaluarea influenței **adiției de colagen și acid hialuronic** asupra proprietăților fizico-chimice a membranelor de hidrogel ;
- Evaluarea capacității membranelor de hidrogel biohibride de **încorporare și eliberare a substanțelor cu efect antibacterian** ;
- Evaluarea capacității de **indicare a schimbării valorii pH-ului mediului** prin metoda colorimetrică ;
- Analiza efectului **citoroxic** a membranelor de hidrogel formate ;
- Analiza efectului membranelor de hidrogel asupra **migrării celulare**.

Lucrarea a fost structurată astfel

- Partea generală – șase capitole ;
- Partea originală – patru capitole.

REZULTATE ORIGINALE

CAPITOLUL 1. OBȚINEREA UNOR MEMBRANE DE HIDROGEL VERSATILE CU APLICAȚII ÎN VINDECAREA RĂNILOR

1.1. Studiu comparativ al influenței tipului și concentrației de plastifiant asupra comportamentului membranelor de hidrogel pe bază de alginat sau alcool polivinilic

1.1.1. Scop și obiective

În cadrul acestui capitol am avut ca **scop** identificarea agentului plastifiant optim pentru a fi utilizat în cadrul studiilor noastre. **Obiectivele** acestei etape au presupus explorarea a două variante de agent plastifiant în diferite concentrații (glicerol și PEG 200) pentru a determina substanța optimă pentru realizarea unor membrane de hidrogel pe bază de alginat (Alg) sau alcool polivinilic (PVA) cu caracteristici potrivite aplicațiilor intenționate. Ulterior, după identificarea agentului plastifiant cel mai potrivit, am analizat influența raportului polimer/plastifiant asupra proprietăților fizico-chimice ale membranelor de hidrogel pentru selectarea formulării ideale. Un alt obiectiv al acestui capitol a fost optimizarea metodelor alese de prelucrare a polimerilor. Metoda aleasă pentru producția membranelor de hidrogel pe bază de biopolimer a fost turnarea solventului. Pentru obținerea membranelor de hidrogel pe bază de polimer sintetic s-a folosit tehnica de îngheț-dezgeț. Caracterizarea extensivă a fost făcută asupra membranelor de hidrogel care au demonstrat cel puțin caracteristicile minime esențiale, necesare pentru a fi considerate potrivite în contextul aplicațiilor destinate susținerii proceselor de vindecare a rănilor.

1.1.2. Materiale și metode de obținere

Toți reactivii utilizați au fost de puritate analitică și au fost utilizați fără purificare suplimentară. Clorura de calciu (CaCl_2 , puritate >99%, SUA), glicerolul (Gli, anhidru, puritate >99%) și PEG 200 (Germania) au fost procurate de la Sigma Aldrich. Alginatul de sodiu (Alg, Belgia) a fost procurat de la VWR Chemicals. Alcoolul polivinilic (PVA, $M_w = 89.000 - 98.000$, 99% hidrolizat, SUA) a fost procurat de la Sigma Aldrich.

Lichidul de rană simulat (LRS) utilizat în cadrul acestei lucrări a fost realizat în laborator [32].

Pentru obținerea membranelor de hidrogel pe bază de alginat s-a folosit tehnica de turnare a solventului iar pentru obținerea membranelor de hidrogel pe bază de alcool polivinilic s-a folosit tehnica îngheț-dezgeț, folosind reactivii în concentrațiile menționate.

1.1.5. Rezultate și Discuții

1.1.5.1. Influența tipului și a concentrației de plastifiant asupra obținerii membranelor de hidrogel

Inițial, au fost analizate caracteristici precum grosimea și greutatea probelor pe bază de alginat și glicerol sau PEG 200. Membranele de hidrogel pe bază de alginat și glicerol au prezentat cele mai bune caracteristici macroscopice.

Membranele de hidrogel pe bază de PVA și glicerol sau PEG 200 au fost de asemenea analizate preliminar. La examinarea macroscopică membranele de hidrogel pe bază de polimer sintetic și glicerol au prezentat cele mai bune caracteristici.

1.1.5.2. Influența raportului polimer/glicerol asupra proprietăților membranelor de hidrogel

În continuare au fost analizate extensiv membranele de hidrogel pe bază de alginat sau alcool polivinilic formulate cu glicerol ca agent plastifiant deoarece acestea au prezentat cele mai potrivite proprietăți în urma analizei preliminare descrise mai sus.

- Valoarea pH-ului hidrogelurilor

Raportul dintre Alg și Gli nu a afectat semnificativ valoarea pH-ului membranelor de hidrogel, acesta fiind între 7.46 ± 0.17 și 7.59 ± 0.11 . S-a observat faptul că membranele de hidrogel pe bază de alcool polivinilic și glicerol au un pH între 6.19 ± 0.04 și 6.34 ± 0.05 .

- Conținutul de apă

Membranele de hidrogel pe bază de alginat și glicerol au prezentat un conținut de apă între $4.52 \pm 1.78\%$ și $7.36 \pm 0.94\%$. Nu au existat diferențe semnificative statistic între probele analizate în ceea ce privește conținutul de apă ($p > 0.05$).

În cazul membranelor de hidrogel pe bază de polimer sintetic și glicerol s-a observat un conținut de apă cuprins între $3.63 \pm 2.42\%$ și $7.55 \pm 0.27\%$. Nu au fost identificate diferențe semnificativ statistic între probele analizate în ceea ce privește conținutul de apă.

- Gradul de umflare

Comportamentul la umflare în soluție apoasă a membranelor de hidrogel a fost investigat în lichid de rană simulat (pH 8.3) la 37°C pentru evaluarea capacității acestora de absorbție a lichidelor. S-a observat influența compoziției formulărilor asupra gradului de umflare al probelor de membrane de hidrogel obținute (Figura 1).

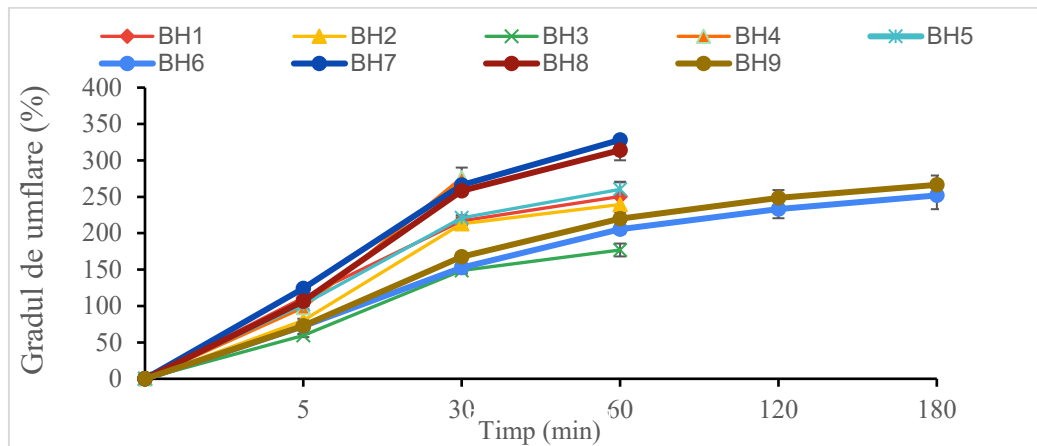


Figura 1. Gradul de umflare al membranelor de hidrogel pe bază de alginat. Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. ($n=3$).

În urma analizei datelor (Figura 2) s-a observat faptul că membranele de hidrogel pe bază de PVA și Gli au avut o abilitate relativ limitată de umflare, nedepășind un maxim de $67.88 \pm 2.62\%$ la 60 min de la începerea studiului pentru proba SP1 (pH 8.3) la 37°C . Absorbția exudatului în exces de la nivelul răni este un parametru important deoarece această proprietate a membranelor de hidrogel previne macerarea, infecția și cronicizarea plăgii [33].

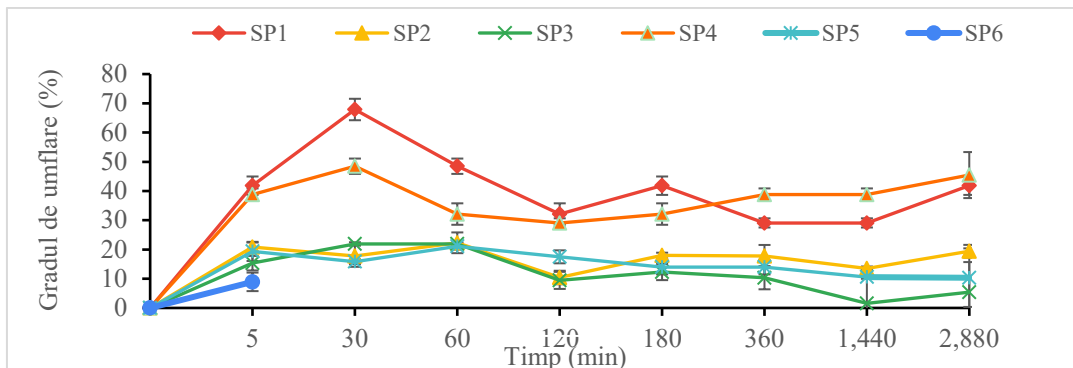


Figura 2. Gradul de umflare al membranelor de hidrogel pe bază de PVA. Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. (n=3).

- Frația de gel

Fracția de gel a membranelor de hidrogel pe bază de Alg și Gli a fost cuprinsă între $36.71 \pm 4.07\%$ și $48.74 \pm 1.32\%$. Analiza rezultatelor a arătat diferențe semnificative statistic în ceea ce privește fracția de gel între probele analizate, în funcție de compoziție.

În cazul membranelor de hidrogel pe bază de PVA și Gli s-a putut observa faptul că atât concentrația ridicată de PVA cât și concentrația scăzută de Gli au dus la creșterea valorii fracției de gel a probelor analizate. Astfel, proba SP1, a prezentat o valoare a fracției de gel de $37.58 \pm 2.1\%$, fiind semnificativ mai mare comparativ cu celelalte probe ($p < 0.001$).

- Degradarea hidrolitică

Rezultatele testului de degradare au indicat faptul că degradarea diferă în funcție de timp și de probă ($p < 0.001$). Astfel, degradarea probelor a fost semnificativ mai mare la 20 h comparativ cu cea de la 4 h pentru toate probele analizate (Figura 3).

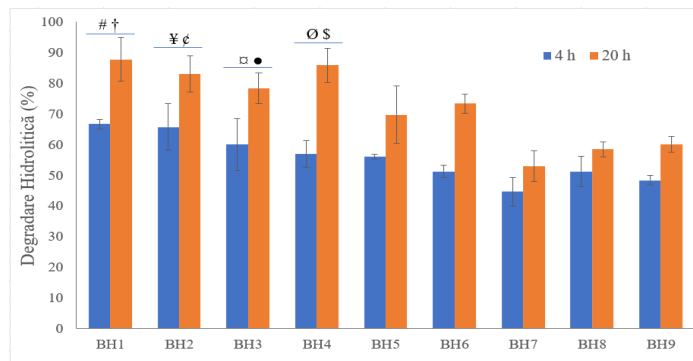


Figura 3. Degradarea hidrolitică a membranelor de hidrogel pe bază de alginat la 4 h și la 20 h. # diferit semnificativ de BH5 și BH6 ($p < 0.05$). Unde † diferit semnificativ de BH7, BH8 și BH9 ($p < 0.0001$), ¥ diferit semnificativ de BH7 ($p < 0.0001$), ¢ diferit semnificativ de BH8 și BH9 ($p < 0.01$), ◻ diferă semnificativ de BH7 ($p < 0.01$), • diferă semnificativ de BH8 și BH9 ($p < 0.05$), Ø diferă semnificativ de BH7 ($p < 0.0001$), \$ diferă semnificativ de BH8 și BH9 ($p < 0.01$). Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. (n=3).

Rezultatele obținute au indicat că nivelul de degradare a membranelor de hidrogel pe bază de polimer sintetic și glicerol nu prezintă diferențe semnificative între 4 și 20 h pentru toate probele analizate ($p > 0.05$), după cum este reprezentat în Figura 4.

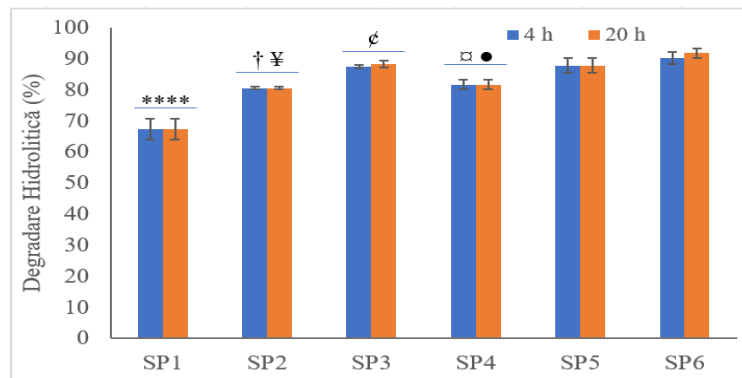


Figura 4. Degradarea hidrolitică a membranelor de hidrogel pe bază de PVA. Unde **** diferit semnificativ față de toate probele ($p < 0.0001$), † diferit semnificativ față de SP3 și SP5 ($p < 0.01$), ¥ diferit semnificativ față de SP6 ($p < 0.0001$), ¢ diferit semnificativ față de SP4 ($p < 0.05$), ◻ diferit semnificativ față de SP5 ($p < 0.05$), • diferit semnificativ față de SP6 ($p < 0.01$). Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. (n=3).

1.1.6. Concluzii

În cadrul acestei etape s-au obținut și testat **18 formulări pe bază de alginat și cele două tipuri de plastifiant și 18 formulări pe bază de alcool polivinilic și cele două tipuri de plastifiant.**

În urma analizei membranelor de hidrogel pe bază de alginat și glicerol au fost identificate formulările cu cele mai bune performanțe, și anume BP6 și BP9. Pe baza rezultatelor obținute aceste formulări prezintă un **pH potrivit aplicațiilor topice**, permit **absorbția exudatului în exces și îndepărtarea ataumatică**. În același timp s-a observat, în urma analizării tuturor probelor pe bază de alcool polivinilic și glicerol, faptul că probele SP1 și SP4 au prezentat cele mai potrivite proprietăți pentru utilizarea ca pansamente pentru tratamentul rănilor dermo-epidermice. Aceste formulări prezintă un **pH potrivit pentru aplicațiile topice** și deși permit absorbția unei **cantități minime de exudat** prezintă o stabilitate ridicată ceea ce indică **posibilitatea utilizării în zonele cu stres mecanic ridicat**.

1.2. Optimizarea stabilității și absorbției de exudat în cazul membranelor de hidrogel hibride: studiu comparativ al influenței raportului biopolimer/polimer sintetic

1.2.1. Scop și obiective

Scopul acestui capitol a fost obținerea unor membrane de hidrogel hibride, pe bază de polimer sintetic și polimer natural, ce prezintă proprietăți sinergice și superioare comparativ cu cele formulate dintr-un singur tip de polimer. **Obiectivele** acestui capitol au fost realizarea unor formulări pentru membranele de hidrogel hibride pe baza rezultatelor obținute anterior, stabilirea raportului ideal polimer sintetic/polimer natural, selectarea membranelor de hidrogel hibride care prezintă o rețea polimerică potrivită pentru studiile viitoare. Un alt obiectiv al acestui capitol a fost optimizarea metodei de obținere, astfel încât să permită reticularea lanțurilor polimerice printr-un procedeu cu impact negativ redus asupra mediului și cu un cost eficiență optim, ușor de transferat către producția la scară largă [34]. Astfel, s-a propus utilizarea unei metode de reticulare în doi pași ce presupune în primul rând formarea de legături ionice între lanțurile polimerice de alginat, datorită prezenței ionilor de calciu [35]. Ulterior, prin supunerea probelor la cicluri repetate de îngheț-desgheț se asigură formarea de legături de hidrogen între lanțurile polimerice de alcool polivinilic [36].

1.2.2. Materiale și metode de obținere

Toți reactivii utilizați au fost menționați în capitolul 1.

Pentru **producția membranelor de hidrogel hibride** a fost utilizată o tehnică de reticulare în doi pași – inițial turnarea solventului și ulterior cicluri de îngheț-desgheț.

1.2.4. Rezultate și Discuții

1.2.4.1. Influența raportului PVA/alginat asupra proprietăților fizico-chimice

- Evaluarea macroscopică și pH

La finalizarea procesului de reticulare în doi pași descris anterior toate formulările s-au format sub formă de membrane de hidrogel. Astfel, s-a confirmat faptul că metoda de reticulare aleasă a fost potrivită iar rețeaua polimerică s-a format cu succes prin stabilirea de legături fizice (în special legături de hidrogen și legături ionice) între lanțurile polimerice. Grosimea, greutatea și pH-ul probelor obținute au fost considerate satisfăcătoare pentru aplicațiile intenționate.

- Conținutul de apă

În urma analizei rezultatelor au fost evidențiate diferențe semnificative între probe în ceea ce privește conținutul de apă ($p < 0.05$).

- Gradul de umflare

Probele H1 și H2 au prezentat cea mai bună stabilitate și în același timp un grad de umflare satisfăcător, indicând faptul că aceste probe sunt potrivite pentru tratamentul rănilor exudative. Se poate observa din Figura 5. faptul că proba H1 a prezentat cel mai dezirabil comportament, atingând un grad de umflare maxim la 6 h de la

începerea studiului, de $407.96 \pm 2.43\%$. Proba H2, deși a prezentat o stabilitate excelentă, a atins echilibrul de umflare la 5 min de la începerea studiului.

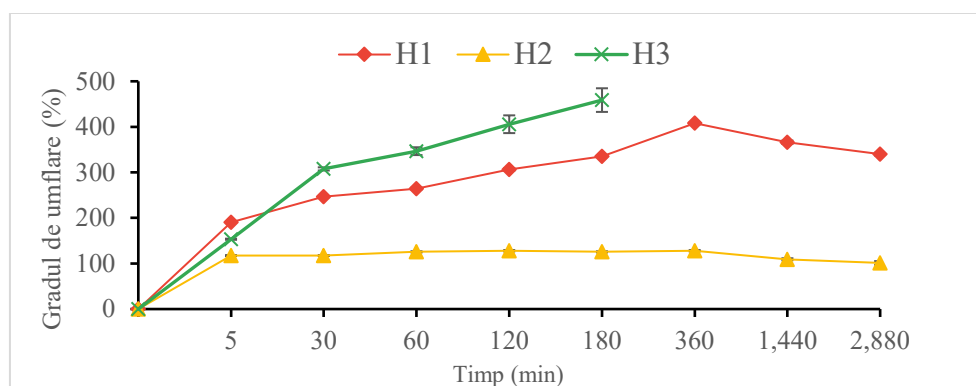


Figura 5. Gradul de umflare al membranelor de hidrogel hibride. Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. (n=3).

- Frația de gel

În urma realizării testului pentru stabilirea fracției de gel s-au observat diferențe semnificative între probe ($p < 0.0001$).

- Degradarea hidrolitică

Rezultatele testului de degradare hidrolitică au evidențiat o creștere semnificativă a degradării pe măsura trecerii timpului pentru fiecare dintre probele analizate ($p < 0.0001$). Nivelul de degradare înregistrat la 20 h a fost semnificativ mai ridicat comparativ cu nivelul înregistrat la 4 h pentru toate probele analizate (Figura 6). De asemenea, rezultatele experimentului au arătat că degradarea a fost diferită între cele trei probe.

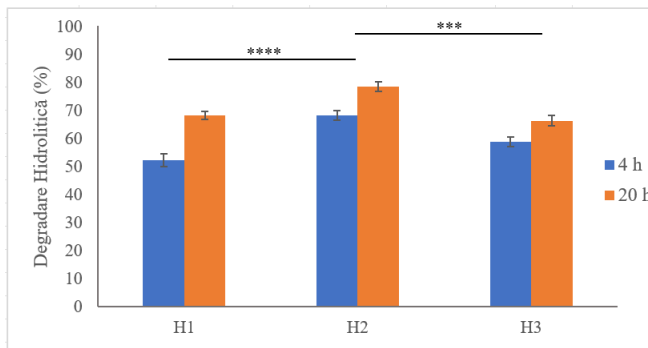


Figura 6. Degradarea hidrolitică a membranelor de hidrogel hibride la 4 h și la 20 h. Unde *** $p < 0.001$ și **** $p < 0.0001$. Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. (n=3).

1.2.5. Concluzii

În această etapă s-au obținut și analizat **3 formulări pe bază de PVA/alginat/glicerol**. În urma analizei membranelor de hidrogel hibride s-a constatat faptul că acestea prezintă caracteristici potrivite pentru utilizarea ca pansamente pentru tratamentul rănilor dermo-epidermice, în special probele H1 și H2.

1.3. Concluzii de etapă

În acest capitol a fost realizat un studiu extensiv al cărui scop a fost obținerea și caracterizarea fizico-chimică unor noi membrane de hidrogel cu proprietăți superioare, versatile, obținute printr-o metodă de reticulare optimizată, cu impact redus asupra mediului, fără utilizarea unor substanțe cu potențial efect toxic. Au fost analizate **18 formulări** pe bază de alginat și PEG 200 sau glicerol, **18 formulări** pe bază de PVA și PEG 200 sau glicerol și **3 formulări** pe bază de PVA și alginat utilizând glicerol ca plastifiant. Dintre toate formulările

realizate doar cele la care s-a utilizat glicerol ca plastifiant au fost considerate conforme pentru aplicațiile propuse și au fost analizate extensiv.

În ceea ce privește gradul de umflare, fracția de gel și degradarea hidrolitică, se pot observa diferențe notabile între cele trei tipuri de formulări - pe bază de alginat și glicerol, alcool polivinilic și glicerol, și alcool polivinilic, alginat și glicerol, conform Figurii 7. Pentru realizarea acestor grafice, au fost incluse probele considerate cele mai performante din cadrul fiecărui experiment al acestui capitol, pentru a reprezenta vizual sinergismul și performanța membranelor de hidrogel hibride. Astfel, se poate observa că membranele de hidrogel hibride prezintă o stabilitate crescută și un grad de umflare superior celorlalte probe, în special pentru proba H1. Această formulare a dus la formarea unor membrane de hidrogel cu un grad maxim de umflare de $408 \pm 2.3\%$ la 6 h, o fracție de gel de $54.31 \pm 1.7\%$ și o rată de degradare hidrolitică de $52.23 \pm 2.27\%$ la 4 h și $68.13 \pm 1.44\%$ la 20 h.

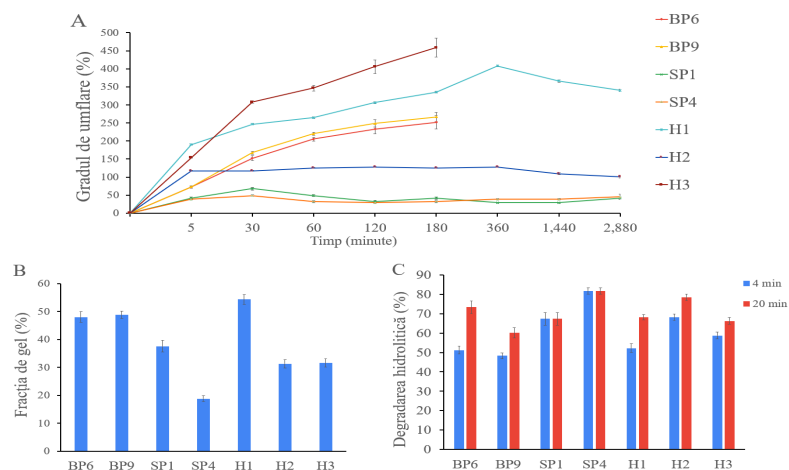


Figura 7. Evaluarea comparativă a membranelor de hidrogel cu cele mai performante caracteristici din cadrul fiecărei etape. (A) gradul de umflare, (B) fracția de gel și (C) degradarea hidrolitică (dH₂O, pH 7.4). Testul indicelui de umflare afișează SD mare datorită ratelor variabile de dezintegrare a probelor de hidrogel în timpul studiului. Rezultatele sunt prezentate ca medie ± D.S. (n=3).

Pe baza rezultatelor experimentale obținute în cadrul acestui capitol, considerăm că membranele de hidrogel hibride, bazate pe alcool polivinilic, alginat și glicerol, sunt cele mai performante. În urma analizei rezultatelor, probele H1 și H2 pot fi selectate ca fiind cele mai potrivite sisteme în care se vor încorpora ulterior substanțe cu efect bioactiv, pentru realizarea de membrane de hidrogel biohibride cu aplicații în susținerea proceselor de vindecare a rănilor. Aceste formulări au un **pH potrivit aplicațiilor topice**, permit **absorbția excesului de exudat**, sunt **confortabile** și permit îndepărtarea **cu ușurință**, fără traumatizarea țesutului nou format.

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate parțial în revista articolul **Exploring the Impact of Alginate—PVA Ratio and the Addition of Bioactive Substances on the Performance of Hybrid Hydrogel Membranes as Potential Wound Dressings**, revista Gels, Volumul 8, Nr. 6, din 2023, <https://doi.org/10.3390/gels9060476>. IF 4.6.

CAPITOLUL 2. OBTINEREA UNOR MEMBRANE DE HIDROGEL BIOHIBRIDE ȘI EVALUAREA IMPACTULUI CONCENTRAȚIEI DE SUBSTANȚE BIOACTIVE ASUPRA PROPRIETĂȚILOR FIZICO-CHIMICE ȘI A BIOCOMPATIBILITĂȚII

2.1. Scop și obiective

Scopul acestui capitol a fost obținerea unor membrane de hidrogel biohibride cu aplicații în tratamentul rănilor dermo-epidermice. **Obiectivele** principale au fost realizarea unor formulări pe bază de PVA/alginat/glicerol/colagen/acid hialuronic pe baza rezultatelor obținute anterior, testarea fizico-chimică, studiul biocompatibilității, evaluarea citotoxicității și selectarea formulărilor cu cele mai înalte performanțe pentru aplicațiile intenționate.

2.2. Materiale și metode de obținere

Pentru obținerea membranelor de hidrogel biohibride s-a utilizat tehnica de obținere menționată în capitolul anterior cu mențiunea că la final, după amestecarea celor două soluții polimerice, s-au adăugat cantitățile necesare de colagen (COL) și acid hialuronic (HA), cu omogenizarea riguroasă a soluției finale obținute.

2.4. Rezultate și Discuții

2.4.1. Influența concentrației de colagen și acid hialuronic asupra proprietăților fizico-chimice ale membranelor de hidrogel biohibride

- *Analiza macroscopică și pH*

Evaluarea inițială a membranelor de hidrogel biohibride a arătat faptul că includerea de COL și HA nu a dus la modificări semnificative în ceea ce privește aspectul, greutatea, gorsimea sau pH-ul acestora comparativ cu cel al membranelor de hidrogel hibride.

- *Conținutul de apă*

Încorporarea substanțelor bioactive, respectiv COL și HA, a condus la o creștere semnificativă a conținutului de apă al membranelor de hidrogel biohibride ($p < 0.0001$).

- *Captarea vaporilor de apă*

Toate probele au prezentat o abilitate excelentă de absorbție a umidității, atingând niveluri satisfăcătoare de hidratare. Adiția de substanțe bioactive, COL și HA, a crescut semnificativ abilitatea membranelor de hidrogel biohibride de captare a vaporilor de apă, în comparație cu cea a membranelor de hidrogel hibride ($p < 0.0001$).

- *Gradul de umflare*

Adăugarea de COL și HA a afectat comportamentul de umflare în mod diferit în funcție de raportul PVA/Alg, așa cum este ilustrat în Figura 8. Dintre toate formulările, proba cu cea mai mică concentrație de acid hialuronic, BH1.20, a prezentat cel mai mare grad de umflare cu o valoare maximă la 6 h.

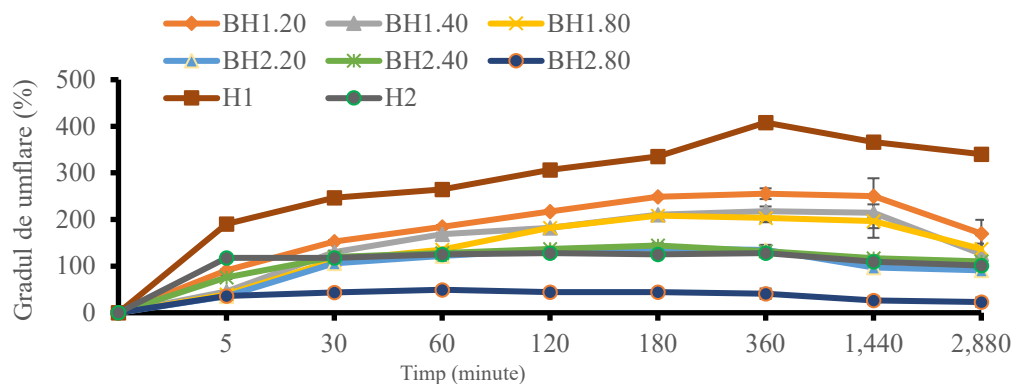


Figura 8. Gradul de umflare al membranelor de hidrogel biohibride comparativ cu membranele de hidrogel hibride. Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. (n=3).

- Degradarea enzimatică

Pentru a înțelege comportamentul degradării membranelor de hidrogel biohibride în condiții asemănătoare cu condițiile *in vivo*, am realizat un test de degradare cu diferite soluții apoase care conțineau enzime precum hialuronidaza (HAasa, 10 U/mL), colagenaza (COLasa, 10 U/mL) și un amestec a celor două (HAasa + COLasa, 10 U/mL fiecare), comparativ cu apă distilată (dH₂O, pH 7.4) și lichid de rană simulat (LRS, pH 8.3). După cum era de așteptat, adăugarea enzimelor a dus la o rată crescută de degradare a probelor, deși creșterea nu a fost marcantă, ci mai degrabă discretă (Figura 9).

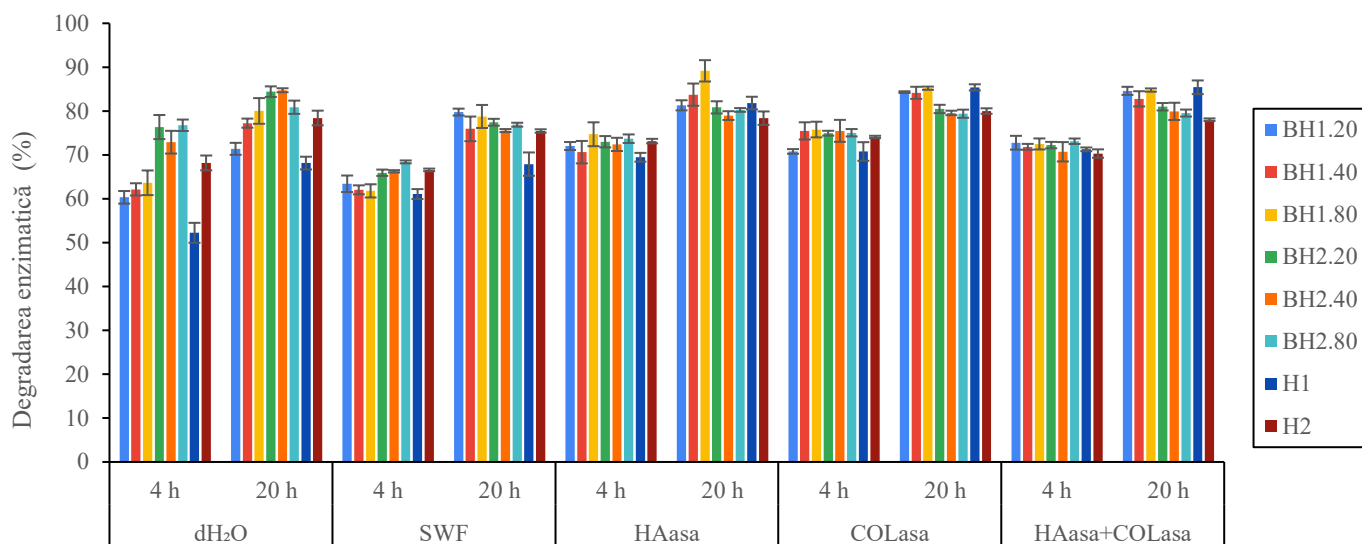


Figura 9. Degradarea enzimatică a membranelor de hidrogel biohibride comparativ cu membranele de hidrogel hibride. Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. (n=3).

- Frația de gel

Membranele de hidrogel biohibride au prezentat valori semnificativ mai mici pentru fracția de gel în comparație cu membranele de hidrogel hibride corespunzătoare ($p < 0.0001$), așa cum era de așteptat din testele anterioare. Rezultatele au arătat că variația concentrației de HA nu a avut un impact semnificativ asupra conținutului de gel a probelor analizate, și presupunem că adăugarea de COL poate fi principalul responsabil pentru acest efect.

- Viteza de transmitere a vaporilor de apă

Am evaluat viteza de transmisie a vaporilor de apă (VTVA) la 24 și 48 h folosind metoda gravimetrică, în timp ce hârtia de filtru a servit drept control (Figura 10). Acest parametru a arătat faptul că membranele hidrogel biohibride care conțin compuși bioactivi au potențialul de a facilita schimbul de gaze între patul răni și

atmosfera, în timp ce servesc ca barieră împotriva infiltrării agenților patogeni și previn deshidratarea [37]. Este demn de remarcat faptul că, pentru pielea intactă și sănătoasă, VTVA este în mod tipic în intervalul 200–300 g/m² h, în timp ce pentru pielea rănită poate crește de zece ori sau chiar mai mult, în funcție de grosimea răni [38,39].

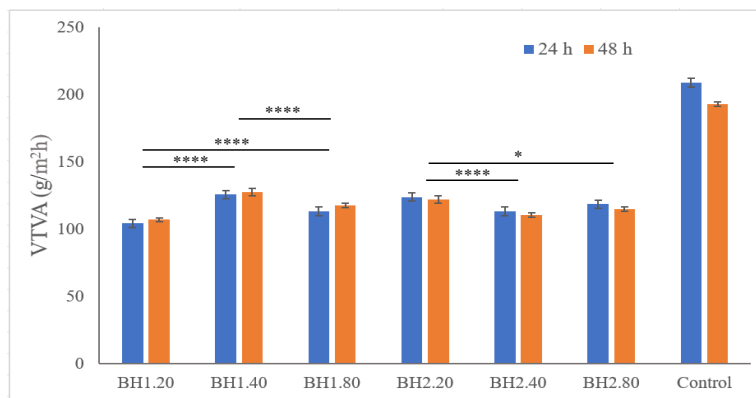


Figura 10. Viteza de transmitere a vaporilor de apă a membranelor de hidrogel biohibride. Unde **** $p < 0.0001$ și * $p < 0.05$. Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. ($n=3$).

- Morfologia de suprafață

Imaginile de microscopie electronică de baleiaj (SEM) au relevat că membranele de hidrogel biohibride prezintă o suprafață predominant netedă, la nivelul căreia sunt prezenți pori de dimensiuni variabile, care pot fi observați și în secțiunea transversală.

- Analiza reologică

Analiza noastră a relevat că, într-un interval de umiditate de 30-40%, modulul lui Young al probei BH1.80 a depășit pe cel al lui H1. Peste un conținut de umiditate de 45% această diferență s-a diminuat, dar proba BH1.80 a menținut în mod constant un modul de elasticitate mai mare. Alungirea la rupere a arătat că proba H1 a avut o performanță mai bună, dar, din nou, rezultatele noastre au arătat că acest comportament depinde de nivelurile de umiditate a probelor. Rezistența la tracțiune pentru proba BH1.80 a depășit pe cea a probei H1 la niveluri de umiditate sub 45%. Când conținutul de umiditate a variat între 45 și 55%, H1 a manifestat o rezistență superioară la tracțiune. Dincolo de 55% umiditate, diferența în rezistența la tracțiune între cele două probe a devenit minimă.

2.4.2. Evaluarea influenței concentrației de colagen și acid hialuronic asupra proprietăților bioactive și a compatibilității celulare pentru membranele de hidrogel biohibride

- Activitatea antiinflamatoare

S-a putut observa o creștere semnificativă a activității de inhibare a denaturării proteinelor la adăugarea de COL și HA ($p < 0.0001$) dar și că activitatea de inhibare a denaturării proteinelor este influențată semnificativ de concentrația de HA, atât pentru probele din categoria H1 cât și pentru probele din categoria H2 (Figura 11).

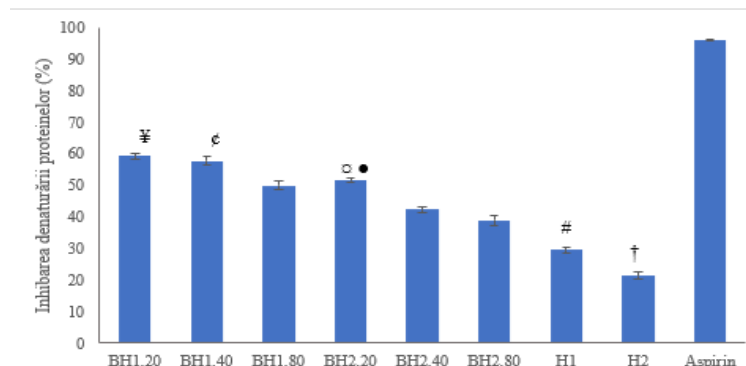


Figura 11. Abilitatea membranelor de hidrogel biohibride de a inhiba denaturarea proteinelor, comparativ cu membranele de hidrogel hibride. Unde # diferit semnificativ de BH1.20, BH1.40, BH1.80 ($p < 0.0001$), † diferit semnificativ de BH2.20, BH2.40, BH2.80 ($p < 0.0001$), ¥ diferit semnificativ de BH1.80 ($p < 0.01$), ¢ diferit semnificativ de BH1.80 ($p < 0.01$), □ diferă semnificativ de BH2.40 ($p < 0.01$), ● diferă semnificativ de BH2.80 ($p < 0.0001$). Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. ($n=3$).

- Adsorbția de proteine

Conform constatărilor noastre experimentale (Figura 12.), suprafața membranelor de hidrogel biohibride a prezentat o adsorbție minimă de proteină. Membranele de hidrogel cu o cantitate ridicată de HA au prezentat cel mai redus nivel de adsorbție.

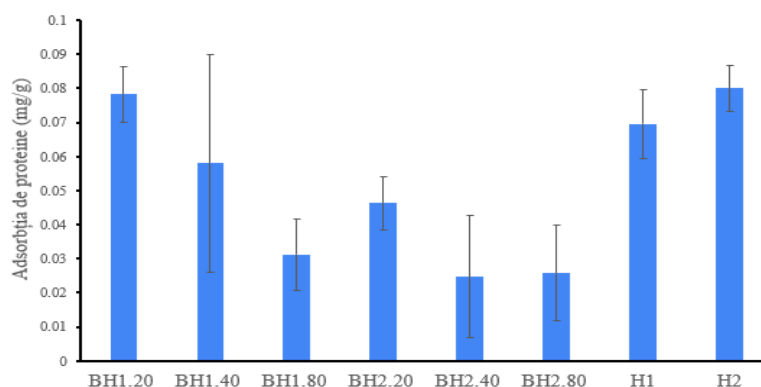


Figura 12. Adsorbția de proteine a membranelor de hidrogel biohibride, comparativ cu membranele de hidrogel hibride. Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. ($n=3$).

- Studiul citotoxicității – testul LDH

În studiul nostru, rezultatele obținute din testul LDH au relevat că prezența colagenului și a acidului hialuronic au avut efecte distincte asupra răspunsului fibroblastelor umane la membranele de hidrogel biohibride (Figura 13.). În mod specific, celulele tratate cu proba H1 au prezentat o eliberare mai mică de LDH în comparație cu celulele tratate cu proba H2. Introducerea compușilor bioactivi a dus la o scădere a eliberării de LDH pentru probele BH2.20, BH2.40 și BH2.80 în comparație cu proba H2. În mod surprinzător, introducerea agenților bioactivi a dus la o creștere a eliberării de LDH pentru celulele tratate cu probele BH1.20, BH1.40 și BH1.80.

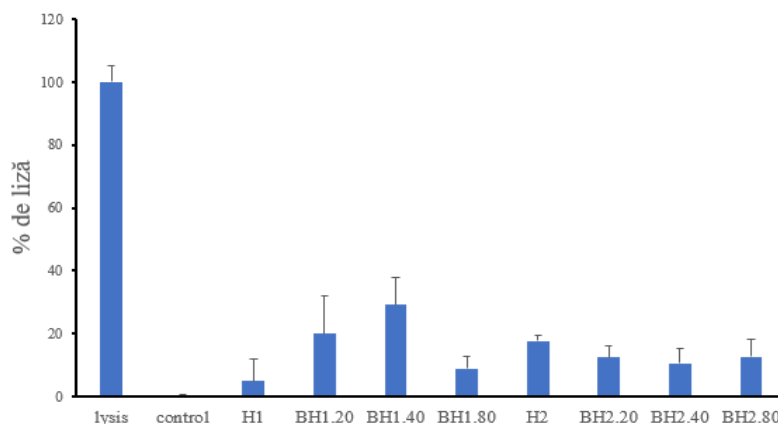


Figura 13. Citotoxicitatea membranelor de hidrogel determinată prin testul LDH. Fibroblastele umane normale au fost incubate cu probele menționate. Eliberarea LDH a fost măsurată spectrofotometric în supernatantul celular. Cîtirile au fost normalizate la fundal pentru fiecare probă și exprimate ca raport față de controlul de liză normalizat. Rezultatele sunt prezentate ca medie ± S.D. (n=3).

2.5. Concluzii de etapă

În cadrul acestui capitol au fost obținute și caracterizate extensiv **6 noi membrane de hidrogel** pe bază de alcool polivinilic/alginat/colagen/acid hialuronic folosind o metodă de obținere cu **impact negativ scăzut asupra mediului** și cu un **cost-eficiență ridicat**. Metoda de reticulare în doi pași, turnarea solventului și cicluri de îngheț-desgheț, a dus la formarea unor membrane de hidrogel stabile, ușor de manipulat, translucide și cu o textură plăcută.

Adiția de COL și HA a dus la o **creștere a abilității de inhibare a denaturării proteinelor** în cazul tuturor probelor iar efectul este dependent de doză pentru acidul hialuronic. S-a observat de asemenea că adiția de substanțe bioactive, în anumite concentrații, duce la **scăderea adsorbției proteinelor la suprafața membranelor** de hidrogel biohibride sugerând un **impact pozitiv asupra biocompatibilității** acestora. Interesant, prezența unei cantități mai mari de alginat a dus la scăderea citotoxicității probelor. Introducerea agenților bioactivi a avut efecte diferite asupra eliberării LDH în timpul studiilor celulare. Celulele tratate cu formulări BH2 (o concentrație mai mare de PVA) au demonstrat o eliberare mai mică de LDH, indicând o **scădere a citotoxicității**. Pe de altă parte, celulele tratate cu formulări BH1 (o concentrație mai mare de alginat) au prezentat o creștere a eliberării LDH. Sunt necesare cercetări suplimentare pentru a înțelege în mod cuprinzător mecanismele de bază pentru a îmbunătăți biocompatibilitatea.

Rezultatele prezentate în acest capitol au fost publicate în articolul **Exploring the Impact of Alginate—PVA Ratio and the Addition of Bioactive Substances on the Performance of Hybrid Hydrogel Membranes as Potential Wound Dressings**, revista Gels, Volumul 8, Nr. 6, din 2023, <https://doi.org/10.3390/gels9060476>. IF 4.6.

CAPITOLUL 3. SISTEME PENTRU ELIBERAREA TOPICĂ A AGENȚILOR CU ACTIVITATE ANTIBACTERIANĂ: DEZVOLTAREA ȘI EVALUAREA UNOR NOI MEMBRANE DE HIDROGEL BIOHIBRIDE COMPLEXE

3.1. Scop și obiective

Scopul acestui capitol a fost dezvoltarea de noi membrane de hidrogel biohibride ca sisteme de eliberare locală a agenților cu activitate antimicrobiană. **Obiectivele** acestui capitol au fost realizarea de membrane de hidrogel biohibride, pe baza rezultatelor anterioare, care conțin două concentrații diferite de doxiciclină și realizarea de membrane de hidrogel biohibride care să conțină nanoparticule de argint de dimensiuni diferite. Un alt obiectiv

important a fost, desigur, caracterizarea extensivă a acestora, mai ales din perspectiva biocompatibilității. Obținerea unor astfel de membrane de hidrogel ridică unele provocări, în special în ceea ce privește încorporarea cu succes a agenților terapeutici, cu păstrarea efectului clinic. Un alt aspect, la fel de important, este capacitatea acestor sisteme de a elibera eficient substanțele încorporate. Desigur, în special pentru nanoparticulele de argint, este foarte important să fie adresat potențialul citotoxic.

3.2. Materiale și metode de obținere

Membranele de hidrogel biohibride îmbunătățite cu agenți cu activitate antibacteriană au fost realizate conform protocolului în doi pași descris, cu mențiunea că după adăugarea și omogenizarea colagenului (COL) și a acidului hialuronic (HA) au fost adăugate cantitățile necesare de doxiciclină (DOXI) și nanoparticule de argint (npAg) necesare.

3.4. Rezultate și Discuții

3.4.1. Evaluarea proprietăților fizico-chimice

- *Evaluarea macroscopică și a pH-ului*

După finalizarea protocolului de reticulare, toate formulările s-au format în membrane hidrogel. Toate mostrele au prezentat un aspect uniform și omogen. Culoarea membranelor hidrogel a variat în funcție de compusul integrat. Greutatea și grosimea probelor a fost conformă. Analiza valorii pH-ului a arătat faptul că adăugarea de DOXI în cantitate mare (5mg/ml) acidifică probele.

- *Gradul de umflare*

Adăugarea atât a nanoparticulelor de argint (npAg), cât și a DOXI a influențat comportamentul de umflare al membranelor hidrogel în comparație cu proba de control (Figura 14).

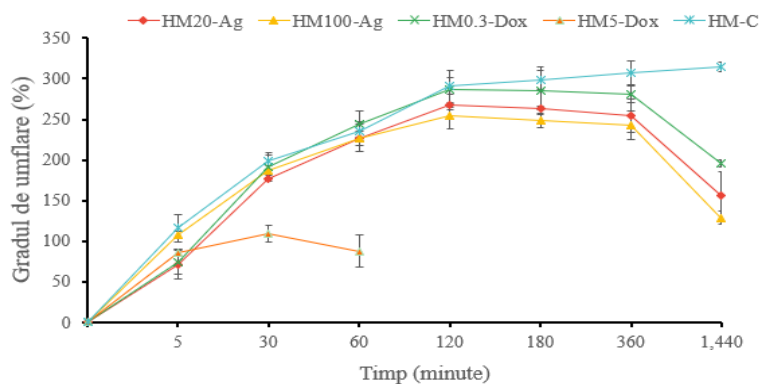


Figura 14. Gradul de umflare a membranelor de hidrogel. Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. (n=3).

- *Captarea vaporilor de apă*

În ceea ce privește capacitatea de absorbție a vaporilor de apă analiza rezultatelor a arătat că există diferențe semnificative între probe ($p < 0.0001$). Includerea substanțelor cu efect antimicrobian a influențat capacitatea de captare a vaporilor de apă.

- *Fracția de gel*

Rezultatele au arătat o diferență semnificativă în ceea ce privește fracția de gel a probelor analizate ($p < 0.0001$). Includerea diferitelor substanțe cu efect antimicrobian a influențat semnificativ fracția de gel a probelor.

- Degradarea hidrolitică

Rata de degradare a membranelor de hidrogel a variat între 60.29 ± 1.38 și $68.46 \pm 1.66\%$ la 4 h și între 70.88 ± 1.07 și $77.10 \pm 0.86\%$ la 20 h (Figura 15). Analiza rezultatelor a arătat că ratele de degradare au diferit semnificativ între membranele hidrogel analizate ($p < 0.0001$). Degradarea a crescut semnificativ de la 4 h la 20 h în cazul tuturor probelor ($p < 0.0001$).

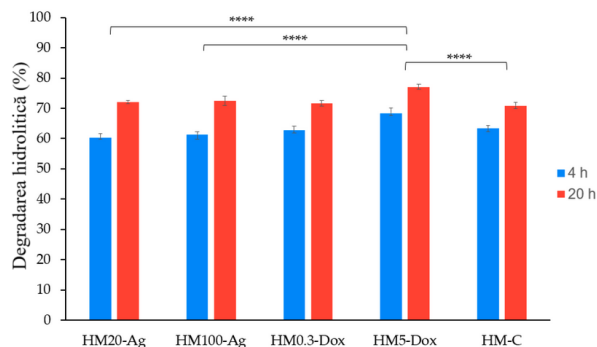


Figura 15. Degradarea hidrolitică a membranelor de hidrogel. Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. ($n=3$), unde **** $p < 0.0001$.

- Morfologia de suprafață

Microstructura membranelor de hidrogel a fost evaluată folosind microscopia electronică de baleiaj (SEM). Morfologia suprafeței membranelor de hidrogel a diferit între formulări.

- Studii de reologie oscilatorie

Testele de baleiaj de frecvență efectuate asupra membranelor de hidrogel investigate au arătat proprietăți puternic asemănătoare gelului, cu valori ale G' mai mari decât cele ale G'' cu cel puțin un ordin de mărime pe întregul interval de frecvență operațională de la 0.25 la 100 Hz. Prezența nAg de 100 nm a părut să întărească caracterul de gel (probele HM100-Ag) în comparație cu prezența nAg de 20 nm (probele HM20-Ag). O cantitate mică de doxiciclină (0.3 mg/mL) a condus la formarea unor membrane de hidrogel (HM0.3-Dox) cu aceeași rigiditate ca a membranelor de hidrogel de control (HM-C), în timp ce o cantitate mult mai mare de doxiciclină (5 mg/mL) a dus la o rigiditate crescută pentru gelurile finale (HM5-Dox) în comparație cu atât HM0.3-Dox, cât și probele etalon (HM-C).

3.4.2. Explorarea efectului bioactiv: potențialul terapeutic, activitatea antimicrobiană și biocompatibilitatea membranelor de hidrogel

3.4.2.1. Activitatea antiinflamatoare

S-a observat că toate formulările de hidrogel au prezentat activitate antiinflamatorie, protejând proteina serică bovină (BSA) de denaturare (Figura 16). Rezultatele au indicat diferențe semnificative în ceea ce privește inhibarea denaturării BSA între probele analizate ($p < 0.0001$).

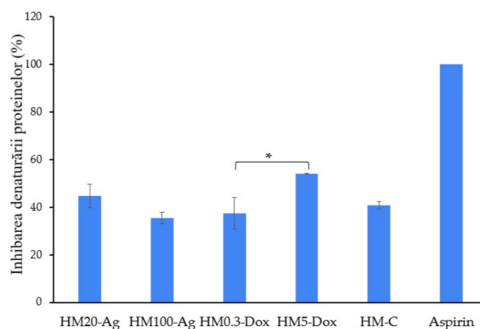


Figura 16. Efectul de prevenire a denaturării proteinelor al membranelor de hidrogel (antiinflamator). Unde * $p < 0.05$. Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. ($n=3$).

3.4.2.2. Activitatea antioxidantă

Rezultatele au indicat o diferență semnificativă în nivelurile de activitate antioxidantă între probele analizate ($p < 0.0001$). Includerea de npAg de 20 nm a influențat pozitiv activitatea antioxidantă a membranelor hidrogel în comparație cu adăugarea de npAg de 100 nm. Similar, membranele hidrogel care conțin o doză mai mare de DOXI au prezentat o activitate antioxidantă mai mare în comparație cu cele cu o doză mică de DOXI. (Figura 17).

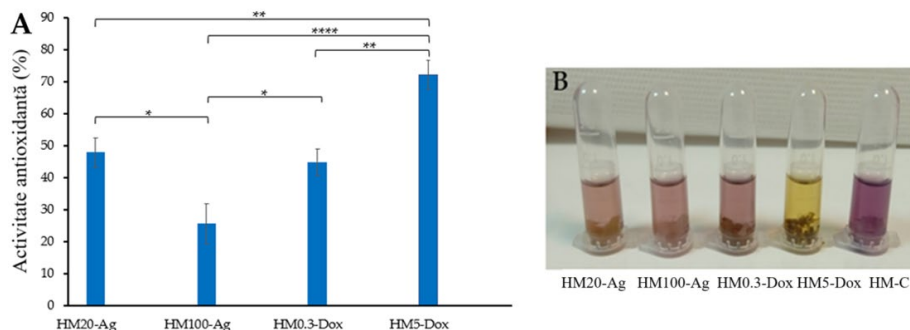


Figura 17. A. Activitatea antioxidantă a membranelor de hidrogel după incubare timp de 45 min în întuneric. B. Reprezentarea vizuală a modificărilor de culoare după incubarea probelor în întuneric timp de 45 min. Probele au fost analizate în trei exemplare, iar rezultatele din panoul A sunt prezentate ca medie \pm D.S. Unde **** $p < 0.0001$, *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$ și * $p < 0.05$.

3.4.2.3. Eliberarea cumulativă de doxiciclină

Datele din Figura 18 evidențiază tendințele de eliberare a DOXI din hidrogeluri. Pentru hidrogelurile încărcate cu DOXI în doze mici (proba HM0.3-Dox), s-a observat o eliberare semnificativă, de 90%, în primele 12 h la pH 7.4 și o eliberare ușor redusă, dar încă semnificativă, de 80% după aceeași durată de timp la pH 8.3. În cazul hidrogelurilor cu o concentrație mai mare de DOXI (proba HM5-Dox), s-a observat o eliberare rapidă, de 90%, realizată în primele 6 h la pH 7.4. În plus, proba HM5-Dox a prezentat o eliberare maximă de 80% la 12 h, la pH 8.3.

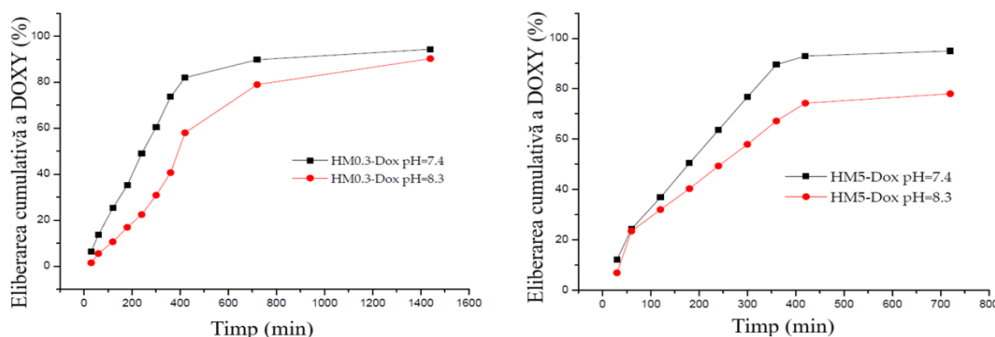


Figura 18. Eliberarea cumulativă de doxiciclină în timp. Datele sunt prezentate sub formă de medie ($n=3$).

3.4.2.4. Cinetica de eliberare a doxiciclinei

Datele de eliberare analizate pe baza modelului cinetic Korsmeyer Peppas a oferit cei mai înalți coeficienți de corelație, indicând faptul că amestecul de polimeri (PVA și alginat) este potrivit pentru formularea unei membrane de hidrogel care poate fi utilizată ca sistem de livrare a medicamentelor. Pentru ambele probe, valoarea lui n indică un proces de dizolvare non-Fickininan guvernat de un mecanism de difuzie anormal sau difuzie cuplată cu eroziune.

3.4.2.5. Studiul activității antibacteriene prin metoda disc-difuzimetrică

Testarea activității antibacteriene pe șapte tulpini microbiene selectate ca fiind cele mai relevante în contextul acestui studiu au arătat că membranele de hidrogel care conțin doxiciclină prezintă o activitate antibacteriană excelentă, zonele de inhibiție (Figura 19) fiind clare și de dimensiuni conform celor descrise în ghidul CLSI.

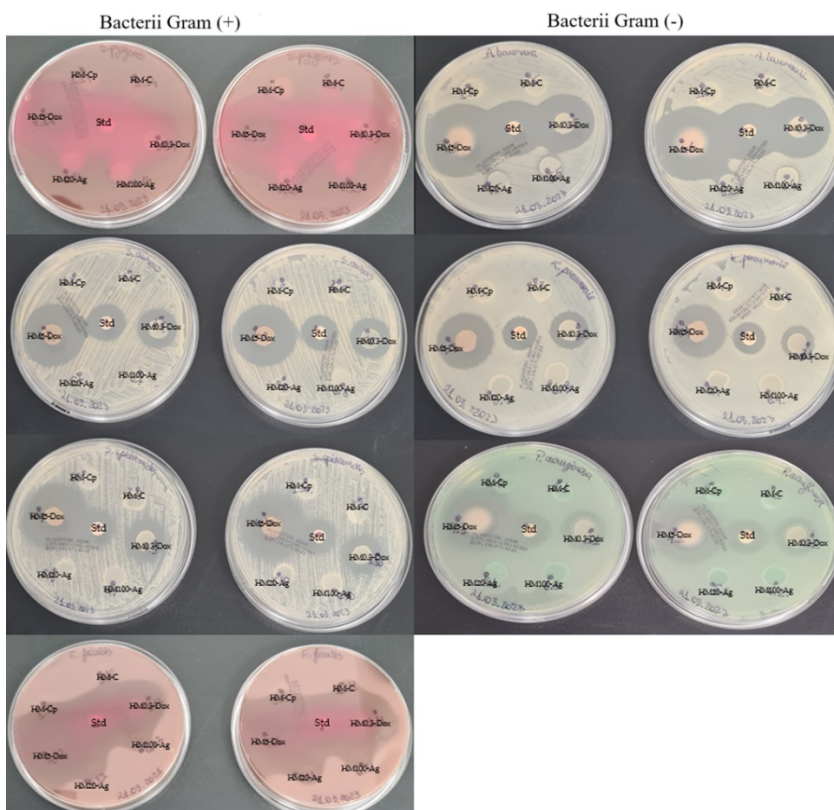


Figura 19. Zonele de inhibiție pentru tulpinile bacteriene selectate (duplicat).

3.4.2.6. Adsorbția de proteine

Conform rezultatelor noastre, toate probele de hidrogel au prezentat o adsorbție redusă a proteinelor la suprafață (Figura 20.). Cu toate acestea, proba HM-C a prezentat cea mai mică capacitate de adsorbție în comparație cu restul probelor. Comportamentul diferit s-a datorat cel mai probabil prezenței grupurilor ionizate polare de DOXI din rețeaua hidrogelului, care a permis o adsorbție mai mare a BSA pe suprafața hidrogelurilor prin interacțiuni electrostatice.

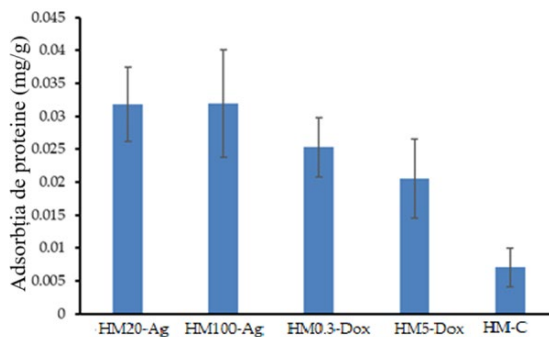


Figura 20. Adsorbția de proteine la suprafața membranelor de hidrogel. Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. (n=3).

3.4.2.7. Studiu de proliferare celulară – testul MTS

Proba HM5-Dox a demonstrat citotoxicitate, prezentând o viabilitate celulară de mai puțin de 20% în comparație cu celulele netratate. În schimb, probele HM100-Ag, HM0.3-Dox și HM-C au fost necitotoxice, cu o viabilitate celulară de peste 80%, în timp ce viabilitatea celulară în cazul probei HM20-Ag a fost puțin sub 80% (78%). În studiul nostru, proba HM0.3-Dox a arătat o biocompatibilitate excelentă, în timp ce introducerea unei concentrații mai mari de DOXI (proba HM5-Dox) a avut un impact profund asupra proliferării celulare (Figura 21.).

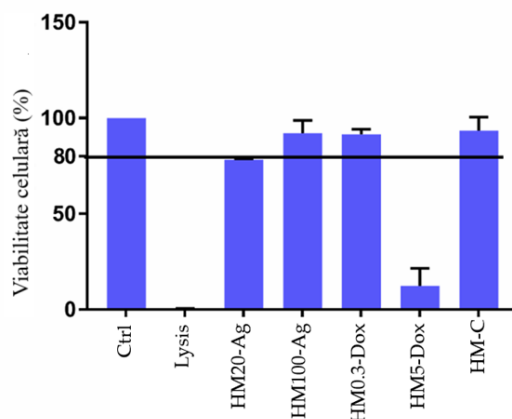


Figura 21. Studiul proliferării celulare. Rezultatele sunt prezentate ca % față de control. S-au lucrat două experimente în triplicat. Sunt prezentate rezultatele sub formă de medie \pm D.S. (n=3, x2).

3.4.2.8. Evaluarea migrării celulare – „scratch-wound assay„

Migrarea celulară, evaluată prin testul de zgâriere (scratch-wound assay) (Figura 4.22.), a arătat că proba HM-C s-a comportat similar cu grupul de control, iar spațiul liber de celule s-a închis după 24 h de tratament. Diferența în suprafața acoperită între control și probele HM20-Ag, HM100-Ag și HM0.3-Dox nu a atins semnificație statistică (Figura 4.23.). Cu toate acestea, testul de zgâriere a arătat o creștere a suprafeței acoperite la 24 h pentru celulele tratate cu aceste probe. Deoarece celulele tratate cu proba HM5-Dox s-au desprins în loc să prolifereze și să migreze (cum este vizibil în Figura 22.), suprafața totală acoperită a fost negativă și a fost exclusă din analiză.

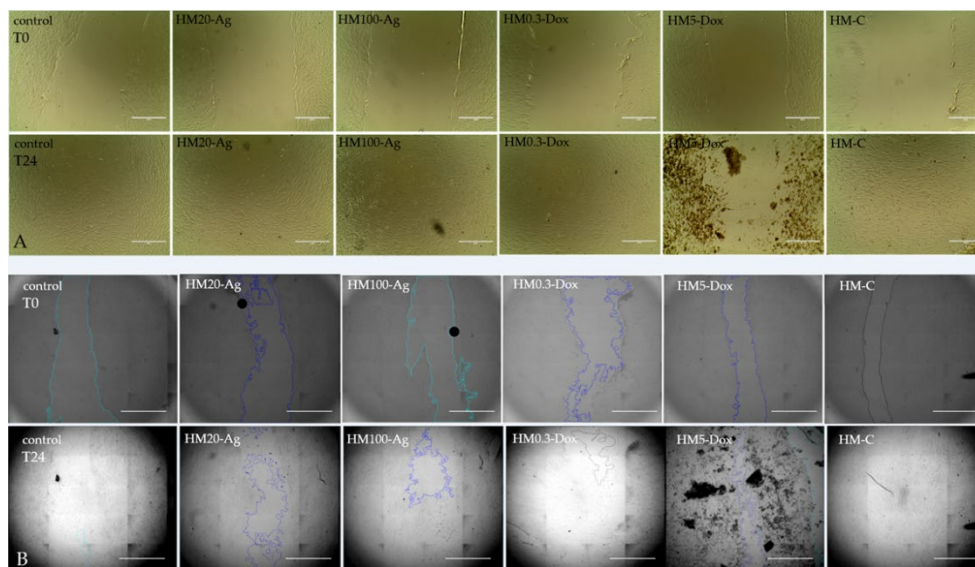


Figura 22. Testul "scratch-wound assay". Fibroblaste umane HS27 au fost crescute până la confluență în 96 de godeuri, s-a practicat o zgârietură în fiecare godeu (T 0, imagini de sus) și s-au tratat cu probe de hidrogel timp de 24 h (T 24, imagini de jos), în triplicat. Panoul A. Detalii privind acoperirea zonei după 24 h de tratament (Evos XL, contrast de fază, 10x, scala 400 μm). Panoul B. Analiza acoperirii zonei a fost efectuată pe întreaga suprafață pentru fiecare godeu, imaginile fiind capturate prin scanare și compunerea a 20 de câmpuri/godeu. Imaginea compozită a fost adnotată și măsurată în programul ImageJ. Imaginile fără marcaje (control T24 și HM-C 24) au acoperit complet zona liberă de celule (Evos FL, scala 2 mm).

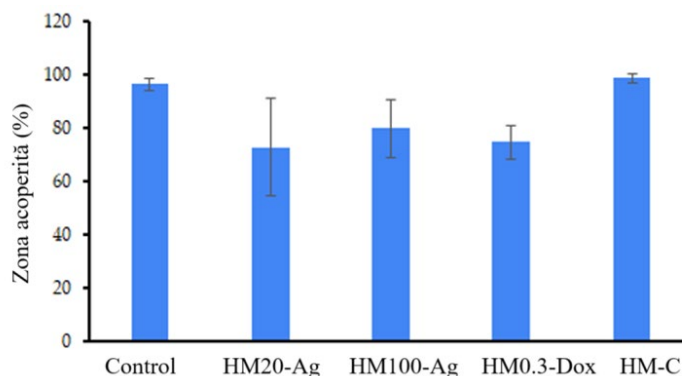


Figura 23. Migrarea celulară. Datele sunt prezentate sub formă de medie ±D.S. (n=3).

3.5. Concluzii de etapă

În cadrul acestui capitol au fost obținute și analizate extensiv **4 noi membrane de hidrogel** pe bază de PVA/alginat/colagen/acid hialuronic și două concentrații de doxiciclină (0.3 mg/mL sau 5 mg/mL) sau nanoparticule de argint de dimensiuni diferite (20 sau 100 nm). Dintre toate probele analizate, proba HM0.3-Dox oferă un echilibru ideal între proprietățile fizico-chimice și biocompatibilitate.

Rezultatele acestui capitol au fost publicate în articolul **Formulation and Comprehensive Evaluation of Biohybrid Hydrogel Membranes Containing Doxycycline or Silver Nanoparticles**, revista *Pharmaceutics*, Volumul 15, Nr 12, 2023, <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15122696>. IF 5.4.

CAPITOLUL 4. DEZVOLTAREA UNOR NOI MEMBRANE DE HIDROGEL CU APLICAȚII ÎN MONITORIZAREA VINDECĂRII RĂNILOR ÎN TIMP REAL

4.1. Scop și obiective

Acest capitol are ca **scop** dezvoltarea de membrane de hidrogel hibride cu aplicații în monitorizarea pH-ului rănilor dermo-epidermice. **Obiectivele** acestui capitol sunt încorporarea cu succes a diferiți indicatori de pH în membranele de hidrogel hibride, studiul influenței indicatorilor de pH asupra proprietăților fizico-chimice, demonstrarea abilității de indicare a schimbării valorii pH-ului dar și studiul viabilității celulare pe culturi celulare tratate cu aceste membrane de hidrogel. Studiile de viabilitate celulară sunt esențiale în cazul unor materiale care intră în contact cu tegumentul lezat, biocompatibilitatea fiind un aspect foarte important. Pentru aceasta s-au utilizat patru indicatori de pH, dintre care doi sintetici (fenolftaleină și albastru de bromtimol) și doi naturali (extract de curcumină și extract de varză roșie). Un alt obiectiv important a fost identificarea indicatorului de pH care, încorporat în membranele de hidrogel, să permită indicarea vizuală a schimbării valorii pH-ului mediului la o valoare optimă pentru aplicații în monitorizarea rănilor și care în același timp să prezinte un impact negativ redus asupra viabilității celulare.

4.2. Materiale și metode de obținere

Materialele utilizate au fost descrise în capitolele anterioare cu mențiunea că s-au utilizat și indicatorii de pH necesari.

Pentru realizarea membranelor de hidrogel care conțin indicatori de pH s-a folosit metoda de obținere descrisă anterior, cu adăugarea și omogenizarea indicatorilor de pH la final.

4.4. Rezultate și Discuții

4.4.1. Influența adăugării de indicatori de pH asupra proprietăților membranelor de hidrogel cu aplicații în monitorizarea vindecării rănilor

- *Analiza caracterelor macroscopice și a pH-ului*

La finalizarea procesului de reticulare în doi pași toate formulările s-au format sub formă de membrană de hidrogel. Acestea au prezentat suprafață netedă și omogenitate, miros caracteristic componentelor și o culoare specifică dată de prezența indicatorului de pH. Greutatea, grosimea și pH-ul probelor analizate au fost conforme.

- *Conținutul de apă*

Conținutul de apă al probelor a variat între 75.11 ± 1.8 și $78.73 \pm 1.23\%$. Analiza statistică a rezultatelor nu a evidențiat diferențe semnificative între probele analizate.

- *Captarea vaporilor de apă*

Capacitatea de captare a vaporilor de apă a fost cuprinsă între 62.4 ± 1.28 și $66.08 \pm 0.8\%$. Analiza rezultatelor obținute nu a evidențiat diferențe semnificative între probele analizate.

- *Gradul de umflare*

Proba BTB a prezentat cel mai performant grad de umflare, cu o valoare maximă de $80.2 \pm 16.7\%$ la 24 h. De remarcat faptul că această probă a prezentat și cel mai scăzut conținut de apă dintre toate probele analizate (Figura 24).

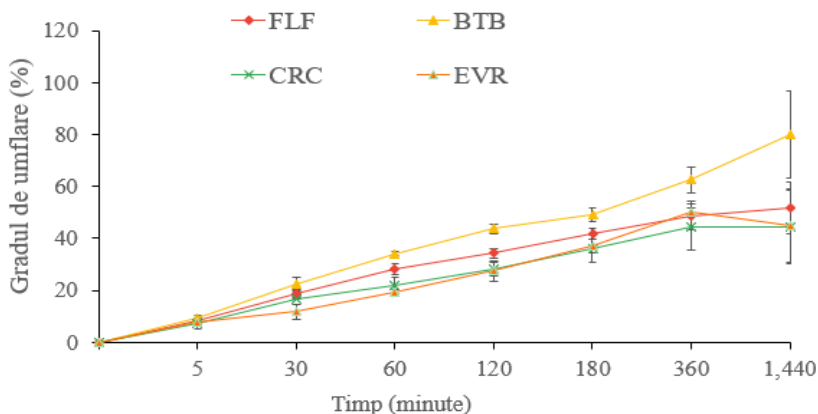


Figura 24. Gradul de umflare a probelor analizate. Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. (n=3).

- *Degradarea hidrolitică*

Pentru toate probele analizate s-a putut observa că există o diferență semnificativă a degradării între 4 h și 20 h ($p < 0.0001$). Astfel, nivelul de degradare este semnificativ mai mare la 20 h comparativ cu nivelul de degradare de la 4 h (Figura 25).

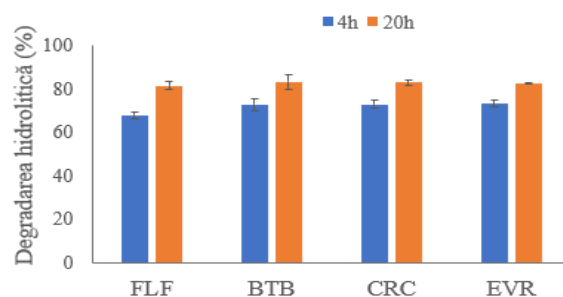


Figura 25. Degradarea hidrolitică a probelor analizate. Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. (n=3).

- Frația de gel

Frația de gel a probelor analizate a variat între 30.18 ± 1.4 și $37.36 \pm 1.14\%$. Proba BTB a prezentat cea mai performantă fracție de gel dintre toate probele analizate.

4.4.2. Abilitatea de indicare a schimbării valorii pH-ului mediului

Pentru a confirma abilitatea de indicare a schimbării culorii în funcție de valoarea pH-ului mediului membranele de hidrogel tăiate sub formă de cerc cu diametrul de 2 cm au fost imersate în lichid de rană simulat cu diferite valori ale pH-ului și au fost lăsate timp de 3 h. După cum se poate vedea în Figura 26 toate probele au prezentat schimbarea culorii la diferite valori ale pH-ului, conform indicatorului utilizat.

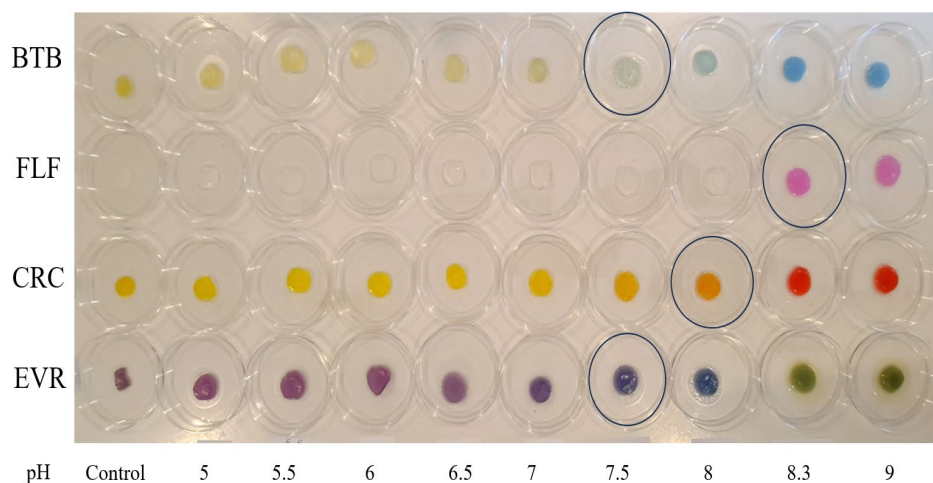


Figura 26. Reprezentare vizuală cu schimbarea culorii membranelor de hidrogel după imersarea în lichid de rană simulat cu diferite valori ale pH-ului. Cercul indică proba care a prezentat cea mai vizibilă schimbare a culorii și implicit valoarea pH-ului la care s-a observat această schimbare.

4.4.3. Explorarea potențialului terapeutic al membranelor de hidrogel cu aplicații în monitorizarea vindecării rănilor

- Activitatea antiinflamatoare

Dintre toate probele analizate BTB a prezentat cea mai bună abilitate de inhibare a denaturării proteinelor, de $34.01 \pm 1.2\%$ (Figura 27).

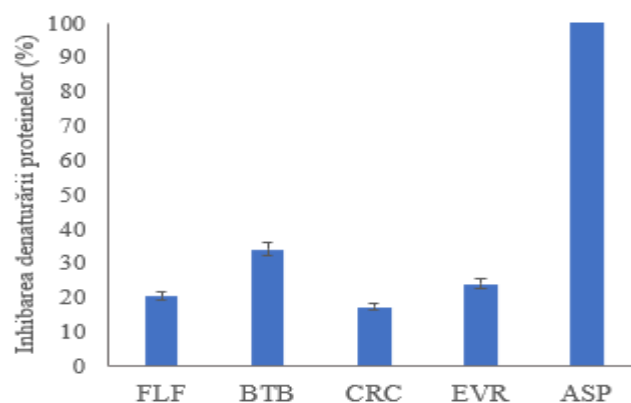


Figura 27. Activitatea antiinflamatoare a probelor analizate. Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. (n=3).

- Activitatea antioxidantă

Activitatea antioxidantă a fost evaluată cu ajutorul DPPH. Dintre toate probele analizate EVR a prezentat cea mai bună activitate antioxidantă, de $92.7 \pm 2.7\%$ (Figura 28).

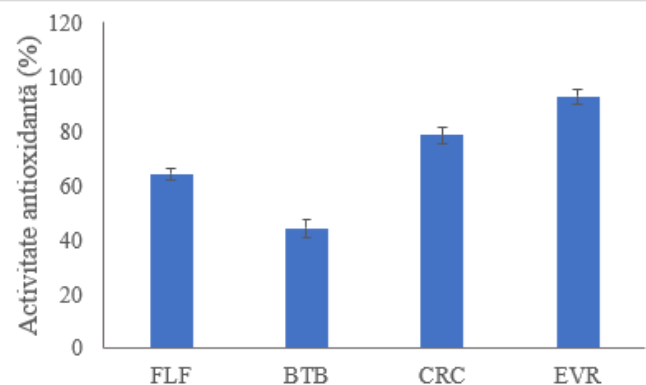


Figura 28. Activitatea antioxidantă a probelor analizate. Datele sunt prezentate sub formă de medie \pm D.S. (n=3).

4.4.4. Analiza viabilității celulare - live/dead assay: selectarea membranelor de hidrogel performante cu aplicații în monitorizarea vindecării rănilor

Analiza viabilității celulare a fost realizată cu ajutorul testului "live/dead assay" ce presupune utilizarea unor coloranți fluorescenți ce colorează celulele viabile cu verde iar celulele neviabile cu roșu [40]. Dintre toate probele analizate, doar pentru probele BTB și CRC au fost observate celule viabile, cu morfologie tipică de fibroblast (Figura 29). În cazul probei FLF deși s-au observat celule vii, morfologia nu a fost la fel de bună ca în cazul celorlalte probe (Figura 29). Celulele tratate cu proba EVR au prezentat cea mai slabă viabilitate. În literatură sunt raportate rezultate similare pentru pansamente care conțin BTB ca indicator de pH [41].

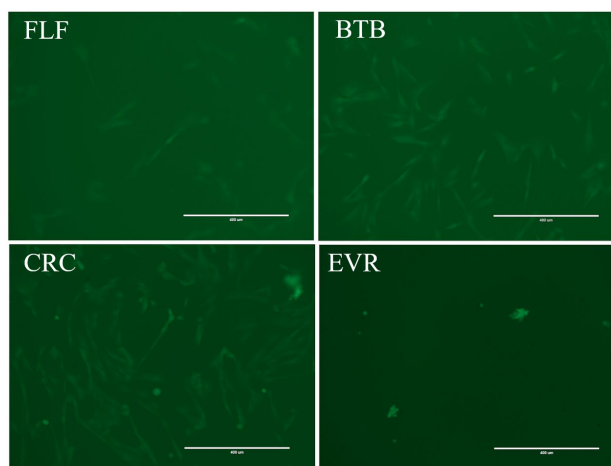


Figura 29. Viabilitatea fibroblastelor din cadrul testului "live/dead assay". Celulele viabile sunt colorate în verde. Maginificare 10 x. Scală 400 μ m.

4.5. Concluzii de etapă

În această etapă au fost realizate **4 noi membrane de hidrogel** ce conțin substanțe naturale (extract de curcumină și varză roșie) sau sintetice (fenolftaleină și albastru de bromtimol) capabile să indice colorimetric schimbarea valorii pH-ului mediului în timp real. Schimbarea culorii poate fi observată vizual, la lumină naturală sau la lumina artificială de intensitate corespunzătoare, fără să fie necesare echipamente auxiliare și cu o instruire minimă a personalului medical sau a pacienților.

Studiile de **viabilitate celulară** au arătat că probele BTB și CRC au cele mai bune performanțe. În cazul probei FLF deși au fost prezente celule vii morfologia acestora nu a fost tipică pentru fibroblaste. Celulele tratate cu proba EVR au prezentat cea mai slabă viabilitate.

CONCLUZII GENERALE

Contribuțiile originale au fost structurate în patru capitole din care se pot formula următoarele **concluzii generale**:

- I. În cadrul acestei lucrări au fost obținute și analizate **peste 50 de membrane de hidrogel** cu aplicații în susținerea proceselor de vindecare, tratamentul și monitorizarea rănilor dermo-epidermice;
- II. Au fost studiați doi agenți plastifianți, glicerol și PEG 200. Glicerolul este cel mai potrivit agent plastifiant pentru metoda de reticulare în doi pași utilizată în cadrul acestei lucrări și contribuie la formarea unor membrane de hidrogel cu o textură ideală pentru tratamentul rănilor dermo-epidermice spre deosebire de PEG 200;
- III. Utilizarea glicerolului ca plastifiant duce la formarea de membrane de hidrogel flexibile, care se adaptează formelor corpului și care oferă o senzație tactilă plăcută;
- IV. Membranele de hidrogel pe bază de alginat și glicerol prezintă caracteristici potrivite pentru utilizarea ca pansamente însă au o rezistență mecanică slabă;
- V. Membranele de hidrogel pe bază de alcool polivinilic și glicerol prezintă o rezistență mecanică foarte bună însă au o capacitate scăzută de umflare ceea ce sugerează ca nu pot absorbi excesul de exudat;
- VI. Creșterea concentrației de glicerol duce la scăderea rezistenței mecanice a membranelor de hidrogel pe bază de alginat sau alcool polivinilic;

- VII. **pH-ul** tuturor membranelor de hidrogel obținute este potrivit aplicațiilor topice;
- VIII. Membranele de hidrogel hibride, pe bază de alginat, alcool polivinilic și glicerol prezintă **proprietăți sinergice și superioare** celor formulate cu un singur polimer;
- IX. Membranele de hidrogel hibride au un grad de umflare superior ceea ce permite **absorbția exudatului în exces** însă în același timp au o rată de degradare optimă care să permită **îndepătrarea atraumatică** a pansamentului și **încorporarea de substanțe bioactive** pentru a fi livrate local;
- X. Adăugarea de substanțe bioactive, în special colagen (COL) și acid hialuronic (HA), a avut o influență semnificativă asupra conținutului de umiditate, fracției de gel, gradului de umflare sau a aspectului morfologic a membranelor de hidrogel biohibride în comparație cu membranele de hidrogel hibride;
- XI. Influența prezenței acidului hialuronic asupra proprietăților membranelor de hidrogel biohibride este dependentă de doză;
- XII. Degradarea enzimatică a membranelor de hidrogel biohibride nu a fost diferită comparativ cu cea a membranelor de hidrogel hibride ceea ce sugerează ca acestea **pot elibera substanțe terapeutice într-o manieră eficientă, neinfluențată de mediul local**;
- XIII. **Permeabilitatea** la vaporii de apă a membranelor de hidrogel biohibride a fost în limitele raportate în literatură și a rămas stabilă pe parcursul a 48 h;
- XIV. Analiza caracteristicilor reologice a relevat că, deși membranele de hidrogel biohibride posedă **proprietăți mecanice adecvate pentru a fi utilizate ca pansamente**, în anumite situații se poate impune necesitatea unui suport adițional;
- XV. Adăugarea de colagen și acid hialuronic a dus la o creștere a abilității de inhibare a denaturării proteinelor (**efect antiinflamator**) în cazul tuturor probelor;
- XVI. Adăugarea unei concentrații ridicate de acid hialuronic duce la scăderea adsorbției de proteine la suprafața membranelor de hidrogel biohibride ceea ce indică o **creștere a biocompatibilității**;
- XVII. O concentrație ridicată de alginat duce la **scăderea efectului citotoxic** al membranelor de hidrogel hibride;
- XVIII. Pentru probele cu o cantitate mai mare de alcool polivinilic adăugarea de colagen și acid hialuronic duce la **scăderea citotoxicității**;
- XIX. Pentru probele cu o cantitate mai mare de alginat adăugarea de colagen și acid hialuronic duce la **creșterea efectului citotoxic**;
- XX. Adăugarea unei concentrații ridicate de doxiciclină (5 mg/mL) duce la **scăderea capacității de absorbție a lichidelor** a membranelor de hidrogel biohibride;
- XXI. Valoarea pH-ului mediului de eliberare a prezentat o **influență minimă asupra eliberării cumulate de doxiciclină** în 24 h;
- XXII. Profilul de eliberare a fost afectat mai mult de concentrația de doxiciclină, care a exercitat și o influență substanțială asupra proprietăților fizico-chimice ale membranelor de hidrogel;
- XXIII. Încorporarea nAg 100 nm a dus la formarea unui hidrogel **considerabil mai rigid** în comparație cu introducerea de nAg 20 nm;
- XXIV. Doxiciclină în doză de 5 mg/mL a dus la **creșterea rigidității membranelor** de hidrogel biohibride în comparație cu dozele mai mici de doxiciclină (0.3 mg/mL);
- XXV. Membranele de hidrogel care conțin doxiciclină în doză mare au demonstrat **proprietăți antioxidante și antiinflamatorii superioare** în comparație cu toate celelalte probe;

- XXVI. Doxiciclina a oferit proprietăți **antibacteriene** excelente membranelor de hidrogel biohibride pentru toate cele șapte tulpini testate;
- XXVII. Dimensiunea zonelor de inhibiție din cadrul testelor de evaluare a activității antibacteriene a fost mai mare în cazul probelor cu o doză mai mare de doxiciclină;
- XXVIII. Membranele de hidrogel care încorporează npAg 100 nm sau doxiciclină în doză de 0.3 mg/mL au demonstrat o **biocompatibilitate excepțională**, dând rezultate bune în ceea ce privește proliferarea și migrarea celulelor;
- XXIX. Membranele de hidrogel hibride care încorporează substanțe care indică vizual, colorimetric, schimbarea valorii pH-ului mediului s-au format cu succes și sunt omogene, cu textură ideală pentru utilizarea ca pansamente;
- XXX. Interacțiunea dintre rețeaua polimerică și indicatorul de pH utilizat este prezentă și nu poate fi neglijată deoarece influențează valoarea pH-ului la care se obține virarea culorii;
- XXXI. **Toate membranele de hidrogel își schimbă culoarea la valori ale pH-ului de peste 7.5** ceea ce le face utile pentru monitorizarea vindecării rănilor;
- XXXII. Membranele de hidrogel hibride care conțin albastru de bromtimol și extract de varză roșie se remarcă prin faptul că reușesc să prezinte virarea culorii exact la valoarea pH-ului de 7.5 ceea ce sugerează că acestea pot să fie deosebit de utile în indicarea precoce a perturbărilor metabolice locale;
- XXXIII. Membranele de hidrogel hibride care conțin albastru de bromtimol prezintă un conținut mai redus de apă, o captare redusă a vaporilor de apă dar are **performanțe superioare** în ceea ce privește gradul de umflare, fracția de gel și activitatea antiinflamatoare comparativ cu celelalte probe;
- XXXIV. Dintre toate probele analizate cele care conțin extract de varză roșie au prezentat cea mai bună **activitate antioxidantă**;
- XXXV. Studiile de **viabilitate celulară** au arătat că probele care conțin albastru de bromtimol și extract de curcumină au cele mai bune performanțe;
- XXXVI. În cazul membranelor de hidrogel hibride care conțin fenolftaleină deși au fost prezente celule vii morfologia acestora nu a fost tipică pentru fibroblaste;
- XXXVII. Celulele tratate cu membrane de hidrogel hibride care conțin extract de varză roșie au prezentat cea mai slabă viabilitate.

În cadrul acestei lucrări au fost formulate, obținute și analizate cu succes **50 de membrane de hidrogel** care încorporează compuși bioactivi, cu activitate antibacteriană sau substanțe care indică schimbarea valorii pH-ului. Studiile realizate reprezintă o contribuție importantă în domeniul dispozitivelor medicale destinate tratamentului și monitorizării proceselor de vindecare ale rănilor dermo-epidermice și demonstrează eficiența unor metode de obținere accesibile și cu impact negativ redus asupra mediului.

Pe baza rezultatelor obținute în cadrul acestei lucrări se pot identifica **direcții viitoare de cercetare**:

- Optimizarea formulărilor cu creșterea proprietăților mecanice pentru a putea fi utilizate și în zonele anatomice supuse unui stres mecanic ridicat;
- Testarea utilizării unui suport pe care membranele de hidrogel să fie fixate pentru o aplicare mai ușoară care să nu necesite utilizarea unui bandaj;
- Testarea riguroasă a caracterelor fizico-chimice prin metode ca difracție de raze X (XDR) sau calorimetrie cu scanare diferențială (DSC);
- Analize suplimentare avansate atât preclinice cât și clinice pentru a evalua eficacitatea terapeutică *in vitro* și *in vivo*.

Bibliografie selectivă

1. Sen, C.K. Human Wound and Its Burden: Updated 2022 Compendium of Estimates. *Adv. Wound Care* **2023**, *12*, 657–670, doi:10.1089/wound.2023.0150.
2. Olsson, M.; Järbrink, K.; Divakar, U.; Bajpai, R.; Upton, Z.; Schmidtchen, A.; Car, J. The Humanistic and Economic Burden of Chronic Wounds: A Systematic Review. *Wound Repair Regen.* **2019**, *27*, 114–125, doi:10.1111/wrr.12683.
3. Winter, G.D.; Scales, J.T. Effect of Air Drying and Dressings on the Surface of a Wound. *Nature* **1963**, *197*, 91–92, doi:10.1038/197091b0.
4. Winter, G.D. Formation of the Scab and the Rate of Epithelization of Superficial Wounds in the Skin of the Young Domestic Pig. *Nature* **1962**, *193*, 293–294, doi:10.1038/193293a0.
5. Hinman, C.D.; Maibach, H. Effect of Air Exposure and Occlusion on Experimental Human Skin Wounds. *Nature* **1963**, *200*, 377–378, doi:10.1038/200377a0.
6. Schoukens, G. - Bioactive Dressings to Promote Wound Healing. In *Advanced Textiles for Wound Care*; Rajendran, S., Ed.; Woodhead Publishing Series in Textiles; Woodhead Publishing, 2009; pp. 114–152 ISBN 978-1-84569-271-1.
7. Adis Medical Writers Select Appropriate Wound Dressings by Matching the Properties of the Dressing to the Type of Wound. *Drugs Ther. Perspect.* **2014**, *30*, 213–217, doi:10.1007/s40267-014-0125-5.
8. Boateng, J.; Catanzano, O. Advanced Therapeutic Dressings for Effective Wound Healing--A Review. *J. Pharm. Sci.* **2015**, *104*, 3653–3680, doi:10.1002/jps.24610.
9. Sinha, M.; Banik, R.M.; Haldar, C.; Maiti, P. Development of Ciprofloxacin Hydrochloride Loaded Poly(Ethylene Glycol)/Chitosan Scaffold as Wound Dressing. *J. Porous Mater.* **2013**, *20*, 799–807, doi:10.1007/s10934-012-9655-1.
10. Djekic, L.; Martinović, M.; Ćirić, A.; Fraj, J. Composite Chitosan Hydrogels as Advanced Wound Dressings with Sustained Ibuprofen Release and Suitable Application Characteristics. *Pharm. Dev. Technol.* **2020**, *25*, 332–339, doi:10.1080/10837450.2019.1701495.
11. Kanaan, A.F.; Piedade, A.P.; de Sousa, H.C.; Dias, A.M.A. Semi-Interpenetrating Chitosan/Ionic Liquid Polymer Networks as Electro-Responsive Biomaterials for Potential Wound Dressings and Iontophoretic Applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2021**, *121*, 111798, doi:10.1016/j.msec.2020.111798.
12. Menéndez-Menéndez, Y.; Alvarez-Viejo, M.; Ferrero-Gutierrez, A.; Perez-Basterrechea, M.; Perez Lopez, S.; Escudero, D.; Otero, J. Adult Stem Cell Therapy in Chronic Wound Healing. *J. Stem Cell Res. Ther.* **2014**, *4*.
13. Dhivya, S.; Padma, V.V.; Santhini, E. Wound Dressings – a Review. *BioMedicine* **2015**, *5*, 22, doi:10.7603/s40681-015-0022-9.
14. Uzun, M. A Review of Wound Management Materials. *J. Text. Eng. Fash. Technol.* **2018**, *4*, doi:10.15406/jteft.2018.04.00121.
15. Nischwitz, S.P.; Bernardelli de Mattos, I.; Hofmann, E.; Groeber-Becker, F.; Funk, M.; Mohr, G.J.; Branski, L.K.; Mautner, S.I.; Kamolz, L.P. Continuous pH Monitoring in Wounds Using a Composite Indicator Dressing - A Feasibility Study. *Burns J. Int. Soc. Burn Inj.* **2019**, *45*, 1336–1341, doi:10.1016/j.burns.2019.02.021.
16. Zhang, X.; Lv, R.; Chen, L.; Sun, R.; Zhang, Y.; Sheng, R.; Du, T.; Li, Y.; Qi, Y. A Multifunctional Janus Electrospun Nanofiber Dressing with Biofluid Draining, Monitoring, and Antibacterial Properties for Wound Healing. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2022**, *14*, 12984–13000, doi:10.1021/acsmi.1c22629.
17. Marks, H.L.; Cook, K.; Roussakis, E.; Cascales, J.P.; Korunes-Miller, J.T.; Grinstaff, M.W.; Evans, C.L. Quantitative Luminescence Photography of a Swellable Hydrogel Dressing with a Traffic-Light Response to Oxygen. *Adv. Healthc. Mater.* **2022**, *11*, e2101605, doi:10.1002/adhm.202101605.
18. Mostafalu, P.; Lenk, W.; Dokmeci, M.R.; Ziaie, B.; Khademhosseini, A.; Sonkusale, S.R. Wireless Flexible Smart Bandage for Continuous Monitoring of Wound Oxygenation. *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.* **2015**, *9*, 670–677, doi:10.1109/TBCAS.2015.2488582.
19. McColl, D.; Cartlidge, B.; Connolly, P. Real-Time Monitoring of Moisture Levels in Wound Dressings in Vitro: An Experimental Study. *Int. J. Surg. Lond. Engl.* **2007**, *5*, 316–322, doi:10.1016/j.ijsu.2007.02.008.
20. ElSaboni, Y.; Hunt, J.A.; Stanley, J.; Moffatt, C.; Wei, Y. Development of a Textile Based Protein Sensor for Monitoring the Healing Progress of a Wound. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 7972, doi:10.1038/s41598-022-11982-3.
21. Guo, M.; Wang, Y.; Gao, B.; He, B. Shark Tooth-Inspired Microneedle Dressing for Intelligent Wound Management. *ACS Nano* **2021**, *15*, 15316–15327, doi:10.1021/acsnano.1c06279.

22. Zhang, L.; Ji, Z. Preliminary Study on the New Wound Monitoring Technology Using Co-Planar Waveguide Sensor: Modeling and Simulation. *Technol. Health Care Off. J. Eur. Soc. Eng. Med.* **2021**, *29*, 463–473, doi:10.3233/THC-218044.
23. Farrow, M.J.; Hunter, I.S.; Connolly, P. Developing a Real Time Sensing System to Monitor Bacteria in Wound Dressings. *Biosensors* **2012**, *2*, 171–188, doi:10.3390/bios2020171.
24. Darkovich, S.L.; Brown-Etris, M.; Spencer, M. Biofilm Hydrogel Dressing: A Clinical Evaluation in the Treatment of Pressure Sores. *Ostomy. Wound Manage.* **1990**, *29*, 47–60.
25. Jones, V.; Grey, J.E.; Harding, K.G. Wound Dressings. *BMJ* **2006**, *332*, 777–780, doi:10.1136/bmj.332.7544.777.
26. Kaya, A.Z.; Turani, N.; Akyüz, M. The Effectiveness of a Hydrogel Dressing Compared with Standard Management of Pressure Ulcers. *J. Wound Care* **2005**, *14*, 42–44, doi:10.12968/jowc.2005.14.1.26726.
27. Laurano, R.; Boffito, M.; Ciardelli, G.; Chiono, V. Wound Dressing Products: A Translational Investigation from the Bench to the Market. *Eng. Regen.* **2022**, *3*, 182–200, doi:10.1016/j.engreg.2022.04.002.
28. Pirone, L.A.; Bolton, L.L.; Monte, K.A.; Shannon, R.J. Effect of Calcium Alginate Dressings on Partial-Thickness Wounds in Swine. *J. Investig. Surg. Off. J. Acad. Surg. Res.* **1992**, *5*, 149–153, doi:10.3109/08941939209012431.
29. Zarrintaj, P.; Moghaddam, A.S.; Manouchehri, S.; Atoufi, Z.; Amiri, A.; Amirkhani, M.A.; Nilforoushzadeh, M.A.; Saeb, M.R.; Hamblin, M.R.; Mozafari, M. Can Regenerative Medicine and Nanotechnology Combine to Heal Wounds? The Search for the Ideal Wound Dressing. *Nanomed.* **2017**, *12*, 2403–2422, doi:10.2217/nnm-2017-0173.
30. Bashir, S.; Hina, M.; Iqbal, J.; Rajpar, A.H.; Mujtaba, M.A.; Alghamdi, N.A.; Wageh, S.; Ramesh, K.; Ramesh, S. Fundamental Concepts of Hydrogels: Synthesis, Properties, and Their Applications. *Polymers* **2020**, *12*, 2702, doi:10.3390/polym12112702.
31. Kumar, A.C.; Erothu, H. Synthetic Polymer Hydrogels. In *Biomedical Applications of Polymeric Materials and Composites*; John Wiley & Sons, Ltd, 2016; pp. 141–162 ISBN 978-3-527-69091-6.
32. Arafa, A.A.; Nada, A.A.; Ibrahim, A.Y.; Sajkiewicz, P.; Zahran, M.K.; Hakeim, O.A. Preparation and Characterization of Smart Therapeutic pH-Sensitive Wound Dressing from Red Cabbage Extract and Chitosan Hydrogel. *Int. J. Biol. Macromol.* **2021**, *182*, 1820–1831, doi:10.1016/j.ijbiomac.2021.05.167.
33. Wiegand, C.; Tittelbach, J.; Hipler, U.-C.; Elsner, P. Clinical Efficacy of Dressings for Treatment of Heavily Exuding Chronic Wounds. *Chronic Wound Care Manag. Res.* **2015**, *2*, 101–111, doi:10.2147/CWCMR.S60315.
34. Stan, D.; Codrici, E.; Enciu, A.-M.; Olewnik-Kruszkowska, E.; Gavril, G.; Ruta, L.L.; Moldovan, C.; Brincoveanu, O.; Bocancia-Mateescu, L.-A.; Mirica, A.-C.; et al. Exploring the Impact of Alginate—PVA Ratio and the Addition of Bioactive Substances on the Performance of Hybrid Hydrogel Membranes as Potential Wound Dressings. *Gels* **2023**, *9*, 476, doi:10.3390/gels9060476.
35. Jao, W.-C.; Chen, H.-C.; Lin, C.-H.; Yang, M.-C. The Controlled Release Behavior and pH- and Thermo-Sensitivity of Alginate/Poly(Vinyl Alcohol) Blended Hydrogels. *Polym. Adv. Technol.* **2009**, *20*, 680–688, doi:10.1002/pat.1318.
36. Peppas, N.A.; Scott, J.E. Controlled Release from Poly (Vinyl Alcohol) Gels Prepared by Freezing-Thawing Processes. *J. Controlled Release* **1992**, *18*, 95–100, doi:10.1016/0168-3659(92)90178-T.
37. Nuutila, K.; Eriksson, E. Moist Wound Healing with Commonly Available Dressings. *Adv. Wound Care* **2021**, *10*, 685–698, doi:10.1089/wound.2020.1232.
38. Wu, P.; Nelson, E.A.; Reid, W.H.; Ruckley, C.V.; Gaylor, J.D. Water Vapour Transmission Rates in Burns and Chronic Leg Ulcers: Influence of Wound Dressings and Comparison with in Vitro Evaluation. *Biomaterials* **1996**, *17*, 1373–1377, doi:10.1016/0142-9612(96)87277-2.
39. Yusof, N.; Wee, A.; Lim, L.; Khor, E. Flexible Chitin Films as Potential Wound-Dressing Materials: Wound Model Studies. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2003**, *66*, 224–232, doi:10.1002/jbm.a.10545.
40. Preda, P.; Enciu, A.-M.; Tanase, C.; Dudau, M.; Albuiescu, L.; Maxim, M.-E.; Darie-Nita, R.; Brincoveanu, O.; Avram, M. Assessing Polysaccharides/Aloe Vera–Based Hydrogels for Tumor Spheroid Formation. *Gels* **2023**, *9*, 51, doi:10.3390/gels9010051.
41. Brooker, C.; Tronci, G. A Collagen-Based Theranostic Wound Dressing with Visual, Long-Lasting Infection Detection Capability. *Int. J. Biol. Macromol.* **2023**, *236*, 123866, doi:10.1016/j.ijbiomac.2023.123866.