



(12)

BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2008 00539**

(22) Data de depozit: **14.07.2008**

(45) Data publicării mențiunii acordării brevetului: **28.01.2011** BOPI nr. 1/2011

(41) Data publicării cererii:
28.11.2008 BOPI nr. 11/2008

(73) Titular:
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI, NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **LUNGU MARIA, ȘOSEAUA MIHAI BRAVU,
NR. 116, BL. D5, AP. 37, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **MOLDOVAN LUCIA,
BD. CONSTRUCTORILOR, NR. 24, BL. 19,
SC. A, AP. 13, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;**

• **CRĂCIUNESCU OANA,
BD. NICOLAE GRIGORESCU, NR. 33,
BL. A1, SC. 3, AP. 33, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;**
• **ZĂRNESCU OTILIA,
BD. IULIU MANIU, NR. 59, BL. 10, SC. 1,
AP. 17, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **VASILE CORNELIA, STR. PANTELIMON,
NR. 29, BL. 308, SC. A, ET. 3, AP. 12, IAȘI,
IS, RO**

(56) Documente din stadiul tehnicii:
WO 2007136227 (A1); WO 03053490 (A1)

(54) COMPOZIȚIE DE MATERIAL BIOCOMPATIBIL ȘI PROCEDEU DE OBTINERE A ACESTEIA

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o compoziție de material biocompatibil și la un procedeu de obținere a acesteia. Compoziția de material biocompatibil este un amestec de poliuretan și colagen (PU + HC); poliuretan, colagen și elastină (PU + HC + EL); poliuretan, colagen, elastină și acid hialuronic (PU + HC + EL + HA); poliuretan, colagen, elastină și condroitin sulfat (PU + HC + EL + CS), care au o bună prelucrabilitate prin turnare și extrudare, și o biocompatibilitate ridicată, fiind destinate producerii de dispozitive medicale (sonde urinare, tubulatură pentru pompele peristaltice, perfuzoare,

branule etc.). Procedeu de obținere a compoziției biocompatibile, conform invenției, constă în introducerea compușilor solizi (polimerii naturali) într-o soluție de poliuretan în dimetilformamidă, la temperatura de 60...70°C, și eliminarea solventului. Procedeu este simplu, nu necesită utilizarea unor instalații complexe și utilizează substanțe accesibile.

Revendicări: 3
Figuri: 13



RO 123177 B1

1 Prezenta invenție se referă la o compoziție de material biocompatibil, folosit ca
2 material cu biocompatibilitate ridicată, pentru obținerea de dispozitive medicale (sonde
3 urinare, tubulatură pentru pompele peristaltice etc.), și la un procedeu de obținere a acestei
4 compoziții.

5 Se cunosc compoziții polimerice biocompatibile, obținute din amestecuri de polimeri
6 sintetici și polimeri naturali, ca, de exemplu, impregnarea protezelor vasculare aortice din
7 poliamida 6 cu colagen (De Mol, J.C.A., *Jurnal of vascular Surgery*, 59-66, ian. 1991).

8 Se cunoaște utilizarea colagenului sub formă nativă sau parțial denaturat, simplu sau
9 asociat cu polimeri sintetici, la realizarea unor biomateriale cum sunt protezele de tendon
(Yasui P., Koto B. S., *J of Bone and Joint Surgery*, 73, 4 p. 561 (1991)), implante pentru
10 regenerarea osului (Joos U., Ochs G., Ries P.E., *Biomaterials*, 1, 23, 1990), grefe arteriale
11 (Soldani G., Mercogliano R., *Biomaterials*, 14, 5 p. 295, 1998).

12 Copolimerii poliuretani sunt utilizați pe scară largă la obținerea unor dispozitive
13 medicale care vin în contact cu sângele și diferite organe, datorită proprietăților mecanice
14 și unei compatibilități relativ bune. Se cunosc produse pe bază de PU comercializate sub
15 denumirile de Biomer, Pellethane și Metathane, utilizate la obținerea de valve cardiace,
16 proteze ortopedice (M Lupu et al, *J. Macromol. Sci. B. Physics*, 45, 395, 2006) etc.

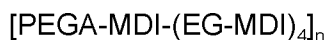
17 Sunt cunoscute, de asemenea, metode de îmbunătățire a biocompatibilității PU prin
18 acoperirea sau amestecarea cu polimeri naturali, de tipul proteinelor precum colagenul
(Guan J. et al, *Cell Transplantation*, 15, S17, 2006), peptidelor sau anticorpi (brevet
19 **USA 2007 7156232**).

20 Se cunoaște utilizarea unor biopolimeri precum colagenul, elastina sau fibrina, pentru
21 bioactivarea polimerilor sintetici, având ca efect îmbunătățirea proprietăților biologice ale
22 polimerilor sintetici, creșterea timpului de contact cu sângele și țesuturile (Pieper J.S. et al,
23 *Biomaterials*, 23, 3183, 2002) și (Badylok S.F., *Biomaterials*, 28, 3587, 2007).

24 Problema pe care o rezolvă invenția este obținerea unei compoziții din amestec de
25 poliuretan cu agenți de bioactivare, în mai multe variante, realizat printr-un procedeu cu
26 parametri adecvați componentelor constitutive, din care rezultă un produs cu biocompati-
27 bilitate și elasticitate ridicate, apt de a fi utilizat la obținerea de dispozitive medicale precum
28 sonde urinare, tubulatură pentru pompele peristaltice, perfuzoare, branule etc.

29 Compoziția de material biocompatibil pe bază de poliuretan, conform invenției, este
30 constituită din: 89...91% poliester-uretan (PU), 8...10% colagen (HC), 0,8...1,6% elastină
31 (EL) și agenți de bioactivare cu caracter antiinflamator și de regenerare a țesuturilor, aleși
32 dintre 0,01...0,02% acid hialuronic (HA) și 0,01...0,02% condroitin sulfat (CS).

33 Poliester-uretanul are următoarea structură:



34 unde:

35 - PEGA este poli (etilenglicol) adipat: $\text{HO}-[(\text{CH}_2-\text{OCO}-(\text{CH}_2)_4-\text{oco}]_n--(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ și
36 $n = 10,3$;

37 - MDI este 4,4 metil difenil diizocianat: $\text{OCN}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NCO}$;

38 - EG este etilen glicol: $\text{HO}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ cu masa moleculară $M=139250$.

39 Procedeu de obținere a unei compoziții de material biocompatibil conform invenției
40 constă în aceea că se dizolvă pulbere de poliuretan în DMF la temperatura de 60°C, pentru
41 obținerea unei soluții de 60...70% poliuretan, la care se adaugă colagenul, elastina și agenții
42 de bioactivare, în proporții corespunzătoare, când se formează un amestec sub formă de clei
43 brun, cu separare de faze, se continuă încălzirea până la 75°C, pentru omogenizare, se depune
44 soluția pe plăci de sticlă, pentru evaporarea DMF la temperatura camerei, obținându-se un
45 film compozit poliuretanic, cu grosime de 0,5...1 mm, care se mențin în etuvă la temperatura
46 de 45°C, timp de 15 h, și la vid, timp de 55 h, după care filmul se desprinde de pe plăci și se
47 usucă timp de 72 h în etuvă cu vid înalt, până la evaporarea totală a solventului.

RO 123177 B1

Avantajele aplicării compoziției conform invenției sunt următoarele:	1
- materialele polimerice sunt stabile în timp și nu creează sensibilizare la locul aplicării;	3
- materialele sunt biocompatibile, elastice și pot fi utilizate la realizarea unor dispozitive medicale de tipul pompelor peristaltice, care preiau funcția inimii în timpul intervențiilor chirurgicale pe cord deschis;	5
- procedeul de obținere este fezabil și nu necesită instalații și aparatură cu grad ridicat de complexitate.	7
Se prezintă în continuare o descriere în detaliu a invenției, cu referire la exemplele de realizare și rezultatele testelor de laborator efectuate pe produse realizate din compoziția conform invenției.	9
Polimerii naturali prezintă o bioactivitate ridicată, care include creșterea și adeziunea celulelor, afinitate mare pentru moleculele de adeziune celulară și factorii de creștere, biodegradabilitate în prezența enzimelor.	13
Amestecurile de poliuretan și polimeri naturali (colagen, elastină, acid hialuronic și condroitin sulfat), conform invenției, sunt materiale biocompatibile, netoxice, conținând următorii componenți luați în părți în greutate:	15
- 1000 părți în greutate poliuretan, care este o pulbere albă, solubilă în dimetil formamidă (DMF) și având următoarea structură:	17
$[PEGA-MDI-(EG-MDI)_4]_n$	19
unde:	21
PEGA este poli (etilenglicol) adipat: $HO-[(CH_2-OCO-(CH_2)_4-oco]_n--(CH_2)_2-OH$ și $n = 10,3$;	23
MDI este 4,4 metil difenil diizocianat: $OCN-C_6H_4-NCO$;	25
EG este etilen glicol: $HO-(CH_2)_2-OH$, cu masa moleculară $M = 139250$;	25
- 100 părți în greutate colagen hidrolizat în mediu acid, timp de 4 h, cu masa moleculară cuprinsă între 7000...15000 D;	27
- 10 părți în greutate elastină, cu masa moleculară cuprinsă între 16000...120000 D;	29
- 1 parte în greutate acid hialuronic, cu masa moleculară de 50000...250000 D;	29
- 1 parte în greutate condroitin sulfat, cu masa moleculară de 10000...30000 D.	31
Procedeul de obținere a amestecurilor, conform invenției, constă în dizolvarea pulberii de poliuretan în DMF la 60°C, obținându-se o soluție de 60...70% poliuretan, la care se adaugă polimerii naturali în proporțiile arătate mai sus, obținându-se amestecuri sub formă de clei brun, ce prezintă separare de faze. Se continuă încălzirea până la 75°C, pentru omogenizarea soluției.	33
Soluțiile omogenizate prin creșterea temperaturii sunt depuse pe plăci de sticlă, iar prin evaporarea DMF la temperatura camerei, se obțin filme cu grosimea de 0,5...1 mm. Acestea se usucă timp de 72 h, într-o etuvă cu vid înalt, până la evaporarea totală a solventului. Dispariția totală a DMF este evidențiată prin spectroscopie în infraroșu, cu transformată Fourier (FT IR).	35
Materialele astfel obținute (înainte de îndepărtarea solventului) pot fi folosite la obținerea unor tuburi sau repere cu diferite forme, ce intră în componența unor dispozitive medicale, utilizându-se procedeul tehnologic de formare prin turnare sau cel de extrudare.	37
În continuare se dau 4 exemple de realizare a compoziției conform invenției, în legătură cu fig. 1...13, ce reprezintă:	39
- fig. 1, imagine de ESEM reprezentând morfologia suprafeței variantelor de PU amestecat cu CH (A), CH-EL (B), CH-EL-AH (C) și CH-EL-CS (D);	41
- fig. 2, spectrul IR-ATR al poliuretanului;	43
	45
	47

RO 123177 B1

- 1 - fig. 3, spectrele FT-IR-ATR ale amestecurilor;
- fig. 4, curbele DSC ale amestecurilor de PU/HC cu adaos de elastină, acid
3 hialuronic și condroitin sulfat;
- fig. 5, curbele TG/DTG ale sistemului PU;
5 - fig. 6, curbele TG/DTG ale sistemului PU/HC;
- fig. 7, curbele TG/DTG ale sistemului PU/HC/KEL;
7 - fig. 8, curbele TG/DTG ale sistemului PU/HC/KEL/HA;
- fig. 9, curbele TG/DTG ale sistemului PU/HC/KEL/CS;
9 - fig. 10, fibroblaste dermale, cultivate pe suprafața amestecurilor de PU+CH (A),
PU+CH+EL (B), PU+CH+EL+AH (C) și PU+CH+EL+CS (D);
11 - fig. 11, gelatin zimografie;
- fig. 12, variație MMP9 și MMP2 pentru martorii corespunzători celor trei timpi;
13 - fig. 13, etapele de realizare a amestecurilor pe bază de poliuretan.

Exemplul 1. Se introduc, într-un vas de sticlă de 1000 ml, 250...500 g poliuretan (PU), care se dizolvă în 167...333 g DMF. Se încălzește amestecul pe baie de apă la 60°C și se adaugă 25...50 g de colagen hidrolizat (HC). Se formează un clei, în care PU se separă pe fundul vasului. Se continuă încălzirea până la 75°C, când compoziția devine monofazică. Se depune compoziția pe o placă de sticlă cu dimensiunile de 200 x 200 mm. Prin răcirea compoziției la temperatura camerei se obțin filme (plăci) cu grosimea de 0,5...1 mm. Plăcile sunt introduse într-o etuvă cu vid înalt, la temperatura de 45...50°C, timp de 72 h, pentru îndepărtarea completă a solventului. Se determină eliminarea solventului prin spectroscopie FT IR. Se obțin filme cu grosimea de 0,08...0,5 mm.

Exemplul 2. Se procedează ca în exemplul 1, adăugându-se, împreună cu colagenul hidrolizat HC, și 2,5...5 g elastină (EL).

Exemplul 3. Se procedează ca în exemplele 1 și 2, adăugându-se și 0,25...0,5 g de acid hialuronic (HA).

Exemplul 4. Se procedează ca în exemplele 1 și 2, adăugându-se și 0,25...0,5 g de condroitin sulfat (CS).

Filmele obținute conform exemplelor de mai sus au fost testate, din punct de vedere al morfologiei, prin examinare la un microscop electronic cu baleiaj, al compoziției, prin spectroscopie FT IR, al compatibilității componentelor, prin calorimetrie diferențială DSC și termogravimetrie TG-DTG. Biocompatibilitatea compozițiilor a fost testată *in vitro*, prin determinarea citotoxicității pe linii celulare stabilizate, și *in vivo*, prin teste de implant.

Determinări de morfologie - microscopie SEM

Variantele realizate de PU biocompatibilizat prin amestecare cu CH, EL și polizaharide au fost analizate, din punct de vedere morfologic, prin examinare la un microscop electronic de baleiaj ESEM, XL 30, FEI, Philips. Metoda de prelucrare a probelor a fost în modul vid scăzut și apoi au fost vizualizate și fotografiate atât în secțiune transversală, cât și pe suprafață.

Pentru probele de biopolimeri obținuți prin amestecarea polimerului sintetic PU cu variantele de polimeri naturali, au fost achiziționate imagini de SEM ale suprafeței (fig. 1A-D).

Pe suprafața probei PU-CH (fig. 1A) se observă pori care, în plan, au forme geometrice care se apropie suficient de mult de patrulatere sau triunghiuri a căror arie medie este de 1,73 μm^2 . În spațiu sunt de formă prismatică.

Pe suprafața probei PU-CH-EL se disting două zone cu morfologie complet diferită. Sunt zone ale căror suprafețe medii sunt de aproximativ 16.000 μm^2 , în care se disting zone întinse cu pori cu dimensiuni medii de aproximativ 20 μm^2 , și altele cu pori cu dimensiuni submicronice.

RO 123177 B1

Pe suprafața probei PU-CH-EL-AH se disting zone sub formă de cuiburi, care sunt acoperite cu fibre sub formă de țesătură. Aceste zone au o arie medie de aproximativ 26.000 μm^2 . Pe marea majoritate a suprafeței probei se disting particule de forme poliedrice, a căror suprafață medie este de 8,46 μm .

Spectroscopie FT-IR

Spectrele FT-IR au fost înregistrate pe filme subțiri, prin metoda ATR (reflexie totală atenuată), cu ajutorul unui spectrometru FT-IR DIGILAB, Scimitar Series (USA), cu o rezoluție de 4 cm^{-1} . Grosimea filmelor a fost de ordinul zecilor de μm . S-a utilizat un cristal de SeZn cu indicele de refracție 2,4. Pentru fiecare probă s-au făcut un număr de 5 spectre, care s-au mediat, iar pentru fiecare spectru s-au realizat 25 de scanări. Prelucrarea spectrelor s-a făcut utilizând programul Grams/32 (Galactic Industry Corporation).

În fig. 2 este prezentat spectrul FT-IR - ATR al poliuretanului.

Prin adăugarea celorlalte componente ale amestecurilor, se evidențiază modificări spectrale deosebite în regiunea 1500-1800 cm^{-1} (fig. 3). Astfel, prin adăugarea CH se observă apariția unei benzi la 1655 cm^{-1} , bandă care lipsește în spectrul poliuretanului. Prin adăugarea kEL se evidențiază o creștere semnificativă a benzii de la 1655 cm^{-1} (prin contribuția grupelor amidă I), și o unire a acesteia cu banda de la 1600 cm^{-1} , aceasta din urmă apărând ca un umăr. În cazul amestecului conținând HA, se observă că cele două benzi apar din nou ca două benzi distincte, având aproximativ aceeași intensitate. În cazul adăugării CS, cele două benzi apar distincte, intensitatea benzii de la 1655 fiind mult mai mică decât cea corespunzătoare benzii de la 1600 cm^{-1} . În acest din urmă caz spectrul are un aspect asemănător cu cel care conține doar PU și CH.

Calorimetria Diferențială prin Scanare (DSC)

DSC s-a efectuat cu un aparat Pyris Diamond (Perkin Elmer). Probele cu masă de 6-8 mg au fost plasate în creuzete de aluminiu. Curbele DSC au fost înregistrate în atmosferă de azot (debit 20 mL/min), la o viteză de încălzire de 20°C/min. Punctul de inflexiune al curbei sub formă de S a fost luat ca temperatura de tranziție sticloasă T_g . Domeniul de temperatură pe care s-a efectuat înregistrarea a fost de -60...245°C. S-au efectuat câte două cicluri de încălzire-răcire pentru fiecare probă. Drept referință s-a folosit indiu cu puritate mai mare de 98%, care are temperatura de topire de 156,68°C și entalpia de topire de 28,4 J/g.

Curbele DSC pentru două grupe de probe sunt date în fig. 4.

Din curbele DSC s-au determinat temperaturile de tranziție sticloasă (T_g), diferența între capacitatea calorică înainte și după tranziția sticloasă (ΔC_p), temperatura de cristalizare la rece (T_{cc}) și temperaturile de topire (T_m).

Datele obținute din curbele prezente în fig. 4 sunt sumarizate în tabelul 1.

Tabelul 1

Proprietățile termice ale amestecurilor studiate, determinate prin DSC

Proba	T_g (°C)	$\square c_p$ (J/g K)	T_{ms} (°C)	$\square H_{ms}$ (J/g)	T_{mh} (°C)	$\square H_{mh}$ (J/g)
PU	- 24,56	0,180	54,2	2,20	220,10	2,614
PU + HC	- 25,06	0,169	73,53	1,836	222,42	5,293
PU + HC + kEL soluție apoasă	- 25,56	0,229	80,12	2,896	235,83	-
PU + HC + HA	- 24,67	0,234	79,71	6,24	219,88	8,729
PU + HC+CS	- 26,34	0,221	81,95	8,176	223,96	9,282

RO 123177 B1

1 Datele obținute sunt în concordanță cu cele din literatură, separare în două faze, la
120°C.

3 Termogravimetria (TG/DTG)

5 Curbele termogravimetrice (TG) și derivatele lor (DTG) au fost înregistrate cu un
derivatograf Paulik-Paulik-Erdey, MOM-Budapesta - Ungaria, în următoarele condiții: probele
7 au fost sub formă de filme, masa probei 50 mg, viteza de încălzire (β) 12°C min⁻¹, regiunea
de temperatură 25-600°C, creuzetele pentru probe au fost din platină, debit de aer 30 cm³
9 min⁻¹. Pentru fiecare probă s-au înregistrat două curbe. Viteza de încălzire reală s-a evaluat
din curbele temperatură-timp; valoarea (β) calculată s-a folosit ulterior în evaluarea para-
11 metrilor cinetici. Pe fiecare curbă s-au efectuat 2-3 citiri repetate ale punctelor (temperatură,
pierdere de masă), fiecare citire având minimum 15 puncte. Pentru fiecare stadiu din curbele
13 TG s-au determinat următoarele caracteristici termice: temperatura de început a pierderii de
masă (T_i); temperatura corespunzătoare maximului pierderii de masă (T_M) și cea de sfârșit
15 a procesului (T_f) (erorile în determinarea temperaturii sunt de $\pm 2^\circ\text{C}$), pierderea de masă (Δw ,
eroare $\pm 1\%$) și parametrii cinetici globali, ca energia de activare E_a (eroare de determinare
 $\pm 10...15$ kJ/mol).

17 Comportarea la descompunere termică a poliuretanilor este puternic dependentă de
compoziția lor. Curbele DTG sunt complexe, prezentând mai multe picuri ale căror
19 temperaturi caracteristice variază cu compoziția poliuretanului. Primul pic se situează la
aproximativ 220°C, iar cel de-al doilea la 350°C.

21 Analiza cinetică a datelor TG s-a efectuat prin metoda curbei unice, folosind atât
metode integrale Coats-Redfern, cât și diferențiale Swaminathan-Madhavan. Indicele pentru
23 fiecare parametru cinetic global, și anume, energie de activare (E), pre-factor exponențial (A)
și ordin de reacție (n), indică metoda de evaluare. $\square = wt/w_\square$ este gradul de conversie, care
25 este egal cu raportul dintre pierderea de masă la timpul "t" raportată la cea de la sfârșitul
procesului.

27 Ecuația cinetică generală este:

$$da/dT = Ae^{-E/RT} [a^m(1-a)^n [-\ln(1-a)]^p] \text{ unde:}$$

29 T este temperatura în K, R - constanta gazelor, E - exponenții m, n, p, care pot lua
diferite valori în raport cu mecanismul de reacție sau procesul fizic ce are loc în probă.

31 Curbele TG/DTG sunt date în fig. 5...9, iar caracteristicile termice sunt date în
tabelul 2.

33 *Tabelul 2*

Caracteristicile termice ale probelor studiate

35 Proba	T _i (°C)	T infl (°C)	T _m (°C)	T infl (°C)	T _f (°C)	W (%)
36 PU	228	268; 300	357; 393	424	503	70
37 PU+HC	233	290	364	434	508	68,4
38 PU +HC+ELk	238	308	388	438	512	67,2
39 PU +HC+ HA	230	290	355	428	492	64,7
40 PU + HC+CS	220	292	367	420	494	62

41 Se poate observa că termograma poliuretanului este foarte complexă mai ales la
43 temperaturi până la 350°C, unde prezintă picuri cu multiple inflexiuni, iar picul principal de
descompunere este format din două picuri, ceea ce ar indica decurgerea simultană a două
45 procese. Prin adaosul de HC, kEL, HA sau CS, se observă că picurile se simplifică, iar
temperaturile caracteristice cresc, ceea ce ar indica o creștere a stabilității termice. Pentru

RO 123177 B1

evidențierea diferențelor s-a efectuat și o analiză cinetică a datelor, prin metodele integrale Coats-Redfern, Flynn-Wall, van Krevelen și Urbanovici-Segal și metode diferențiale Achar, Freeman-Carroll și Piloyan, printr-un program de calcul comercial. Rezultatele finale sunt date în tabelul 3, care prezintă valorile parametrilor cinetici pentru sistemele pe bază de poliuretan.

Tabelul 3

Amestec	Poliuretan		Poliuretan +HC		Poliuretan + HC + KEL		Poliuretan + KEI + HC + HA		Poliuretan + KEI + HC + CS	
	Energ, kJ/mol	ordin	Energ, kJ/mol	ordin	Energ, kJ/mol	ordin	Energ, kJ/mol	ordin	Energ kJ/mol	ordin
Coats	59,05	1,0	96,31	1,8	-	-	85,07	1,5	104,36	1,8
TGDR	66,34	-	-	-	61,86	-	55,70	-	76,08	-
Coats Redfern	64,96	1,1	87,93	1,7	89,67	1,8	85,33	1,6	111,41	2,1
Flynn-Wall	71,84	1,1	93,69	1,7	92,62	1,7	91,09	1,6	115,75	2,1
van Krevelen	91,98	1,3	120,75	1,9	122,92	2,0	117,34	1,8	155,91	2,4
Urbanovic Segal	66,79	1,1	89,49	1,7	91,75	1,8	87,46	1,6	113,27	2,1
Achar	50,17	0,8	63,39	1,1	85,03	1,8	57,18	1,0	84,15	1,5
Freeman-Carroll	18,26	-	146,81	-	343,50	-	87,15	-	179,90	-
Piloyan	32,29	-	42,32	-	23,52	-	41,00	-	52,99	-

Se știe că fiecare metodă de calcul este afectată de erori din cauza condițiilor impuse pentru rezolvarea ecuațiilor cinetice. Acestea sunt utile mei ales pentru compararea probelor ce prezintă similarități. Se poate observa că ordinele de reacție rămân aproximativ constante, pe când energiile de activare prezintă valori mai mari la încorporarea compușilor biologic activi HC, KEL, HA și CS. Aceasta este în concordanță cu creșterea valorilor temperaturilor caracteristice, confirmând astfel că amestecurile au stabilitatea termică mai ridicată decât poliuretanul.

Testarea biocompatibilității amestecurilor

Filmele obținute conform exemplelor de mai sus au fost testate din punct de vedere al biocompatibilității *in vitro*, pe o linie celulară de fibroblaste umane. În acest context s-au investigat viabilitatea, proliferarea și morfologia celulelor cultivate în prezența celor 4 tipuri de biomateriale, comparativ cu polimerul sintetic (poliuretan). Rezultatele obținute au evidențiat că toate amestecurile polimerice favorizează proliferarea și adeziunea celulară, și păstrează morfologia normală a acestora într-un procent mai mare decât poliuretanul, ceea ce demonstrează un grad mai ridicat de biocompatibilitate.

Materialele obținute prin amestecarea poliuretanului cu molecule ale matricei extracelulare prezintă suprafețe netede.

Amestecul de poliuretan și hidrolizat de colagen prezintă o bună compatibilitate, manifestată de aderarea și migrarea fibroblastelor dermale pe suprafața sa. Fibroblastele dermale își mențin fenotipul normal și după 48 h de la cultivare pe suprafața amestecului de poliuretan și hidrolizat de colagen. Analiza microscopică a demonstrat că fibroblastele dermale prezintă nuclei eucromatici cu 1-2 nucleoli și citoplasmă clară. În plus, fibroblastele aderă ferm la substrat și prezintă prelungiri citoplasmice care atestă migrarea pe substrat (fig. 10A).

RO 123177 B1

1 Menținerea fenotipului normal al fibroblastelor, însoțită de aderarea și migrarea
acestora, a fost observată și în cazul în care celulele au fost cultivate 24 și 48 h pe un
3 amestec polimeric de poliuretan-hidrolizat de collagen-k-elastină. În cazul acestei variante
polimerice, analizele de microscopie optică au evidențiat morfologia celulară normală a
5 fibroblastelor (fig. 10B).

Amestecul de poliuretan - hidrolizat de collagen - k-elastină - acid hialuronic furni-
7 zează, de asemenea, un substrat biocompatibil pentru fibroblastele umane atât la 24 h de
cultivare, cât și la 48 h de cultivare. Fenotipul celular normal se păstrează și după cultivarea
9 timp de 72 h a fibroblastelor dermale pe amestecul de poliuretan - hidrolizat de collagen - k-
elastina - acid hialuronic (fig. 10C).

11 Folosirea unui alt glicozaminoglican, de tipul condroitin sulfat, în amestecul de
poliuretan - hidrolizat de collagen - k-elastina nu afectează creșterea, diviziunea și migrarea
13 fibroblastelor la 24, 48 și 72 h de cultură. La această variantă experimentală s-a observat,
la 72 h de cultivare, o proporție redusă de celule apoptotice, însă numărul lor nu este
15 semnificativ (fig. 10D).

Teste "in vivo"

17 Evidențierea efectului materialelor polimerice asupra țesutului dermic la diferiți timpi
de implantare, comparativ cu țesuturile intacte și țesuturile asupra cărora s-a intervenit prin
19 realizarea inciziei (fără tratament), s-a realizat prin determinarea activității enzimelor
matriceale (MMP2 și MMP9). Deoarece metaloproteinazele matriceale sunt implicate în
21 procesul de remodelare tisulară, am urmărit variația acestora prin zimografie și
densitometrie.

23 Țesutul din jurul implantului a fost prelevat la diferite intervale de timp, iar după
extracția chimică cu GnHCl, s-a făcut determinarea concentrației proteice a extractelor
25 obținute, redată în tabelul 4, care prezintă dozarea conținutului proteic a extractelor din țesut.

Tabelul 4

Tipul Probei Prot. µg/ml	Conc.		
	Ziua 1	Ziua 3	Ziua 7
PU	164,77	146,91	135,17
PU+HC	133,84	129,04	145,84
PU+HC+KEL	188,24	143,97	191,44
PU+HC+KEL+CS	158,64	112,24	146,37
M (fără incizie)	146,37	146,37	146,37
M _{1,3,7} (cu incizie)	130,11	147,44	110,64

37 Din tabelul 4 se constată o creștere a concentrației proteice, în cazul extractelor
provenite din țesuturile în care s-a implantat PU+HC+KEL, însă, în general, cantitățile
39 proteice cele mai mari pentru fiecare tip de implant folosit s-au înregistrat la 1 zi, fapt explicat
și prin desfășurarea în acest moment a primei etape de vindecare, ce aduce cu sine procese
41 inflamatorii, infiltrări macrofage care implică adeziune și activare, precum și acumularea de
leucocite în jurul implanturilor, care este dirijată prin diferiți factori chemotați. Studiile
43 realizate anterior evidențiază faptul că activarea macrofagelor prin fagocitoză sau endocitoză
conduce la secreția unui număr mare de substanțe, care pot avea o influență majoră și foarte
45 diferită asupra răspunsului inflamator, de la înmulțirea celulelor, la moartea acestora.

RO 123177 B1

Considerând reacțiile tisulare ale tuturor materialelor de implant ca reacții la corp străin, destinația unui material este determinată de intensitatea interacțiilor și capacitatea de iritare. Există următoarele posibilități de interacțiune material-țesut:	1 3
- o reacție inflamatorie imediată și intensă, septică sau nu, indicând o respingere rapidă a polimerului implantat;	5
- o respingere în timp lung, după infiltrarea de celule mononucleare și macrofage, care apare în stadiul reparator;	7
- izolare, discontinuitatea stratului fibros, activitate leucocitară;	
- separarea fără reacție celulară, după izolarea din mijlocul unui țesut fibros continuu;	9
- o biocompatibilitate completă, caracterizată de o dezvoltare în jurul implantului de noi celule funcționale pentru țesutul în care se efectuează implantul [Peluso G. et al., 1991].	11
Din datele zimografice (fig. 11), dacă urmărim variația MMP2 și MMP9 pentru M 1 zi, M 3 zile și M 7 zile, observăm o comportare a acestora așa cum este indicată în teorie, și anume: scade în timp MMP9 activ (86 kDa) și MMP9 latent (92 kDa), MMP2 crește până la 3 zile, după care începe să scadă. Acest fapt este susținut și de rezultatele obținute în urma analizării gelului prin densitometrie, conform graficului din fig. 12.	13 15
Sinteza noii matrice în jurul implantului și creșterea asociată a tăriei mecanice au loc prin formarea și maturarea rețelelor intermoleculare de colagen, mediată de activitatea lisil oxidazei. Inițial se formează rețele bivalente intermediare, care se transformă spontan în rețele multivalente spontane. Pe parcursul dezvoltării țesutului granular, colagenul este metabolizat foarte rapid și prezintă proprietăți chimice asemănătoare celor din țesutul embrionar. Consolidarea țesutului nu este dependentă numai de sinteza și stabilizarea noului colagen, ci este afectată și de gradul de turnover al colagenului, care, la rândul său, este influențat de activitatea enzimelor proteolitice în care este inclusă și familia metaloproteinazelor (acestea controlează procesul de remodelare a țesutului (Mignatti et al., 1988)). Colagenazele, împreună cu gelatinazele și stromelizinele, aparțin grupului de metaloproteinaze (MMP-uri)(3). Aceste enzime conțin zinc în situsul catalitic, sunt active la pH neutru și au nevoie de ioni de Ca^{2+} pentru o activitate completă. Sunt secretate ca și proenzime inactive, sunt activate proteolitic și sunt inhibitate de către inhibitori tisulari ai MMP-urilor. De altfel, ele împărtășesc secvențe comune de aminoacizi, izotipurile de colagenază manifestând specificitate de substrat. La momente diferite din timpul vindecării, celulele inflamatoare, fibroblastele, keratinocitele și celulele endoteliale sunt surse ale diferitelor tipuri de MMP-uri.	17 19 21 23 25 27 29 31 33
Colagenazele sunt incluse rapid după implantare, având un tipar distinct, după care se exprimă. Sinteza MMP9 de către keratinocite se presupune că este implicată în fenotipul locomotor al acestora și este inhibată atunci când epitelizarea rănii este completă. Activitatea MMP 9 este depistată în fazele inițiale (48 h), după care descrește rapid la valori normale, fiind asociată cu un răspuns inflamatoriu acut. MMP2 sau gelatinaza tip A acționează asupra colagenului tip IV, activitatea sa fiind înregistrată mai târziu (3 zile), după care descrește în conformitate cu rolul său, rol de enzimă predominantă, implicată în procesul de remodelare. Raportând celelalte probe la martor, se constată că niciuna dintre acestea nu prezintă o evoluție asemănătoare în timp, ale celor 2 categorii de metaloproteinaze.	35 37 39 41

RO 123177 B1

Tabelul 5

Rezultatele densitometriei pentru gelurile de electroforeză

Proba	Timp (zile)	MMP9 laten (92kDa) -%	MMP9 acti (9286kDa) -%	MMP2 laten (72kDa) -%	MM2 acti (66kDa) -%
PU	1		15,81		12,81
	3		18,48		18,35
	7				16,34
PU+HC	1				13,53
	3				18,10
	7			3,3	11,44
PU+HC+KEL	1				10,00
	3			2,97	11,44
	7			3,19	11,77
PU+HC+KEL+CS	1	17,04	28,69		15,41
	3				22,04
	7				22,15
M _{1,2,3} (cu incizie)	1	14,36	11,18		7,3
	3		11,69	3,04	10,84
	7				10,02
M (fără incizie)	-				12,17

Dacă, în cazul martorilor, cantitatea de MMP2 urcă până la timpul 2, după care coboară, acest profil este urmărit de probele PU, PU+HC, în timp ce pentru probele PU+HC+KEL+CS și PU+HC+KEL, cantitatea lor crește până la momentul 2, continuând această creștere într-un mod mult mai lent, până la momentul 3.

Profilul evoluției MMP9 activ este urmărit doar de proba PU, ceea ce denotă prezența unui proces inflamatoriu, inexistent în cazul celorlalte probe, și, implicit, o toleranță crescută față de materialele implantate.

Produsele de secreție ale macrofagelor sunt hormoni polipeptidici și factori de creștere, componente complementare, factori de coagulare, enzime, inhibitori de enzime, proteine și matrice extracelulară, proteine de legătură, lipide bioactive și oligopeptide, hormoni steroidici, produși purinici și pirimidinici, oxigen-reactivi și metaboliți de azot.

RO 123177 B1

Revendicări

1. Compoziție de material biocompatibil, pe bază de poliuretan, colagen, elastină și acid hialuronic sau condroitin sulfat, **caracterizată prin aceea că** este constituită din: 89...91 % poliester-uretan, PU, 8...10% colagen, HC, 0,8...1,6% elastină, EL și agenți de bioactivare cu caracter antiinflamator și de regenerare a țesuturilor aleși dintre 0,01...0,02% acid hialuronic (HA) și 0,01...0,02% condroitin sulfat (CS). 3 5 7
2. Compoziție de material biocompatibil, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că** poliester uretanul are următoarea structură: 9
- $$[\text{PEGA-MDI}-(\text{EG-MDI})_4]_n$$
- unde: 11
- PEGA este poli (etilenglicol) adipat: $\text{HO}-[(\text{CH}_2-\text{OCO}-(\text{CH}_2)_4-\text{oco}]_n--(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ și $n = 10,3$; 13
 - MDI este 4,4 metil difenil diizocianat: $\text{OCN}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NCO}$;
 - EG este etilen glicol: $\text{HO}-(\text{CH}_2)_2-\text{OH}$ cu masa moleculară $M = 139250$. 15
3. Procedeu de obținere a unei compoziții de material biocompatibil, definită în revendicarea 1, **caracterizat prin aceea că** se dizolvă pulbere de poliuretan în DMF, la temperatura de 60°C, pentru obținerea unei soluții de 60...70% poliuretan, la care se adaugă colagenul, elastina și agenții de bioactivare, în proporții corespunzătoare, când se formează un amestec sub formă de clei brun, cu separare de faze, se continuă încălzirea până la 75°C, pentru omogenizare, se depune soluția pe plăci de sticlă, pentru evaporarea DMF la temperatura camerei, obținându-se un film compozit poliuretanic, cu grosime de 0,5...1 mm, care se mențin în etuvă la temperatura de 45°C, timp de 15 h, și la vid, timp de 55 h, după care filmul se desprinde de pe plăci și se usucă timp de 72 h, în etuvă cu vid înalt, până la evaporarea totală a solventului. 17 19 21 23 25

(51) Int.Cl.

C08L 89/00 (2006.01),

A61K 35/34 (2006.01)

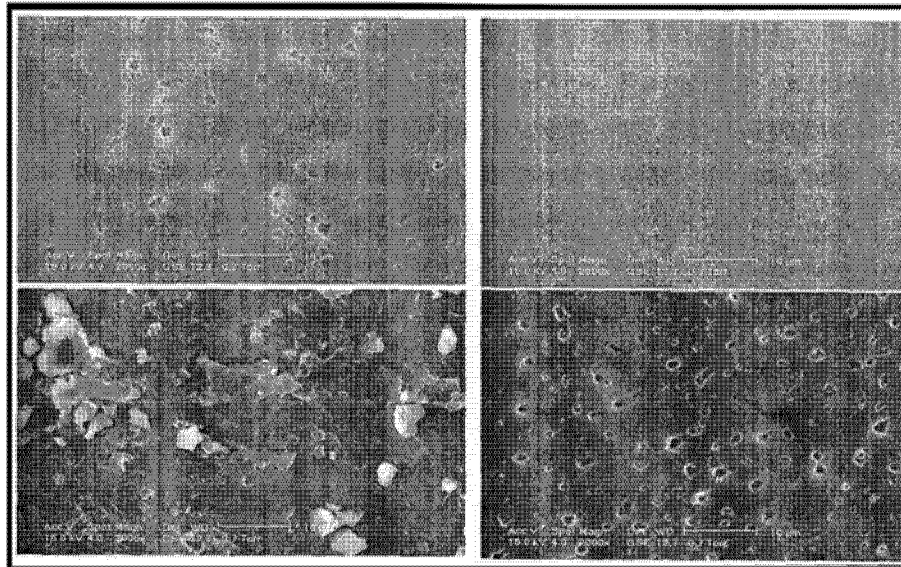


Fig. 1

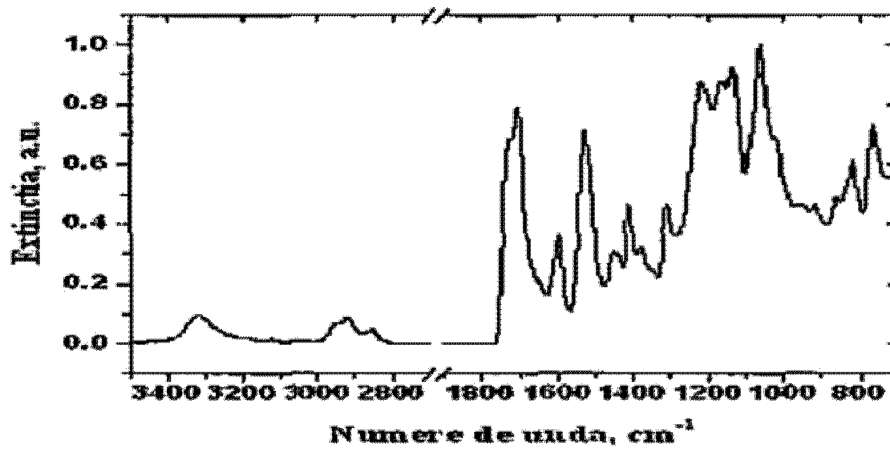


Fig. 2

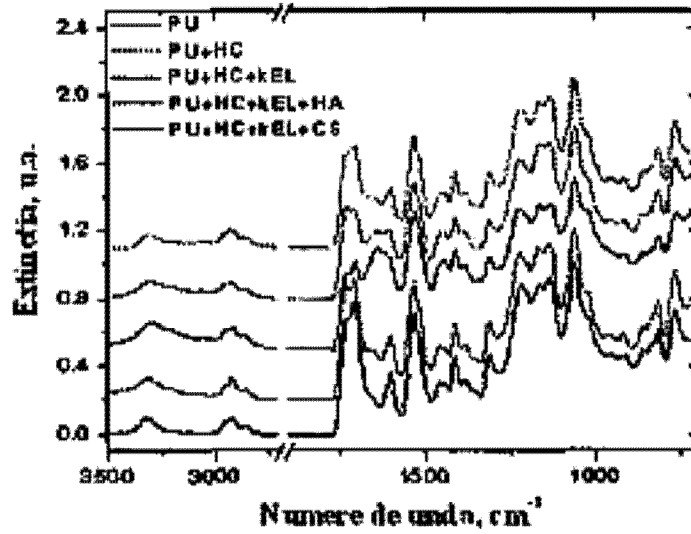


Fig. 3

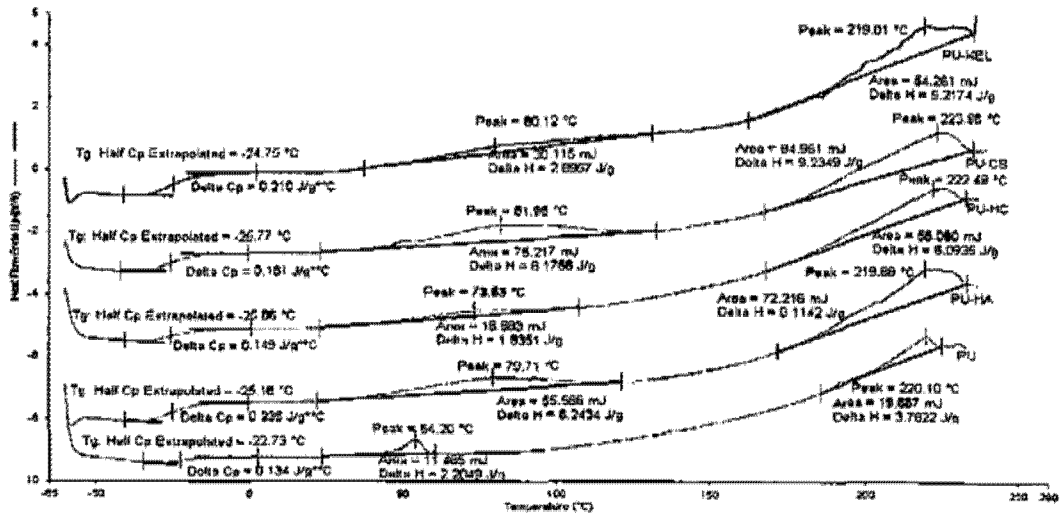


Fig. 4

(51) Int.Cl.

C08L 89/00 (2006.01),

A61K 35/34 (2006.01)

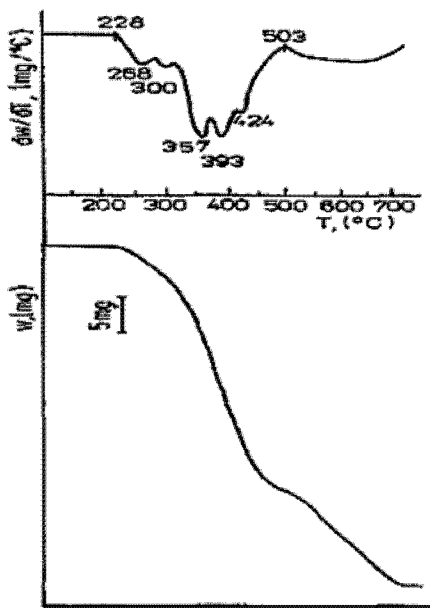


Fig. 5

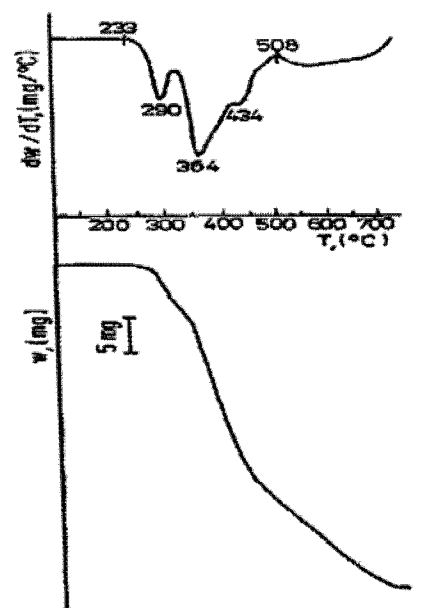


Fig. 6

(51) Int.Cl.

C08L 89/00 (2006.01),

A61K 35/34 (2006.01)

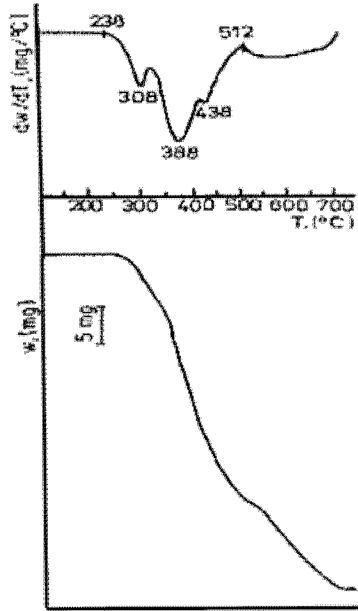


Fig. 7

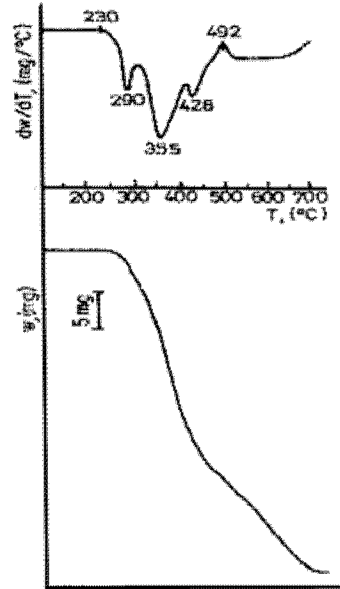


Fig. 8

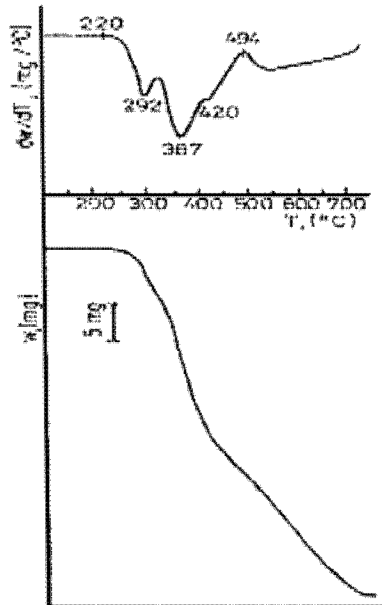


Fig. 9

(51) Int.Cl.

C08L 89/00 (2006.01),

A61K 35/34 (2006.01)

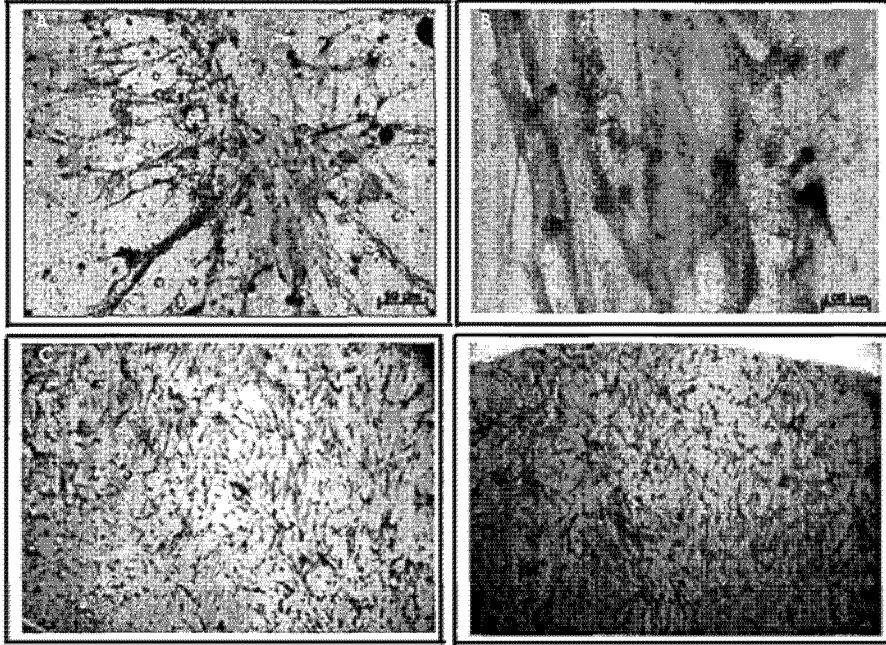


Fig. 10

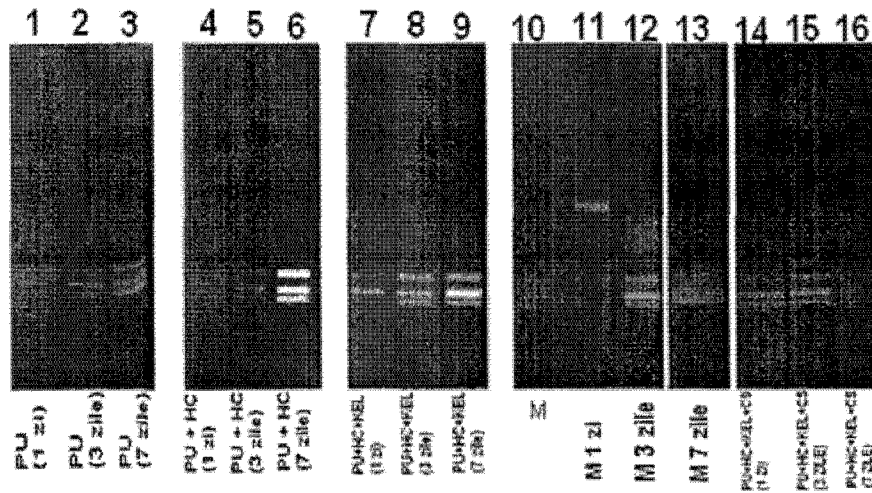


Fig. 11

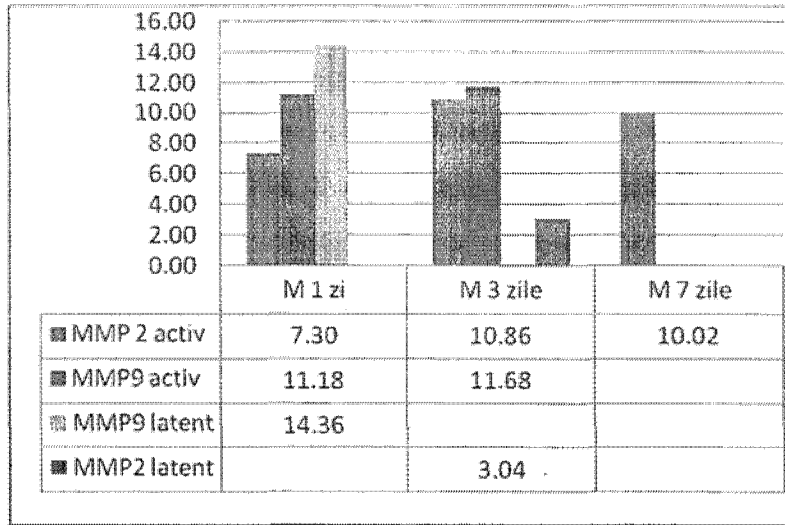


Fig. 12

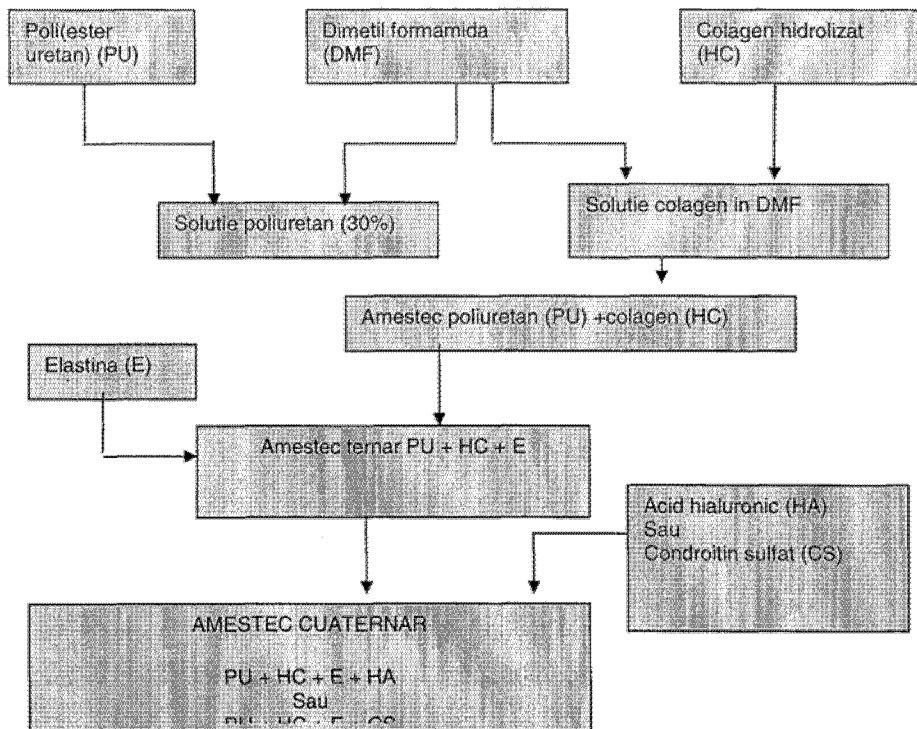


Fig. 13

