



(12)

## CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2016 00483**

(22) Data de depozit: **04/07/2016**

(41) Data publicării cererii:  
**30/01/2018** BOPI nr. 1/2018

(71) Solicitant:  
• **INSTITUTUL NAȚIONAL DE  
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU  
FIZICA MATERIALELOR-INCDFM,  
STR.ATOMIȘTILOR NR.405 A, MĂGURELE,  
IF, RO**

(72) Inventatori:  
• **PREDOI DANIELA, CALEA PLEVNEI  
NR.94, BL.10D2, SC.1, ET.4, AP.12,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**

• **CIOBANU STELUȚA CARMEN,  
ALEEA CETĂȚUIA NR. 2, BL. M17, SC. A,  
ET. 3, AP. 20, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO;**  
• **POPA CRISTINA- LIANA, STR. BORSA  
NR. 1-3, BL. 10E, SC. 2, ET.4, AP. 28,  
SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;**  
• **ICONARU SIMONA- LILIANA,  
ȘOS. VIILOR NR. 101, BL. 1, SC. 6, ET. 6,  
AP. 185, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **METODĂ DE OBȚINERE A HIDROXIAPATITEI DOPATĂ  
CU ZINC ÎN MATRICE DE COLAGEN PENTRU APLICAȚII  
BIOMEDICALE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui material pe bază de hidroxiapatită dopată cu zinc în matrice de colagen cu aplicații biomedicale. Procedeu conform invenției constă în aceea că o soluție de  $(\text{NH}_4)\text{HPO}_4$  se adaugă la un amestec format din  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$  și  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_6 \times 6\text{H}_2\text{O}$ , la o temperatură de  $40^\circ\text{C}$ , rezultând hidroxiapatită dopată cu zinc, sub formă de pulbere, care se adaugă într-un gel de colagen din care rezultă compuși de gel având o pondere

de colagen de 1,2%, pH 7,4, și care, după reticulare și liofilizare, conduc la un biomaterial compozit pe bază de hidroxiapatită dopată cu zinc în matrice de colagen, cu o distribuție uniformă a elementelor: calciu, fosfor, zinc, oxigen și carbon, și o porozitate direct proporțională cu ponderea de colagen din compozit.

Revendicări: 1  
Figuri: 4



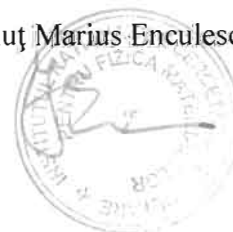


**DESCRIEREA INVENȚIEI:**  
**METODA DE OBȚINERE A HIDROXIAPATITEI DOPATA CU ZINC ÎN**  
**MATRICE DE COLAGEN PENTRU APLICAȚII BIOMEDICALE**

Prezenta invenție se referă la obținerea printr-o metodă simplă și costuri reduse a unui material pe bază de hidroxiapatită dopată cu zinc într-o matrice de colagen cu potențiale aplicații biomedicale. Necesitatea din ce în ce mai mare pentru noi biomateriale cu proprietăți superioare a determinat cercetătorii din întreaga lume să încerce să redă caracteristicile țesutului uman natural. Astfel, prin alăturarea mai multor compuși care se găsesc în mod natural în țesutul dur natural, se încearcă crearea unui material care ar putea fi integrat în corpul uman fără a provoca efecte adverse, conducând astfel la îmbunătățirea calității vieții oamenilor care au fost supuși unor intervenții chirurgicale majore.

Potrivit unui raport al Asociației Americane a Chirurgilor Ortopedi din 2002, țesutul osos este al doilea cel mai frecvent transplatat țesut, fiind depășit doar de transfuziile de sânge. Astfel, grefele osoase sunt necesare pentru remedierea leziunilor osoase grave, cauzate în principal de deformări congenitale, traume, de rezecții ale unor tumori sau de diferite boli degenerative precum osteomielite [1-2]. Prin urmare, medicina modernă s-a concentrat asupra găsirii unei soluții optime pentru a rezolva problema grefelor osoase. În acest context, o alternativă la metodele de grefare clasice sunt grefele sintetice. Astfel, cercetătorii din întreaga lume încearcă să găsească un material biocompatibil capabil să imite țesutul osos natural.

Director General INCDFM,  
Dr. Ionuț Marius Enculescu



Osul uman este compus dintr-o parte anorganică, a carei componentă majoritară este hidroxiapatita (HAp,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), și o parte organică care este compusă majoritar din fibre de colagen (89%) [2-5]. Numeroase studii au arătat că hidroxiapatita are proprietăți biologice remarcabile, cum sunt biocompatibilitatea și osteoconductivitatea [1]. Pentru a îmbunătăți proprietățile HAp, s-a încercat substituția ionilor de calciu din structura sa cu diferiți ioni [6-12]. Recent, o atenție deosebită a fost acordată zincului (Zn), deoarece acesta este un metal de tranziție, frecvent întâlnit în partea minerală osoasă, având rolul de a stimula formarea țesutului osos *in vivo* și *in vitro*, inhibând în același timp resorbția osoasă osteoclastică *in vivo* [6, 13]. De asemenea, studii recente au demonstrat că prezența Zn în structura implanturilor crește viteza procesului de formare a țesutului osos în jurul implantului [14-16]. Pe de altă parte, colagenul este folosit în ingineria țesuturilor și reparație datorită biocompatibilității și capacității de a fi resorbit cu ușurință de către corpul [1,17-20]. Studii recente au demonstrat că dispozitivele pe bază de colagen și hidroxiapatita inhibă dezvoltarea agenților patogeni bacterieni, reducând astfel riscul apariției infecțiilor post-chirurgicale care pot apărea în urma implantării protezelor [1, 21].

Scopul invenției este de a realiza pulberi de hidroxiapatită dopată cu Zn într-o matrice de colagen (Zn:HAp-CBc\_1 și Zn:HAp-CBc\_4) cu potențiale aplicații biomedicale. Studiul citotoxicității Zn:HAp-Cbc s-a realizat asupra liniei celulare cancerigene HeLa.

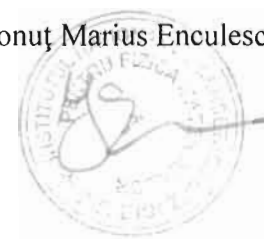
Problema pe care o rezolvă invenția constă în posibilitatea utilizării unor biomateriale, pe bază de hidroxiapatită dopată cu Zn, ieftine și eficiente în regenerarea osoasă. Noul compozit a fost obținut prin înglobarea hidroxiapatitei dopate cu zinc într-o matrice de colagen. Precursorii utilizați au fost: nitratul de calciu [ $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ , Aldrich, USA], amoniu hidrogen fosfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ; Wako Pure Chemical Industries Ltd.) și nitratul de zinc hexahidrat ( $\text{Zn}(\text{NO}_3)_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , Alpha Aesar, Germany, puritate 99.99 %). Colagenul fibrilar de Tipul I sub formă de gel (Coll) cu o concentrație de 2.11% (w/w) a fost extras din os de vitel prin intermediul tratamentelor descrise anterior [22].

Director General INCDFM,  
Dr. Ionuț Marius Enculescu



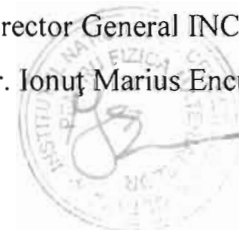
Asadar, cantitati potrivite de de amoniu hidrogen fosfat si nitrat de zinc au fost dizolvate in etanol. Dupa adaugarea apei bidistilate, solutia a fost agitata continuu timp de 24 h la o temperatura de 40 °C. Separat, o cantitate stoichiometrica de nitrat de calciu a fost dizolvata in etanol si a fost agitata continuu timp de 24 de ore la o temperatura de 40 °C. Solutia cu continut de calciu a fost apoi adaugata treptat in solutia cu continut de fosfor si a fost ulterior lasata la temperatura ambientala timp de 72 de ore si inca 24 de ore la o temperatura de 40 °C. Raportul  $[Ca+Zn]/P$  a fost ajustat la 1.67 iar concentratia de zinc a fost  $x_{Zn}=0.1$  [23-25]. Nanopulberile de Zn:HAp obtinute au fost tratate la o temperatura de 80°C timp de 6 ore. Hidroxiapatita dopata cu zinc obtinuta anterior, a fost adaugata intr-un gel de collagen, obtinandu-se astfel compusi Zn:HAp-CBc cu urmatoarele rapoarte: 0:1 (referinta de collagen), 4:1 (Zn:HAp-CBc\_4), 1:1 (Zn:HAp-CBc\_1) si 1:0 (referinta de Zn:HAp). Toti compusii de gel au avut aceeasi concentratie de collagen, 1.2% (raportat la substanta uscata), pH-ul 7.4 si au fost reticulati cu 0.5% GA conform metodei descrise anterior in literatura [26]. Dupa procesul de reticulare, compozitele de gel au fost liofilizate obtinandu-se in final compozite poroase 3D. Morfologia si porozitatea biocompozitelor de hidroxiapatita dopata cu zinc acoperita cu collagen (Zn:HAp-CBc) a fost studiata prin microscopie electronica de baleiaj (MEB). In Fig. 1 sunt prezentate imaginile MEB ale collagenului (Fig. 1a), Zn:HAp (Fig. 1b) si Zn:HAp-CBc (Fig. 1c-1d). Morfologia collagenului este prezentata in Fig. 2a, in timp ce in Fig. 1b sunt prezentate imaginile MEB ale Zn:HAp, acestea avand dimensiuni nanometrice si o morfologie elipsoidala. In Fig. 1c-1d se poate observa ca porozitatea materialelor compozite a crescut o data cu cresterea raportului Zn:HAp/collagen (Zn:HAp-CBc\_1). Se poate observa ca porozitatea materialelor compozite este direct proportionala cu cantitatea de collagen din probe (Zn:HAp-CBc\_1 > Zn:HAp-CBc\_4). Inglobarea nanoparticulelor de Zn:HAp in matricea de collagen a fost pusa in evidenta prin intermediul imaginilor MEB. De asemenea, se poate observa ca probele sunt omogene. Spectrul EDAX impreuna cu cartografiile compozitelor bioceramice Zn:HAp-CBc\_1 sunt prezentate in Fig. 2. Acestea, au aratat ca principalele elemente chimice prezente in pulberea analizata sunt calciul, fosforul, zincul, oxigenul si carbonul. Pe de alta parte, se poate observa o distributie uniforma a acestora.

Director General INCDFM,  
Dr. Ionuț Marius Enculescu



Rezultatele obtinute in urma studiilor MEB sugereaza faptul ca nanoparticulele de Zn:HAp au fost inglobate in matricea de colagen. Biocompatibilitatea nanocompozitelor de hidroxiapatita dopata cu zinc intr-o matrice de colagen a fost studiata utilizand culturi celulare HeLa. Fig. 3 prezinta rezultatele evaluarii morfologiei celulelor HeLa inainte (etalon) si dupa expunerea la colagen, Zn:HAp-CBc\_1, Zn:HAp-CBc\_4 si Zn:HAp ( $x_{Zn}=0.1$ ) (10 mg/ml) timp de 72 h. Imaginile microscopice ale culturilor celulare HeLa incubate cu nanocompozitele obtinute arata ca prezenta materialelor compozite nu a modificat semnificativ morfologia celulelor, acestea prezentand o morfologie similara cu cea a etalonului. In imagini (Fig. 3) se poate observa ca celulele isi pastreaza forma poligonala caracteristica, si ca sunt uniform distribuite pe suprafata investigata. Studii complementare privind biocompatibilitatea si citotoxicitatea nanocompozitelor de hidroxiapatita dopata cu zinc intr-o matrice de colagen au fost realizate utilizand tehnica citometriei in flux cu dubla-colorare a celulelor cu Annexin V-FITC/iodura de propidiu. Rezultatele analizei de citometrie de flux privind influenta materialelor compozite obtinute asupra ciclurilor celulare ale celulelor HeLa a pus in evidenta faptul ca nu au existat schimbari semnificative ale parametrilor ciclului celular ai celulelor HeLa expuse la colagen, Zn:HAp-CBc\_1, Zn:HAp-CBc\_4 si Zn:HAp ( $x_{Zn}=0.1$ ) comparativ cu etalonul. Mai mult decat atat, rezultatele obtinute privind proliferarea celulara si apoptoza, sugereaza ca nu a existat nicio diferenta intre compozitele obtinute si materialele brute utilizate (Fig. 4). Studiile privind efectul citotoxic al nanoparticulelor Zn:HAp-CBc asupra liniei celulare HeLa canceroase au pus in evidenta caracterul netoxic al acestora, o distributie omogena si uniforma si o morfologie a celulelor HeLa similara cu cea a probei etalon (Fig. 3). Pe de alta parte, analiza ciclului celular al celulelor HeLa cultivate cu 0.1% DMSO (etalon) si tratate cu colagen, Zn:HAp-CBc\_1, Zn:HAp-CBc\_4 si Zn:HAp ( $x_{Zn}=0.1$ ) a aratat ca nu se remarca nicio diferenta intre parametrii obtinuti pentru ciclul celular al celulelor tratate cu compozitele obtinute si al celulelor tratate cu materialele originale si parametrii obtinuti pentru ciclul celular al culturii celulare etalon. De asemenea, rezultatele privind proliferarea celulara si apoptoza au aratat ca nu exista diferente semnificative intre materialele compozite si materiale originale testate (Fig. 4).

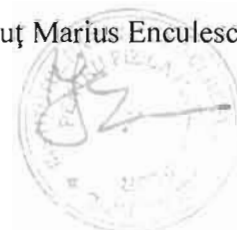
Director General INCDFM,  
Dr. Ionuț Marius Enculescu

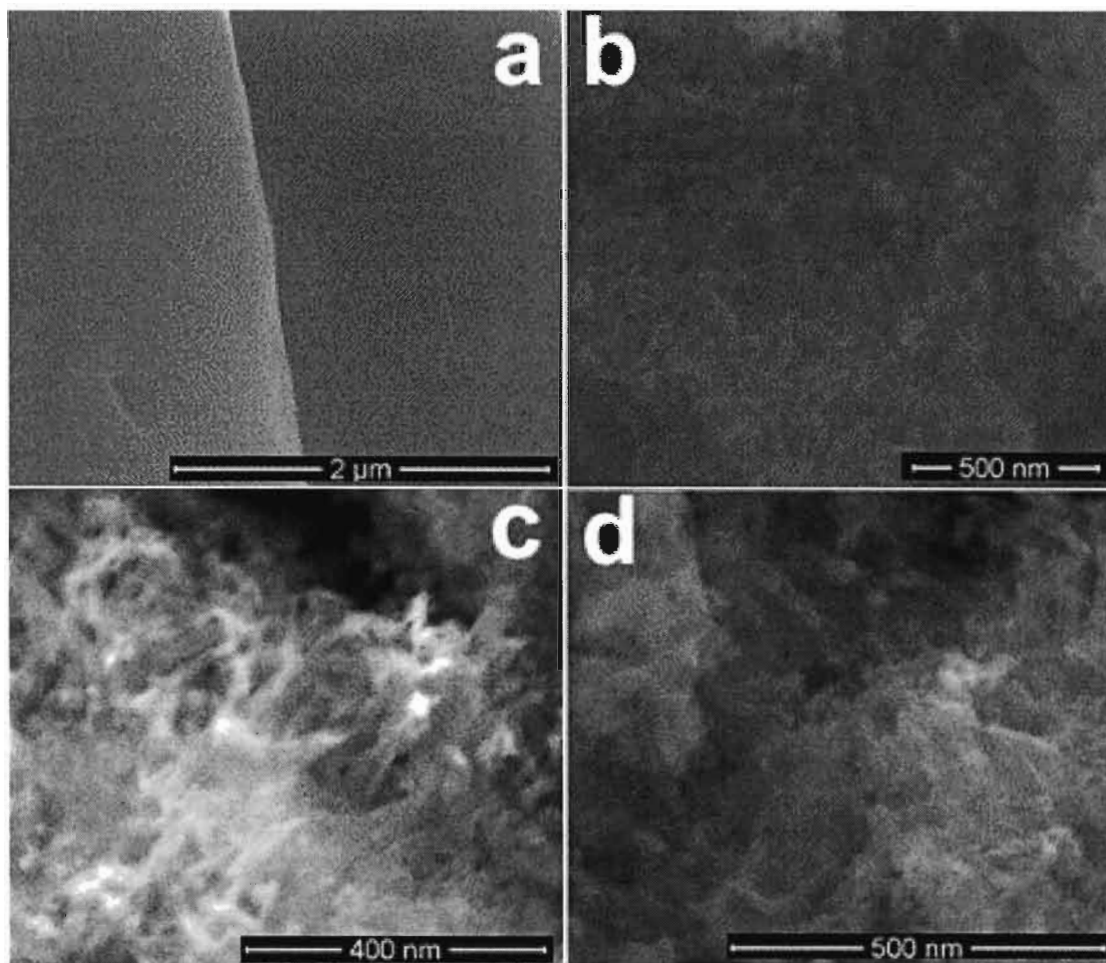


## REVENDICĂRI

Metoda de obținere a hidroxiapatitei dopate cu zinc în matrice de collagen prin coprecipitare la temperaturi joase **caracterizata prin aceea ca**, in scopul realizarii unor materiale pentru aplicații biomedicale la temperatura de 40°C se adauga solutia de  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  unui amestec format din  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  si  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_6 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Pulberile obtinute au fost adaugate intr-un gel de collagen, obtinandu-se astfel compusi Zn:HAp-CBc cu urmatoarele rapoarte: 0:1 (referinta de collagen), 4:1 (Zn:HAp-CBc\_4), 1:1 (Zn:HAp-CBc\_1) si 1:0 (referinta de Zn:HAp). Dupa procesul de reticulare, compozitele de gel au fost liofilizate, rezultand in final compozite poroase 3D.

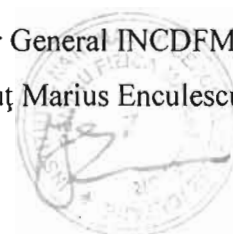
Director General INCDFM,  
Dr. Ionuț Marius Enculescu





**Fig. 1.** Imagini MEB ale collagenului (a), Zn:HAp (b), Zn:HAp-CBc\_4 (c) și Zn:HAp-CBc\_1 (d)

Director General INCDFM,  
Dr. Ionuț Marius Enculescu







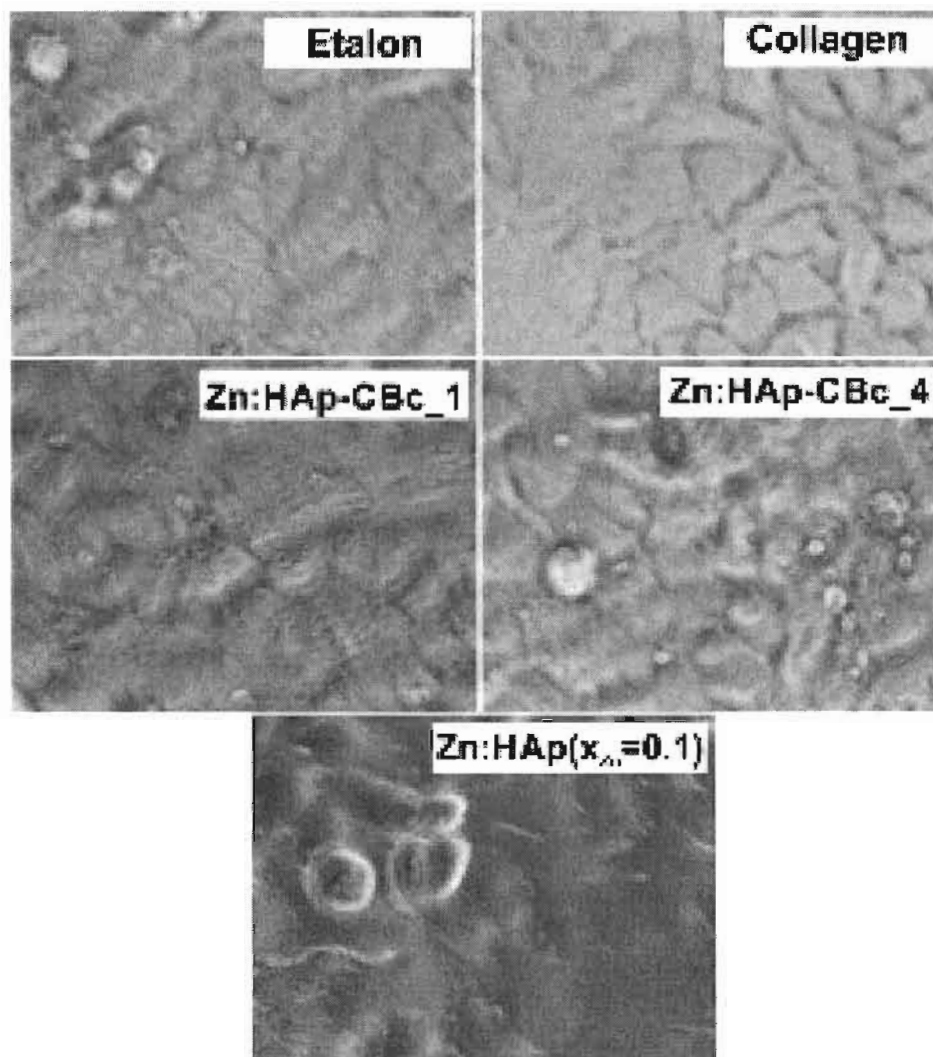
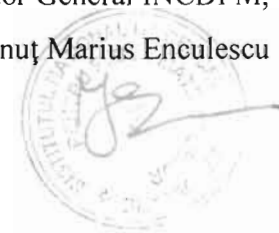


Fig. 3. Studii morfologice ale celulelor HeLa inainte (etalon) si dupa expunerea la collagen, Zn:HAp-CBc\_1, Zn:HAp-CBc\_4 si Zn:HAp ( $x_{zn}=0.1$ ) (10 mg/ml) timp de 72 h. Fiecare experiment a fost realizat in triplicat.

Director General INCDFM,  
Dr. Ionuț Marius Enculescu



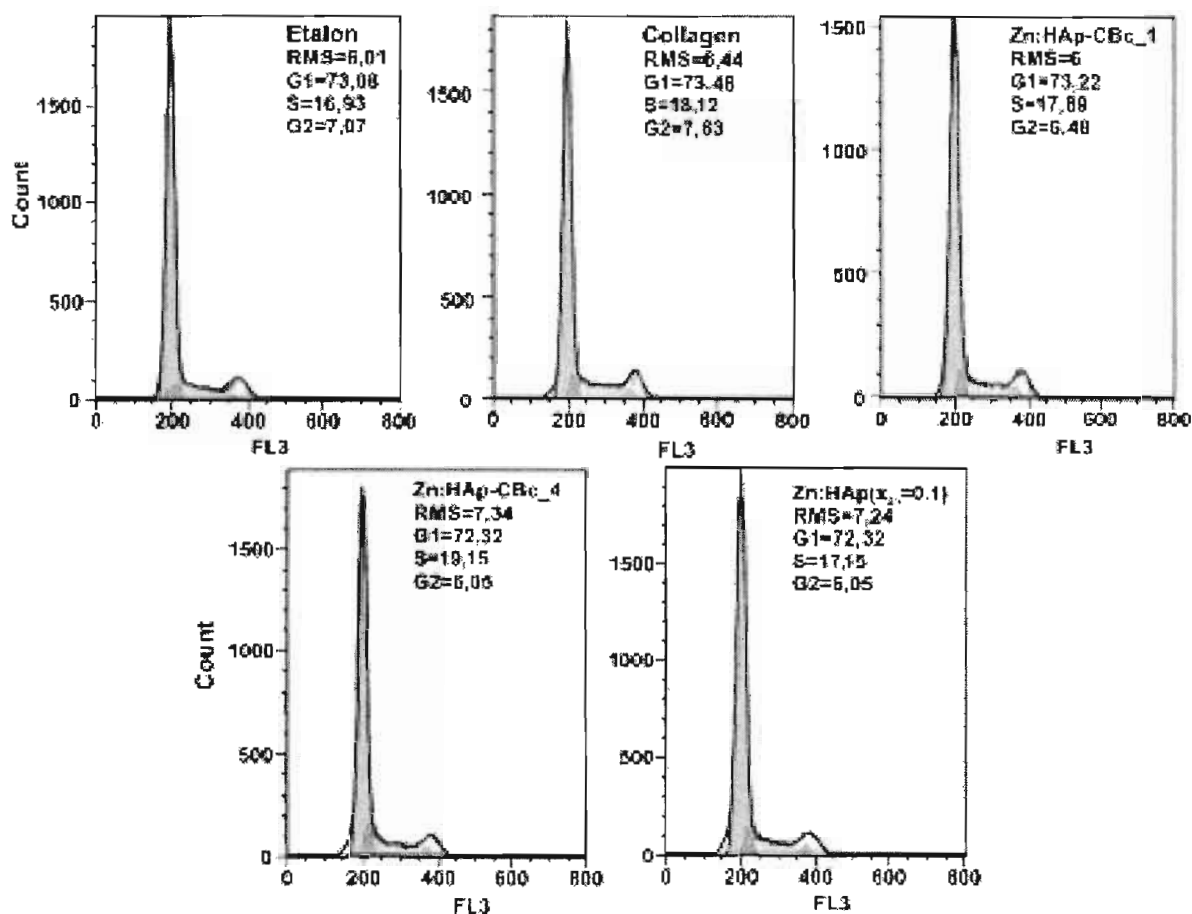


Fig. 4. Analiza ciclului celular al celulelor HeLa cultivate cu 0.1% DMSO (etalon) si tratate cu collagen, Zn:HAp-CBc\_1, Zn:HAp-CBc\_4 si Zn:HAp (x<sub>Zn</sub>=0.1)

Director General INCDFM,  
Dr. Ionuț Marius Enculescu

