



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2018 01009**

(22) Data de depozit: **29/11/2018**

(41) Data publicării cererii:
30/06/2020 BOPI nr. **6/2020**

(71) Solicitant:
• **SANIMED INTERNAȚIONAL IMPEX S.R.L.**, ȘOS.BUCUREȘTI- MAGURELE NR.70F, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• **UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI**, BD. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 36-46, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• **UNIVERSITATEA PĂLITEHNICA BUCUREȘTI**, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• **INSTITUTUL DE VIRUSOLOGIE "ȘTEFAN S.NICOLAU"**, ȘOS.MIHAI BRAVU NR.285, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• **BLEOTU CORALIA**, ALEEA LUNCA BRADULUI NR. 2, BL. H5, SC. 6, AP. 2, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• **DRAGU LAURA DENISA**, STR.BANU UDREA, NR.4, BL.G8, AP.98, BUCUREȘTI, B, RO;
• **MATEI LILIA**, STR. SEMILUNEI NR. 7, PARTER, BUCUREȘTI, B, RO;
• **DIACONU CĂRMEN CRISTINA**, STR. BABA NOVAC, NR.21, G11, 7/74, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CHIVU-ECONOMESCU MIHAELA**, ȘOS. ȘTEFAN CEL MARE 240, BL. 59A, ȘC. 4, AP. 105, BUCUREȘTI, B, RO;
• **ZURAC SABINA ANDRĂDA**, STR. TOPAZ NR. 5D, BRAGADIRU, IF, RO;
• **NEAGU ANA IULIA**, BD. NICOLAE GRIGORESCU NR. 19, BL. V18, SC. C, AP. 51, BUCUREȘTI, B, RO;
• **NECULA LAURA GEORGIANA**, ȘOS. COLENTINA NR. 10, BL. 6, SC. D, ET. 8, AP. 167, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;

• **HOLBAN ALINA MARIA**, STR. POET PANAIT CERNA NR.7, BL.M44, SC.1, ET.3, AP.12, BUCUREȘTI, B, RO;
• **DITU LIA MARA**, BD. REPUBLICII NR. 183, BL. 8C1, SC.A, ET. 8, AP. 31, PLOIEȘTI, PH, RO;
• **CHIFIRIUC MARIANA- CARMEN**, STR.STAMATE COSTACHE NR.5, BL.A8, SC.1, ET. 9, 37, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• **LAZĂR VERONICA**, STR. G-RAL B. VLĂDOIANU NR. 4, BL. 346, SC. A, AP. 2, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• **GRADISTEANU GRAȚIELA**, STR.AVIAȚIEI NR.15, BL.7D, SC.2, ET.2, AP.28, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• **NEACSU IONELA-ANDREEA**, STR.NICOLAE BĂLCESCU NR.112, BL.49, ET.1, AP.27, BALȘ, OT, RO;
• **ENE VLADIMIR LUCIAN**, STR.DRUMUL MĂNĂSTIREA VĂRATEC NR.7-11, BL.C1, ET.9, AP.90, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• **ANDRONESCU ECATERINA**, CALEA PLEVNEI NR. 141B, BL. 4, ET. 1, AP. 1, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
• **FICAI ANTON**, STR. RAHOVEI NR. 30-32, SC. 2, ET. 1, AP. 11, BRAGADIRU, IF, RO;
• **BALAS CRISTINA**, ALEEA SLT.ADRIAN CARSTEA NR.3, BL.33B, SC.1, ET.3, AP.22, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
• **CIOBANU CRISTINA**, STR.LT.DUMITRU GEORGESCU NR.10, SAT MIHAI BRAVU, GR, RO;
• **IRIMIA LAURENȚIU CEZAR**, STR.SERBOTA NR.3, BL.V20, SC.3, ET.2, AP.71, SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO;
• **DRAGAN STELA DANIELA**, ALEEA STUPILOR NR.7, BL.F8, SC.1, ET. 4, AP.14, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR HIDROGELURI COMPOZITE PE BAZĂ DE COLAGEN ȘI NANOPARTICULE DE ARGINT PENTRU PREVENIREA INFECȚIILOR DE PLAGĂ**

(57) Rezumat:

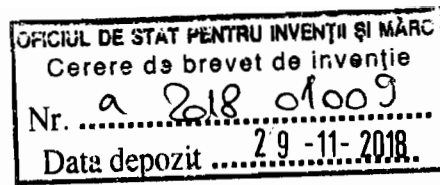
Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor hidrogeluri compozite pe bază de colagen și nanoparticule de argint pentru prevenirea infecțiilor de plagă. Procedeu, conform invenției, constă în reducerea ionilor de Ag direct, *in situ*, în gelul de colagen, în prezență de agenți reducători de tip NaBH₄, acid citric, urmată de reticularea hidrogelului în prezența unui agent de reticulare de tip glutaraldehidă, rezultând o

matrice colagenică cu un conținut de nanoparticule de Ag în domeniul 0,1...5%, având activitate antimicrobiană față de bacterii Gram-pozitive și Gram-negative în suspensie și aderate, și activitate imunomodulatoare.

Revendicări: 3
Figuri: 16

Cu începere de la data publicării cererii de brevet, cererea asigură, în mod provizoriu, solicitantului, protecția conferită potrivit dispozițiilor art.32 din Legea nr.64/1991, cu excepția cazurilor în care cererea de brevet de invenție a fost respinsă, retrasă sau considerată ca fiind retrasă. Întinderea protecției conferite de cererea de brevet de invenție este determinată de revendicările conținute în cererea publicată în conformitate cu art.23 alin.(1) - (3).





!!!

DESCRIEREA BREVETULUI: PROCEDEU DE OBTINERE A UNOR HIDROGELURI COMPOZITE PE BAZĂ DE COLAGEN ȘI NANOPARTICULE DE ARGINT PENTRU PREVENIREA INFECȚIILOR DE PLAGĂ

Vindecarea plăgilor cutanate este un proces dinamic și complex care implică matricea extracelulară, mediatori solubili și activarea diferitelor tipuri celulare. În cadrul unui proces normal de vindecare, există o tranziție specifică de la fază inflamatorie la regenerarea tisulară urmată de angiogeneza și reorganizare tisulară (Dovi JV, Szpaderska AM 2004). Procesul de vindecare este încetinit de existența unei faze inflamatorii prelungite și a țesutului necrotic care favorizează aderența și proliferarea bacteriană, precum și formarea de biofilme (Zhao și colab., 2013). Biofilmele microbiene sunt prezente la aproximativ 6% din rănilor acute și la peste 90% din rănilor cronice (Attinger and Wolcott, 2012). În general, infecțiile cu producere de biofilme au o progresie lentă dar, odată stabilite, sunt greu de combatut (Lazăr și colab., 2010).

Managementul plăgilor cutanate rezidă în utilizarea tratamentelor locale cu scopul prevenirii / tratamentului infecțiilor de plagă și al regenerării tisulare rapide și eficiente. Structurile colagenice umede și uscate sunt considerate în prezent una dintre strategiile cele mai eficiente în tratamentul plăgilor cutanate acute și cronice (Grigore și colab., 2017).

Nanoparticulele anorganice prezintă numeroase aplicații în domeniul biomedical și în industria farmaceutică. Anumite tipuri, precum cele metalice, de argint (Ag), cupru (Cu), titan (Ti), fier (Fe) și zinc (Zn), au demonstrat activități antimicrobiene semnificative, fiind în prezent investigate pentru dezvoltarea de noi strategii antimicrobiene, ca alternative la utilizarea antibioticelor. Este binecunoscut faptul că argintul utilizat în diferite forme (ex. forma elementală, compusi anorganici sau formulări organice sau anorganice) poate avea un pronunțat efect antimicrobian și chiar favorizează vindecarea plăgilor atunci când este inclus în diferite pansamente (Michaels și colab., 2009).

Problema pe care invenția o rezolvă constă în inhibarea biofilmelor microbiene, una dintre cauzele principale ale întârzierii vindecării plăgilor cronice ale pacienților cu alte afecțiuni de fond (e.g., diabet, tulburări circulatorii etc). Plăgile cronice reprezintă o nișă favorabilă pentru dezvoltarea biofilmelor datorită răspunsului imunitar alterat care crește sensibilitatea la infecții, pe când țesutul necrotic ce apare local favorizează aderența microbiană. Biofilmele formate la

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Universitatea din
București

Universitatea
Politehnica
București

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Catalin-Robertino
HIDEG

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

nivelul plăgilor cronice influențează funcționarea celulelor implicate în vindecarea răni (neutrofile, celule endoteliale, fibroblaste), răspunsul imunitar cutanat și angiogeneza (Mihai și colab., 2018). Majoritatea hidrogelurilor sau pansamentelor pe bază de colagen disponibile pe piața internațională sunt produse colagenice care se utilizează cu precauție în tratamentul plagilor, fiind manipulate de regulă de către personalul medical instruit și, cu toate că prezintă numeroase avantaje în vindecarea rănilor cutanate, majoritatea nu prezintă și efect antimicrobian.

Soluția pe care o propune prezența invenției este dezvoltarea de hidrogeluri (multi)funcționale avansate, pe bază de colagen și nanoparticule anorganice cu efect antimicrobian, care să faciliteze vindecarea plăgilor cutanate acute și cronice chiar și în cazul unor infecții asociate. De noile produse ar putea să beneficieze persoane vârstnice, paraplegici sau imobilizați din alte cauze, boli cronice (i.e. diabet), dar și persoane active cu diferite răni cronice, arsuri, afecțiuni chimice ale pielii, traume de suprafață sau profunde și traume mecanice.

Avantajele invenției:

Biomaterialele pe bază de colagen și nanoparticule de argint prezintă avantajul că favorizează vindecarea rănilor prin:

- Asigurarea unui precursor de piele;
- menținerea unor parametri optimi de umiditate și aerare;
- biocompatibilitate;
- proprietăți hemostatice;
- prevenirea formării biofilmelor microbiene.

Se prezintă în continuare exemple ale invenției în legătură cu:

Fig. 1. Modul de obținere al materialelor colagenice cu nanoparticule de Ag (în una sau două etape).

Tabelul 1. Descrierea tehnică a materialelor colagenice obținute.

Fig. 2. Morfologia celulelor HeLa dezvoltate pe suprafața, la zona de contact și la distanță de materialul colagenic

Fig. 3. Cuantificarea viabilității celulare în prezența materialelor colagenice cu Ag.

SANIMED INTERNATIONAL IMPEX SRL	Universitatea din București	Universitatea Politehnica București	Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București
Catalin-Robertino HIDEG	Prof. dr. Mircea DUMITRU	Prof.dr. Mihnea COSTOIU	Dr. Carmen Cristina DIACONU

Fig. 4. Expresia markerilor de inducere a apoptozei prin mecanisme extrinseci în prezența materialelor colagenice cu Ag.

Fig. 5. Expresia markerilor de activare a metabolismului celular în prezența materialelor colagenice cu Ag.

Fig. 6. Histogramele suprapuse ale ciclului celular al celulelor HeLa menținute în prezența materialelor colagenice cu Ag.

Fig. 7. Reprezentare dot blot a activării celulelor THP-1 în prezența materialor colagenice (h-CLAT -*human cell line activation test*)

Fig. 8. Expresia citokinelor inflamatorii în culturi de celule epiteliale în prezența materialelor colagenice cu Ag.

Fig. 9. Reprezentarea grafică a efectului antimicrobian al materialelor colagenice cuantificat prin metoda calitativă.

Fig. 10. Reprezentarea grafică a efectului antimicrobian al materialelor colagenice cuantificat prin metoda cantitativă față de celule microbiene planctonice.

Fig. 11. Reprezentarea grafică a efectului antimicrobian al materialelor colagenice cuantificat prin metoda cantitativă față de celulele microbiene aderente.

Fig. 12. Pregătirea animalului, excizia bioptică a unei porțiuni din piele, și implantarea materialului colagenic.

Fig. 13. Aspectul plăgii la 4 zile de la implantarea materialului colagenic.

Fig. 14. Aspectul plăgii la 4 zile de la inocularea bacteriană și implantarea materialului colagenic.

Fig. 15. Analiza expresiei IL-1 la nivelul plăgii

Fig. 16. Analiza histopatologica al nivelul plăgii

EXEMPLUL 1. OBȚINEREA HIDROGELURILOR COMPOZITE PE BAZĂ DE COLAGEN ȘI NANOPARTICULE DE ARGINT

Colagenul a fost obținut prin solubilizare în mediu acid, în prezența enzimei proteolitice pepsină. Metodologiile de implementare s-au desfășurat în arii de lucru dedicate pentru fiecare operație, cu condiții de mediu și igienă controlate. Pentru obținerea materialului colagenic, au fost exploatate surse bogate de colagen, respectiv materii prime de origine bovină sau ecvină, de origine controlată din punct de vedere sanitar-veterinar. Materia prima atent selecționată și cu trasabilitate înregistrată, a fost supusă procesului de prelucrare primară manuală (etapă tehnologică preliminară, ce presupune o succesiune de operații, respectiv de dezghețare

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Universitatea din
București

Universitatea
Politehnica
București

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Catalin-Robertino
HIDEG

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

controlată, decontaminare, îndepărtarea părților necolagenice sau lipidice, spălare cu minim cinci volume de apă pură, raportate la materia prima prelucrată), dar și unei prelucrări secundare (etapă tehnologică controlată, ce presupune mărunțirea materiei prime, cu ajutorul unei echipament de tip tocător industrial, cu sită Sirman, cu diametrul ochiurilor de 3-5 mm). Materia prima astfel prelucrată, a fost porționată, sub formă de pachete gata de utilizare și supuse congelării rapide la $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Au fost respectate regulile de control interfazic specific materiilor prime de origine animală, iar loturile de materii prima utilizate s-au introdus în bază de date privind trasabilitatea extinsă a produsului.

Materia primă de origine bovină, a fost supusă unui procedeu de tratare enzimatică, în mediu acid, în scopul solubilizării colagenului. A fost utilizat un echipament de tip omogenizator industrial prevăzut cu cuve interschimbabile cu capacitatea utilă de 50 L, care asigură o bună omogenitate în masă de reacție, cu viteză de rotație controlată (de minim 40 rotații/minut). Amestecul de extracție a colagenului, a presupus un mediu acid (pH 2-3), asigurat de o soluție de acid acetic 0.5M (20L), enzimă preteolitică, pepsină raportul dintre pepsină și substanță uscată a țesutului luat în lucru, fiind de 1:99-1:5, ca de exemplu 1:9. Solubilizarea colagenului s-a desfășurat pe o perioadă de 48 de ore, în condiții controlate de temperatură ($20\text{-}25^{\circ}\text{C}$), cu agitate intermitentă monitorizată (40 de rotații/minut, timp de 20 minute la fiecare oră). Îndepărtarea țesutului nedigerat s-a realizat prin centrifugare ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$, 9000 rpm, timp de 15 minute), obținându-se un gel de colagen, cu o valoare de pH 2.3-2.5, cu aspect albicios-translucid, cu consistență vâscoasă. Purificarea colagenului a fost realizată prin dializă, față de apă pură, sau prin diafiltrare, utilizând coloane ceramice (cu porozitatea echivalentă de 20 nm), în contracurent față de circuitul gelului de colagen, până la ajustarea valorii pH-ului în intervalul 6.5-7.

Hidrogelurile compozite pe bază de colagen și nanoparticulele de Ag au fost obținute prin reducerea Ag^+ la Ag^0 , *in-situ* (prin adăugarea reactanților în hidrogelul de colagen) denumită ulterior “într-o etapă”, respectiv obținerea în prealabil a nanoparticulelor metalice și adăugarea ulterioară a hidrogelului de colagen, denumită ulterior “în două etape”. În ambele cazuri probele au fost supuse omogenizării mecanice viguroase, în vederea obținerii unei distribuții cât mai uniforme a particulelor în masa polimerică. În acest sens s-a utilizat ca agent reducător, NaBH_4 ,

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Universitatea din
București

Universitatea
Politehnica
București

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Catalin-Robertino
HIDEG

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

respectiv un amestec reducător bazat pe efectul sinergetic al NaBH_4 și acidului citric (reducător biocompatibil, de tipul antioxidanților, dar cu efect reducător cunoscut ca fiind mai redus decât cel al NaBH_4). Ionii citrat joacă și alte roluri în procesul de reducere a ionilor de argint, precum agent de stabilizare și de complexare. În vederea controlării morfologiei particulelor metalice obținute și menținerii acestora sub formă dispersată, în procesul de sinteză s-a folosit PVP (polivinilpirolidonă), ce favorizează obținerea de structuri plachetare, triunghiulare cu colțuri teșite. Pentru reticularea la rece timp de minim 24h a colagenului s-a utilizat o soluție diluată de glutaraldehidă. Materialele compozite rezultate sunt rezumate în tabelul 1.

Pentru obținerea tuturor hidrogelurilor compozite s-a folosit drept precursor o soluție apoasă diluată de AgNO_3 10^{-4} M și borohidruură de sodiu (NaBH_4) 1 M. În cazul probelor cu agent reducător mixt și agent dispersant, s-au folosit acid citric 0.3M, respectiv polivinilpirolidonă (PVP) 0,007 M. În final s-au adăugat 5 mL de apă oxigenată 30% și a fost menținută agitarea pentru aproximativ 10 minute până când s-a obținut culoarea albastru ușor închis (culoare datorată dimensiunii nanoparticulelor).

În vederea analizării gradului de eliberare a nanoparticulelor din constituția hidrogelurilor, a fost utilizată spectrometria de masă cu plasmă cuplată inductiv (ICP-MS). Această modalitate de analiză elementală este indicată în cazul în care se dorește analizarea unor cantități reduse de probă, în care concentrația analitului este mică (de ordinul ppt sau ppb). În acest sens, au fost realizate soluții de aceeași concentrație de hidrogeluri pe bază de colagen și Ag în tampon fosfat salin din care au fost recoltate probe la intervale fixe de timp și analizate cu ajutorul ICP-MS. Rezultatele obținute în cazul probelor cu Ag evidențiază o eliberare lentă a nanoparticulelor din hidrogel, concentrația de argint din soluția de PBS fiind de $\sim 28 \mu\text{g/L}$ după 120h de la imersare. Acest aspect demonstrează că materialele obținute pot asigura o protecție antimicrobiană prelungită, 5-7 zile, fără a necesita înlocuire, în cazul în care sunt utilizate ca pansamente.

În figura 1 este reprezentată schema fluxului tehnologic de obținere a hidrogelurilor compozite pe baza de colagen și nanoparticule de argint (într-o etapă, respectiv în două etape).

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Universitatea din
București

Universitatea
Politehnica
București

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Catalin-Robertino
HIDEG

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

EXEMPLUL 2. ANALIZA CALITATIVĂ ȘI CANTITATIVĂ A TOXICITĂȚII MATERIALELOR COLAGENICE CU AG ȘI A MECANISMELOR INTIME DE INTERACȚIUNE CU CELULELE MAMALIENE

Pentru analiza cantitativă a toxicității induse de hidrogelurile colagenice cu Ag a fost utilizată linia celulară aderentă HeLa (*American Cell Type Collection* [ATCC] CCL-2). Eșantioanele de materiale colagenice cu Ag (2cm²) sterilizate în prealabil prin iradiere UV au fost distribuite în plăci cu 6 godeuri, după care au fost spălate cu ser fiziologic steril și echilibrate în mediu, cu stabilizarea valorii pH la 7,2-7,4. Ulterior, în fiecare godeu conținând câte un fragment de materiale colagenice cu Ag s-au adăugat 3x10⁶ celule. Plăcile au fost incubate în mediu Dulbecco modificat (DMEM:F12) (Sigma, USA), suplimentat cu ser bovin fetal 10% inactivat termic (Sigma, USA), la 37 °C, în atmosferă umedă cu 5% CO₂, timp de 24 de ore. Morfologia celulelor a fost observată la microscopul Zeiss Observer D1 și celulele au fost fotografiate în contrast de fază utilizând camera AxioCam MRm.

Celulele dezvoltate la zona de contact cu materialele colagenice cu Ag prezintă o morfologie specifică celulelor apoptotice, moarte (figura 2). Ulterior, materialele colagenice cu Ag au fost scoase din plăcile de cultură, fixate în alcool și colorate cu iodura de propidiu. Ulterior, ambele fețe ale fiecărui produs au fost examinate la microscopul de fluorescență, confirmându-se faptul că celulele HeLa nu au aderat la materialele colagenice.

Cuantificarea toxicității induse de materialele colagenice cu Ag a fost realizată utilizând testul albastru tripan și rezultatele sunt prezentate ca % viabilitate raportat la control în figura 3. Viabilitatea celulelor HeLa a fost > 60% pentru toate materialele testate, și > 80% pentru AgNO₃, collagen + NaBH₄ într-o etapă și AgNO₃, NaBH₄, acid citric, PVP + collagen în două etape, procent care, conform standardelor de evaluare a citotoxicității biomaterialelor, indică un nivel de citotoxicitate redusă.

Pentru evaluarea mecanismelor de inducere a toxicității, celulele menținute timp de 24h în prezența hidrogelurilor compozite pe baza de Ag au fost tripsinizate, centrifugate, și supuse extracției ARN cu *Trizol* (Thermo Fisher Scientific, SUA), conform protocolului producătorului.

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Universitatea din
București

Universitatea
Politehnica
București

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Catalin-Robertino
HIDEG

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

ARN extras a fost uscat pe gheață și resuspendat în 20 μ L apă fără nucleaze. Concentrația și puritatea ARN a fost determinată cu ajutorul spectrofotometrului *Eppendorf BioPhotometer plus* (Eppendorf, Germania). ARN total a fost revers-transcris folosindu-se kit-ul *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase inhibitor* (Thermo Fisher Scientific, SUA) pornind de la 2 μ g ARN. Reacția de revers-transcriere s-a realizat în *thermocycler-ul BioRad DNA ENGINE Dyad*, folosind programul: 25 °C, 10 min.; 37 °C, 120 min.; 85 °C, 5 min. În reacția de qPCR au fost introduse câte 50 ng ADNc pentru fiecare probă, mixul de amplificare conținând și mix de reacție, *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, SUA), și primeri, *Taqman Gene Expression Assays* (Thermo Fisher Scientific, SUA) după cum urmează: *Casp7* (Hs00169152_m1), *Casp8* (Hs00154256_m1), *Casp9* (Hs00154261_m1), *BAX* (Hs00180269_m1), *BCL2* (Hs00153350_m1), *MCL1* (Hs00172036_m1), *ARRB1* (Hs00244527_m1) și *TRPC1* (Hs00608195_m1). Cuantificarea nivelului de expresie a fost realizată pe aparatul *StepOne Plus Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, SUA), fiecare experiment fiind realizat în triplicat. Condițiile reacției de amplificare au fost: 95 °C, 10 min.; 40 x (95 °C, 15 sec.; 60 °C, 1 min.). Rezultatele au fost analizate cu *StepOne Software v2.3* (Thermo Fisher Scientific, SUA), compararea nivelurilor de expresie relative fiind realizată prin metoda $\Delta\Delta C_T$. În calitate de control endogen a fost utilizat nivelul de expresie al genei *GAPDH*.

Apoptoza poate fi inițiată prin una din cele două căi separate (calea intrinsecă sau extrinsecă), ambele conducând la faza finală, efectoare, de execuție. În prezența materialelor colagenice, calea intrinsecă, declanșată de stimuli interni (stres biochimic, alterarea ADN, starvare, etc) este inhibată, prin rducerea expresiei genelor pentru caspaza 9 și proteinele Bcl2 și Bax. În schimb, calea extrinsecă, declanșată prin legarea ligandului la receptorii "moarte" de pe suprafața celulei (TNFR1/ FAS) este activată de către hidrogelurile colagenice dopate cu Ag producându-se inițierea activării caspazelor în aval, respectiv caspaza 8 și caspaza 7 (figura 4).

Beta-arrestin 1 (ARRB1) este o proteină adaptor, cu o gamă largă de funcții celulare și moleculare, inclusiv în reglarea hipoxiei celulare prin co-localizarea și interacția fizică cu HIF1a, care facilitează absorbția glucozei și glicoliza. Modularea expresiei ARB1 sub influența materialelor colagenice demonstrează interferența cu metabolismul celular (figura 5). Astfel,

SANIMED INTERNATIONAL IMPEX SRL	Universitatea din București	Universitatea Politehnica București	Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București
Catalin-Robertino HIDEG	Prof. dr. Mircea DUMITRU	Prof.dr. Mihnea COSTOIU	Dr. Carmen Cristina DIACONU

materialele AgNO₃, colagen, acid citric, PVP, NaBH₄ și respectiv, AgNO₃, NaBH₄, colagen au indus scăderea semnificativă a acestei proteine, în timp ce AgNO₃, colagen + NaBH₄ într-o etapă și AgNO₃, NaBH₄, acid citric, PVP + colagen în două etape au indus creșterea expresiei acestei proteine.

TRPC1 (Transient receptor potential channel 1) modulează concentrațiile intracelulare de Ca²⁺, controlând evenimentele critice citosolice și nucleare. O caracteristică tipică a canalelor TRP este capacitatea lor de a fi activate de o gamă largă de stimuli externi (inclusiv lumina, sunetul, substanțele chimice, temperatura și atingerea), precum și de schimbările din mediul local (Venkatachalam și Montell, 2007, Nilius și Owsianik, 2011). TRPC1 este o componentă importantă a răspunsului la hipoxie. Expresia crescută a TRPC facilitează influxul de Ca, fenomen facilitat de hipoxie. Astfel, scăderea drastică a expresiei TRPC1 în prezența materialelor colagenice cu Ag, susține ipoteza că acestea nu sunt inductori ai hipoxiei, și nu facilitează influxul de calciu (figura 5).

EXEMPLUL 3. ANALIZA INFLUENȚEI MATERIALELOR COLAGENICE CU AG ASUPRA CICLULUI CELULAR AL CELULELOR HELA

Celulele HeLa menținute timp de 24h în prezența hidrogelurilor compozite pe baza de Ag au fost tripsinizate, spălate în tampon fosfat salin (TFS) și fixate în 1 ml etanol 70% rece, cel puțin 30 de minute la -20°C. Ulterior, celulele au fost spălate în TFS, resuspendate în 100 μl TFS, tratate cu RNAză (concentrație finală 1 mg/ml) la 37°C timp de 30 minute și colorate cu PI (concentrație finală 100 μg/mL) timp de 30 de minute la 37°C, cu agitare periodică. Probele au fost citite la citometrul în flux Beckman Coulter XLM și analizate cu programul FlowJo.

Analiza ciclului celular a arătat că hidrogelurile compozite nu interferează cu fazele ciclului celular al celulelor HeLa menținute în prezența materialelor (figura 6).

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Catalin-Robertino
HIDEG

Universitatea din
București

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Universitatea
Politehnica
București

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

EXEMPLUL 4. ANALIZA INFLUENȚEI MATERIALELOR COLAGENICE CU AG ASUPRA ACTIVĂRII CELULARE (H-CLAT -HUMAN CELL LINE ACTIVATION TEST)

În acest exemplu s-a utilizat linia de celule THP-1 [ATTC TIB-202], (o linie celulară de leucemie monocitică umană) ca un surogat pentru celulele dendritice dermice. Această metodă de testare utilizează celule surogat pentru a evalua migrarea celulelor dendritice cutanate la ganglionii limfatici adiacenți. Un eveniment de sensibilizare a pielii conduce la creșterea expresiei CD54 și / sau CD86 care este utilizat pentru evaluarea activării celulare (Ashikaga și colab., 2010; Reisinger și colab., 2015; Galbiati și colab., 2016).

Astfel, 4×10^5 celule THP-1 au fost însămânțate în plăci cu 24 de godeuri în mediu RPMI suplimentat cu 10% ser fetal bovin. La acestea s-a adăugat eșantionul de material colagenic cu Ag (1 cm^2). La 24 de ore materialul colagenic a fost îndepărtat, iar celulele au fost centrifugate, marcate cu CD86 (B72) -PC5.5 (Beckman Coulter B30647) și anti HLA-DR-Pacific Blue (Beckman Coulter A74781). Celulele marcate au fost analizate la citometrul în flux MoFLO Astrios Beckman Coulter (utilizând 488-710/45 Height log (CD86-PC5.5) și 405 – 448/59 Height log (anti HLA-DR-Pacific Blue). Analiza s-a realizat utilizând software-ul Kaluza Analysis version 1.3.

După îndepărtarea materialului colagenic testat, expresia CD86 și HLA-DR a fost cuantificată prin citometrie în flux. Valoarea relativă a fluorescenței comparativ cu controlul (celule menținute fără material colagenic) este prezentată în figura 7. Rezultatele demonstrează că materialele colagenice cu Ag nu induc activarea celulelor THP-1.

EXEMPLUL 5. INFLUENȚA MATERIALELOR COLAGENICE CU AG ASUPRA EXPRESIEI CITOKINELOR INFLAMATORII ÎN CULTURI DE CELULE EPITELIALE

ARN total a fost extras utilizând reactivul *Trizol* (Thermo Fisher Scientific, SUA) și revers-transcris folosindu-se kit-ul *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase inhibitor* (Thermo Fisher Scientific, SUA) conform protocoalelor anterioare. Reacția qPCR s-a

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Universitatea din
București

Universitatea
Politehnica
București

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Catalin-Robertino
HIDEG

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

realizat utilizând kit-ul *TaqMan Gene Expression Master Mix* (Thermo Fisher Scientific, SUA), și primeri, *Taqman Gene Expression Assays* (*IL1B* (Hs01555410_m1), *IL6* (Hs00174131_m1), *IL8* (Hs00174103_m1).

Rezultatele prezentate în figura 8 arată că hidrogelurile colagenice cu Ag induc o creștere a expresiei citokinelor pro-inflamatorii IL6 și IL-8, dar scăderea expresiei IL-1. Este binecunoscut faptul că inflamația (denumită și faza de lag a vindecării unei ulcerării), reprezintă o etapă esențială pentru vindecarea rănilor. Această fază este mediată de leucocite, care, cu ajutorul radicalilor reactivi ai oxigenului cu proprietăți bactericide și proteazelor eliberate, îndepărtează prin digestie enzimatică celulele tisulare moarte și celulele bacteriene; inflamația durează câteva zile, finalizându-se cu apoptoza celulelor inflamatorii (Gilroy și colab., 2004; Eming și colab., 2007). IL-6 este mediator esențial al răspunsului de fază acută, consecutiv leziunii tisulare și se caracterizează prin febră, leucocitoză, creșterea permeabilității vasculare. IL-8 este o chemokină cu efect chemotactic față de neutrofile, eozinofile și favorizează răspunsul inflamator. Mărește densitatea moleculelor de aderență pe membrana neutrofilelor. IL-8 stimulează activarea neutrofilelor (migrare transendotelială, eliberarea enzimelor lizosomale, intensificarea metabolismului oxidativ, generarea anionului superoxid în focarul inflamator). Are efecte asupra celulelor nelimfoide: este haptotactică (induce migrarea celulelor epiteliale spre suprafață). Așadar creșterea nivelului acestor citokine în prezența materialelor colagenice ce favorizează afluxul de leucocite la situsul leziunii cutanate și instalarea fazei inflamatorii acute. Diminuarea nivelului de IL-1 poate fi considerată un rezultat pozitiv, deoarece diferite studii au indicat corelația dintre tendința de cronicizare și întârziere a vindecării plăgilor și nivelul ridicat de IL-1 (Jiang și colab., 2014).

EXEMPLUL 6. ANALIZA CALITATIVĂ A EFECTULUI ANTIMICROBIAN

Pentru evidentierea efectului antimicrobian al hidrogelurilor compozite pe bază de colagen și nanoparticulele de Ag, s-au utilizat următoarele tulpini:

- *Pseudomonas aeruginosa* (1 tulpina de laborator, *P. aeruginosa* ATCC 27853 și 1 izolat clinic, *P. aeruginosa* 202 = izolat din secreție plagă, tulpină multirezistentă);

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Universitatea din
București

Universitatea
Politehnica
București

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Catalin-Robertino
HIDEG

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

- *Staphylococcus aureus* (1 tulpină de laborator, *S. aureus* ATCC 25923 și 1 izolată clinic, *S. aureus* MRSA 2 = rezistentă la meticilină, izolată din secreție plagă).

Tulpinile au fost menținute pe bulion nutritiv cu 20% glicerol la -80°C . Pentru testele antimicrobiene microorganismele au fost însămânțate pe geloză nutritivă (tulpinile bacteriene). Coloniile obținute au fost utilizate pentru obținerea de suspensii în AFS (apă fiziologică sterilă) de densitate optică 0,5 Mc Farland ($1-3 \times 10^8$ UFC/mL).

Pentru a realiza analiza calitativă a efectului antimicrobian, s-a utilizat o metodă derivată de la metoda standardizată a antibiogrammei (Kirby Bauer). Pe un mediu agarizat repartizat în placi Petri se însămânțează microorganismul de testat în pânză cu tamponul. Ulterior se dispun la distanțe egale (aprox 3cm) eșantioanele de pansamente de colagen deshidratate, de dimensiuni egale (diametrul 6mm și grosime de 3mm), sterilizate în prealabil prin expunere la UV timp de 20 min pe fiecare parte. Pentru testarea suspensiilor de nanoparticule utilizate în obținerea hidrogelurilor de colagen funcționalizate cu nanoparticule, pe plăcuțele Petri însămânțate în pânză se adaugă discuri de hârtie de filtru sterile cu diametrul de 6mm, peste care se adaugă 10 μL din dispersiile de nanoparticule la concentrația utilizată pentru obținerea hidrogelurilor (2%, respectiv 3%).

Plăcuțele Petri se incubează timp de 18h la 37°C și ulterior se analizează dimetrele zonelor de inhibiție a creșterii apărute în jurul discurilor de colagen ce conțin diferite tipuri de nanoparticule. Rezultatele prezentate în figura 9 dovedesc faptul că materialul $\text{AgNO}_3 - \text{NaBH}_4 + \text{colagen}$ prezintă cel mai pronunțat efect antimicrobian atât pentru tulpinile de *S. aureus* cât și față de cele de *P. aeruginosa*.

EXEMPLUL 7. ANALIZA CANTITATIVĂ A EFECTULUI ANTIMICROBIAN

Inhibarea creșterii microorganismelor planctonice (plutitoare) în prezența materialelor

Pentru testarea efectului materialelor obținute asupra creșterii microorganismelor în mediu lichid (culturi planctonice), materialele obținute au fost tăiate sub forma unor discuri cu diametrul de 6 mm și grosime aprox. 3mm și sterilizate prin expunere la radiații UV timp de 20

SANIMED INTERNATIONAL IMPEX SRL	Universitatea din București	Universitatea Politehnica București	Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București
Catalin-Robertino HIDEG	Prof. dr. Mircea DUMITRU	Prof.dr. Mihnea COSTOIU	Dr. Carmen Cristina DIACONU

min pe fiecare parte. Câte un fragment de material steril a fost depus individual într-un godeu al unei plăci cu 24 godeuri sterile. Peste materialele depuse, în godeuri s-a adăugat 1 mL mediu lichid (bulion simplu) și ulterior 10 μ L suspensie microbiană de densitate 0.5 McFarland, pregătită în AFS (apă fiziologică sterilă, sol NaCl 0,9%). Plăcile cu 24 godeuri astfel pregătite, au fost incubate la 37°C timp de 24h. După expirarea timpului de incubare 200 μ L din suspensiile microbiene obținute au fost transferați în plăci cu 96 godeuri sterile și turbiditatea culturilor microbiene (absorbanța) a fost măsurată spectrofotometric la 600nm.

Pentru tulpinile de *P. aeruginosa* testate, s-au observat diferențe evidente ale inhibiției creșterii și multiplicării culturilor planctonice care aparțin tulpinii de laborator (ATCC 27853), comparativ cu rezultatele obținute pentru tulpina nosocomială testată. Astfel, în cazul tulpinii *P. aeruginosa* ATCC 27853, creșterea a fost în mod semnificativ mai redusă comparativ cu tulpina clinică 202, diferențele fiind evidente mai ales în cazul probei AgNO₃ PVP- Ac citric - NaBH₄+colagen.

În cazul tulpinilor de *S. aureus* analizate se poate observa o inhibiție a creșterii și multiplicării celulelor microbiene în suspensie în prezența tuturor tipurilor de hidrogeluri de colagen ce conțin nanoparticule bioactive de Ag, fiind constatate diferențe în inhibiția creșterii tulpinii de laborator, comparativ cu cea nosocomială (figura 10).

Inhibarea aderenței și a formării biofilmelor

Pentru testarea efectului materialelor colagenice asupra capacității de aderență și a producerii de biofilme, materialele obținute au fost tăiate sub forma unor discuri cu diametrul de 6 mm și grosime aprox. 3mm și sterilizate prin expunere la radiații UV timp de 20 min pe fiecare parte. Câte un fragment de material steril a fost depus individual într-un godeu al unei plăci cu 24 godeuri sterile. Peste materialele depuse, în godeuri s-a adăugat 1 mL mediu lichid (bulion simplu) și ulterior 10 μ L suspensie microbiană de densitate 0.5 McFarland, pregătită în AFS (apă fiziologică sterilă, sol NaCl 0,9%). Plăcile cu godeuri astfel pregătite, au fost incubate la 37°C timp de 24 h. După incubare materialele au fost spalate cu AFS și mediul a fost schimbat, pentru dezvoltarea biofilmelor pe suprafața acestora. Plăcuțele au fost incubate pentru 24h. După

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Universitatea din
București

Universitatea
Politehnica
București

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Catalin-Robertino
HIDEG

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

expirarea perioadei de incubare, eșantionul pe care s-a dezvoltat biofilmul a fost spălat cu AFS și depus într-un tub Eppendorf steril într-un mL AFS. Tubul a fost vortexat energetic timp de 30 s și sonicat 10 s pentru desprinderea celulelor din biofilm. Suspensia celulară obținută a fost diluată și diferite diluții au fost însămânțate pe plăci cu mediu de cultură solidificat în vederea obținerii și cuantificării numărului de unități formatoare de colonii (UFC)/ mL.

Analiza capacității de aderență și dezvoltare a biofilmelor microbiene pe suprafața eșantioanelor de colagen obținute arată că acest fenotip este semnificativ redus pe suprafața hidrogelurilor deshidratate ce conțin nanoparticule de Ag în diferite variante. Atât în cazul tulpinilor de *P. aeruginosa* cât și al celor de *S. aureus*, cel mai pronunțat efect antibiofilm s-a înregistrat în cazul materialelor de colagen și nanoparticule de Ag obținute în două etape cu agent reducător NaBH₄ (AgNO₃ + NaBH₄ + colagen) (figura 11).

EXEMPLUL: ANALIZA *IN VIVO* A EFICIENȚEI ANTIBACTERIENE A MATERIALELOR COLAGENICE CU AG

Pentru studierea proceselor reparatorii și eficienței antibacteriene a materialelor nanostructurate s-a utilizat modelul rănirii excizionale. Experimentele utilizând soareci albi de laborator CD1 (*Mus musculus*) au fost avizate de către Direcția Sanitar Veterinară și pentru Siguranța Alimentelor (Autorizație nr. 310 din 31.10.2016 /proiect NanoColaGel).

Protocolul de implantare a materialului nanostructurat a presupus parcurgerea următoarelor etape: anestezia și prepararea pentru operație: animalele au fost anesteziate prin injectarea intraperitoneală a unui amestec de silazină 10mg/Kgc și ketamina 80-100 mg/Kgc asigurându-se faptul că reflexele membrilor sunt supresate. S-a așezat șoarecele în poziția pentru experiment și ulterior a fost pregătită regiunea unde urma să aibă loc incizia: părul a fost tuns cu mașina de tuns, s-a aplicat cremă epilatoare aprox 3 minute, iar după îndepărtarea acesteia pielea a fost dezinfectată cu alcool 70%. A fost realizată o dublă excizie la nivelul părții dorsale a șoarecelui utilizând o preducea cu diametru de 8mm (figura 12), care se întinde până la nivelul mușchiului *paniculosus carnosus*.

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Universitatea din
București

Universitatea
Politehnica
București

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Catalin-Robertino
HIDEG

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

Pentru evaluarea eficienței antibacteriene, un inocul de 50 μ l de cultură bacteriană (*Staphylococcus aureus*) de 24 de ore de densitate 1McFarland a fost administrat la nivelul fiecărei excizii. După perioada de adsorbție a inoculului, la nivelul fiecărei excizii a fost aplicat filmul de material colagenic cu Ag care a fost cusut cu fir resorbabil în puncte (figurile 12, 13). După operație, animalele au fost menținute în cuști individuale, la căldură și monitorizate zilnic, pentru diverse semne clinice, pierderea în greutate și închiderea ranilor (figura 14).

Prelevarea probelor s-a realizat la 4 zile de la operație, când șoarecii au fost sacrificați prin dislocare cervicală, după anestezie cu dioxid de carbon (CO₂). S-a realizat o incizie în jurul răniei și s-a prelevat țesut pentru analizele de biologie moleculară cu înghețare rapidă la -80°C). ARN total a fost extras cu reactivul *Trizol* și revers-transcris folosindu-se kit-ul *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase inhibitor* conform protocoalelor prezentate anterior. Reacția qPCR s-a realizat utilizând SyBr Green și primeri specifici.

Rezultatele obținute demonstrează faptul că răspunsul inflamator indus de infecția bacteriană (nivelul mL-1) este mult diminuat în prezența AgNO₃, NaBH₄ + colagen. O diminuare mai slabă a răspunsului pro-inflamator mediat de IL-1 a fost observant de asemenea și în cazul materialului AgNO₃, colagen +NaBH₄ (figura 15). Este de remarcat efectul anti-inflamator foarte intens exercitat de materialul AgNO₃, NaBH₄ + colagen în absența infecției, ceea ce demonstrează utilitatea acestuia în managementul anumitor tipuri de plăgi cronice, caracterizate prin prelungirea excesivă a fazei inflamatorii (figura 15). Analiza histopatologica (coloratie hematoxilina-eozina) a confirmat existența unui proces inflamator redus în cazul probei AgNO₃, colagen +NaBH₄ (figura 16).

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Catalin-Robertino
HIDEG

Universitatea din
București

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Universitatea
Politehnica
București

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

REVEDICĂRI

1. Procedeu de de obținere a hidrogelurilor compozite antimicrobiene pe baza de collagen și nanoparticule de argint caracterizate prin aceea că presupune reducerea ionilor de Ag direct, in situ, în gelul de collagen, în prezență de agenți reducători (de exemplu NaBH_4 , acid citric), urmată de reticularea hidrogelului în prezența unui agent de reticulare (de exemplu, glutaraldehidă).

2. Produs obținut conform revendicării 1 caracterizat prin aceea că este alcătuit majoritar din material colagenic și nanoparticule de Ag (procedeul permite varierea conținutului de nanoparticule de Ag în domeniul 0.1 – 5%, în funcție de activitatea biologică urmărită). În funcție de modalitatea de uscare și concentrația gelului colagenic, matricea colagenică obținută poate avea diferite grade de porozitate.

3. Produsul obținut conform revendicării 2, caracterizat prin aceea că este alcătuit majoritar din material colagenic și nanoparticule de Ag (procedeul permite varierea conținutului de nanoparticule de Ag în domeniul 0.1 – 5%, prezintă activitate antimicrobiană față de bacterii Gram-pozitive și Gram-negative în suspensie și aderate și activitate imunomodulatoare, prin stimularea instalării fazei inflamatorii acute cu rol în vindecare și prevenirea prelungirii / activării excesive a acesteia.

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Catalin-Robertino
HIDEG

Universitatea din
București

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Universitatea
Politehnica
București

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

DESENE

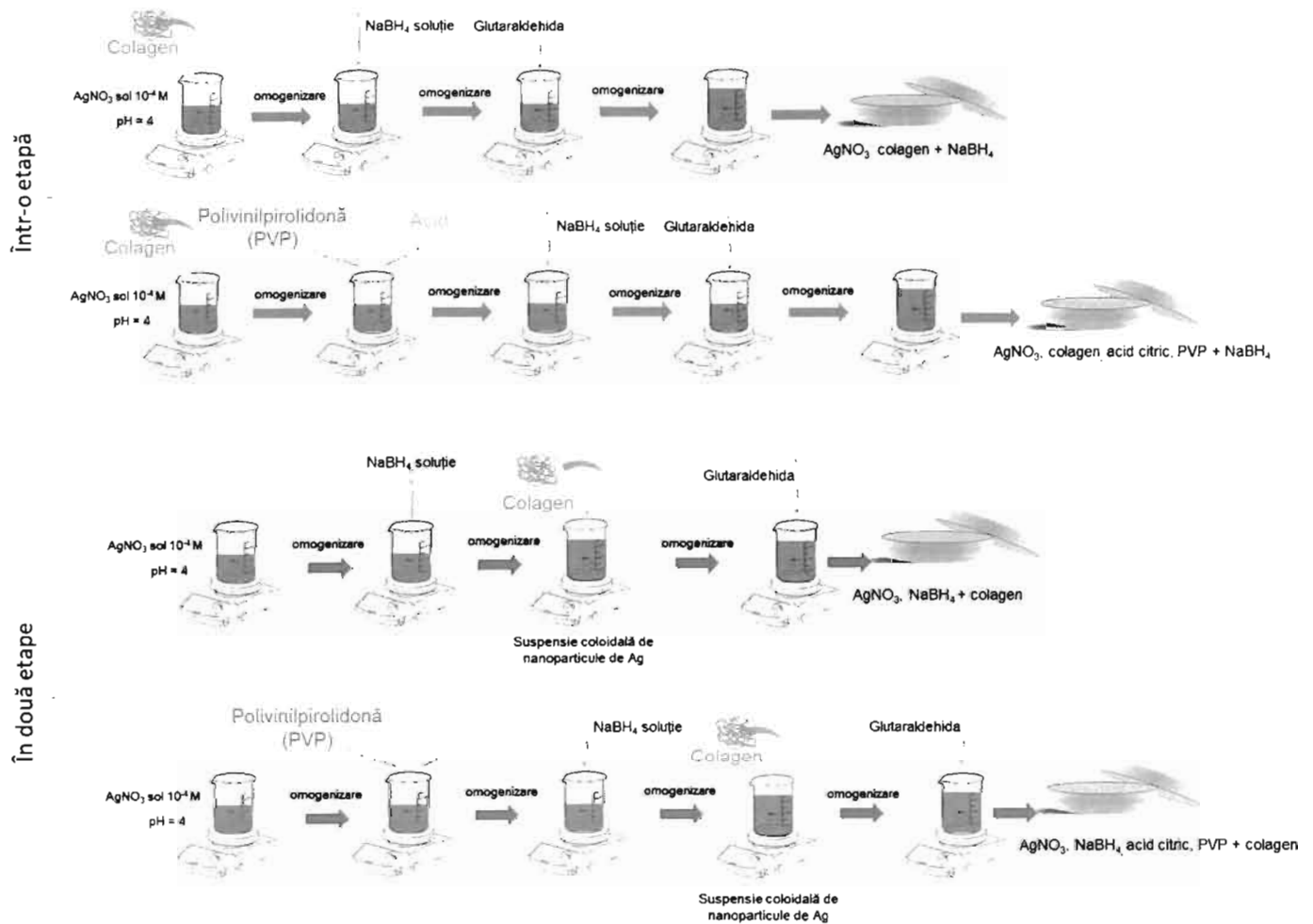


Fig. 1. Modul de obținere al materialelor colagenice cu nanoparticule de Ag (în una sau două etape).

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Catalin-Robertino
HIDEG

Universitatea din
București

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Universitatea
Politehnica
București

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

Tabelul 1. Descrierea tehnică a materialelor colagenice obținute.

Denumire probă	Metoda de obținere	Agent reducător	Agent dispersant
AgNO ₃ , NaBH ₄ + colagen	în două etape	NaBH ₄	-
AgNO ₃ , colagen + NaBH ₄	într-o etapă	NaBH ₄	-
AgNO ₃ , NaBH ₄ , acid citric, PVP + colagen	în două etape	NaBH ₄ +acid citric	PVP
AgNO ₃ , colagen, acid citric, PVP + NaBH ₄	într-o etapă	NaBH ₄ +acid citric	PVP

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Catalin-Robertino
HIDEG

Universitatea din
București

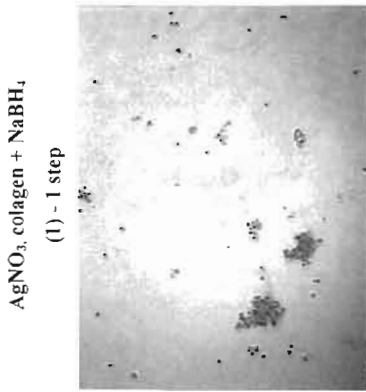
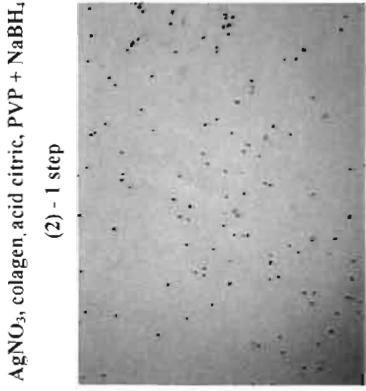
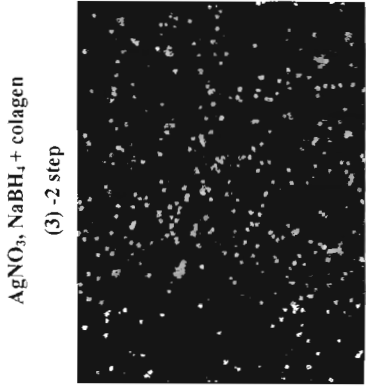
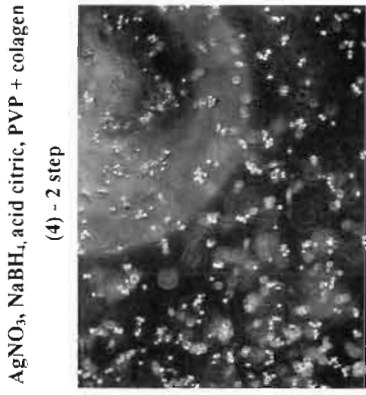
Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Universitatea
Politehnica
București

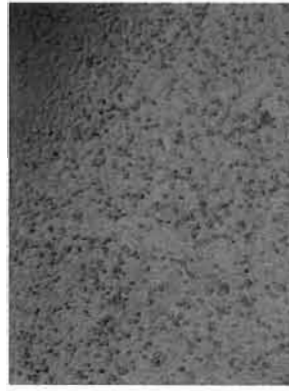
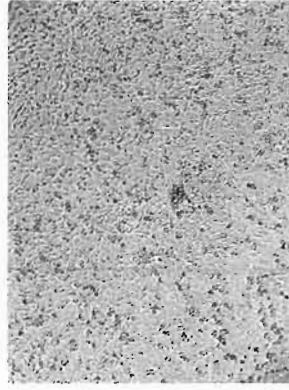
Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

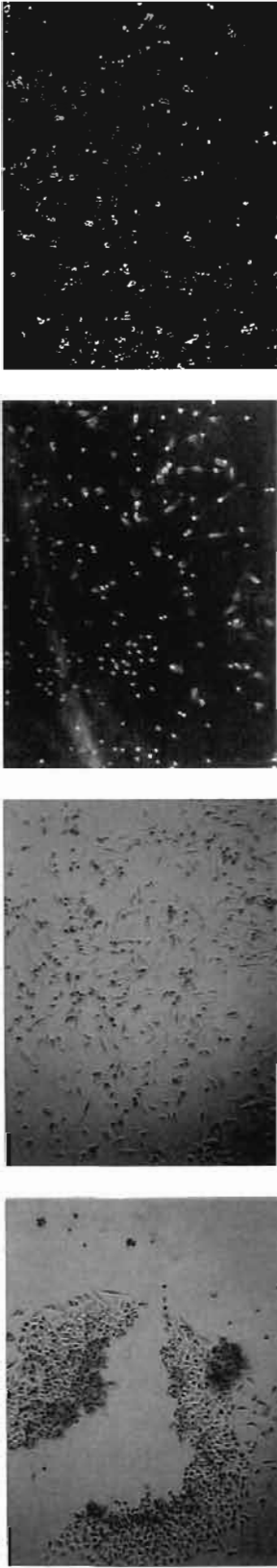


Celule deasupra materialului
colagenic



celule care nu au venit in contact cu
materialul colagenic

SANIMED INTERNATIONAL IMPEX SRL	Universitatea din București	Universitatea Politehnica București	Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București
Catalin-Robertino HIDEG	Prof. dr. Mircea DUMITRU	Prof.dr. Mihnea COSTOIU	Dr. Carmen Cristina DIACONU



celule care au venit in contact cu materialul colagenic

Fig. 2. Morfologia celulelor HeLa dezvoltate pe suprafața, la zona de contact și la distanță de materialul colagenic

SANIMED INTERNATIONAL IMPEX SRL	Universitatea din București	Institutul de Stefan S. Nicolau, București	Institutul de Stefan S. Nicolau, București
Catalin-Robertino HIDEG	Prof. dr. Mircea DUMITRU	Prof.dr. Mihnea COSTOIU	Dr. Carmen Cristina DIACONU

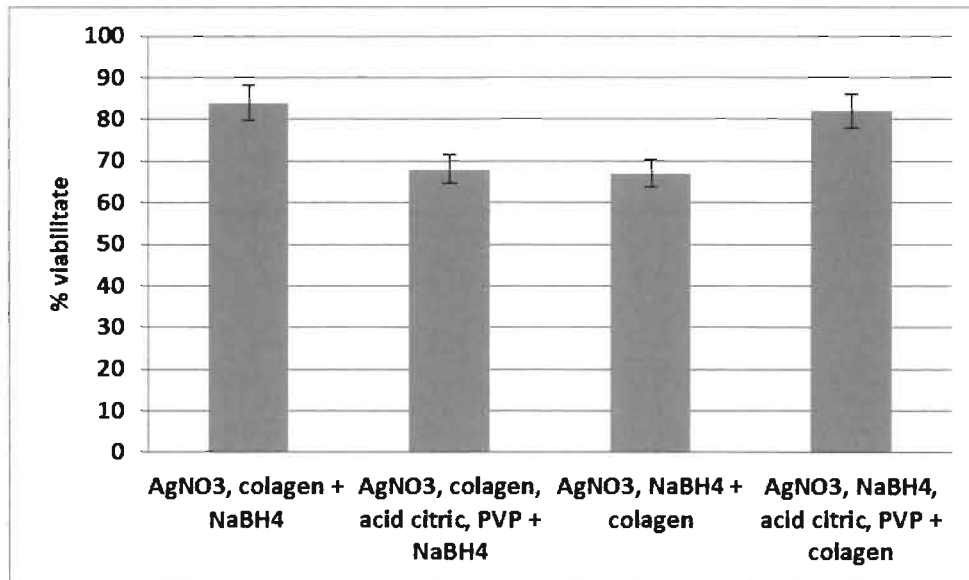


Fig. 3. Cuantificarea viabilității celulare în prezența materialelor colagenice cu Ag.

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Catalin-Robertino
HIDEG

Universitatea din
București

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Universitatea
Politehnica
București

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

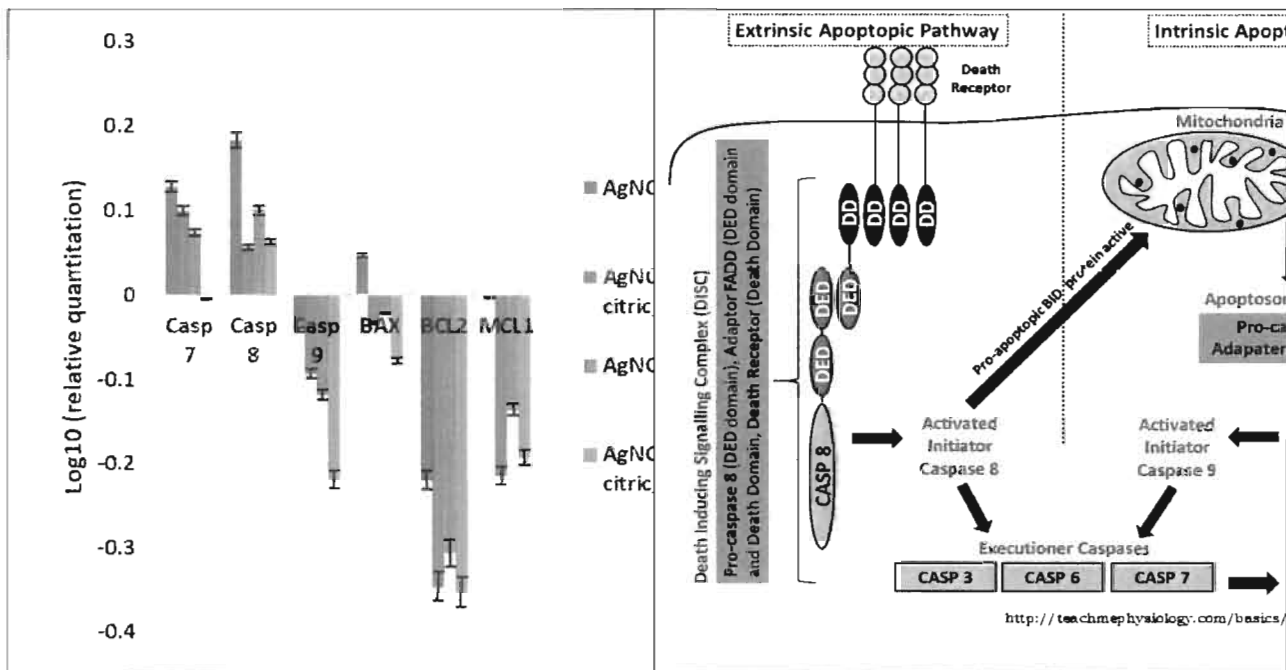


Fig. 4. Expresia markerilor de inducere a apoptozei prin mecanisme extrinseci în prezența materialelor colagenice cu Ag.

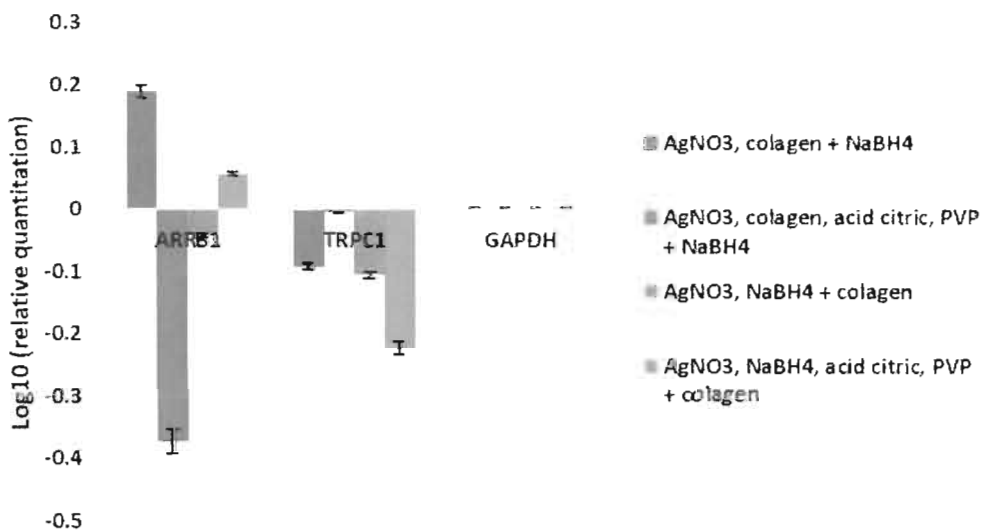


Fig. 5. Expresia markerilor de activare a metabolismului celular în prezența materialelor colagenice cu Ag.

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Universitatea din
București

Universitatea
Politehnica
București

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Catalin-Robertino
HIDEG

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

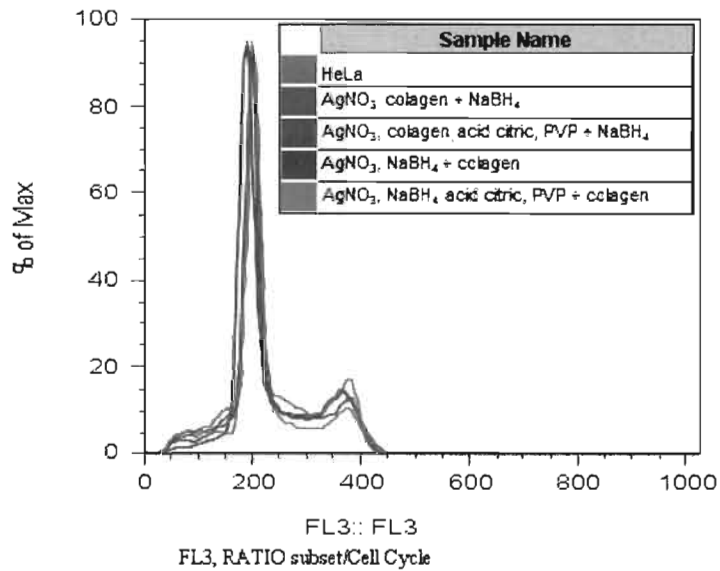


Fig. 6. Histogramele suprapuse ale ciclului celular al celulelor HeLa menținute în prezența materialelor collagenice cu Ag.

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Catalin-Robertino
HIDEG

Universitatea din
București

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Universitatea
Politehnica
București

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

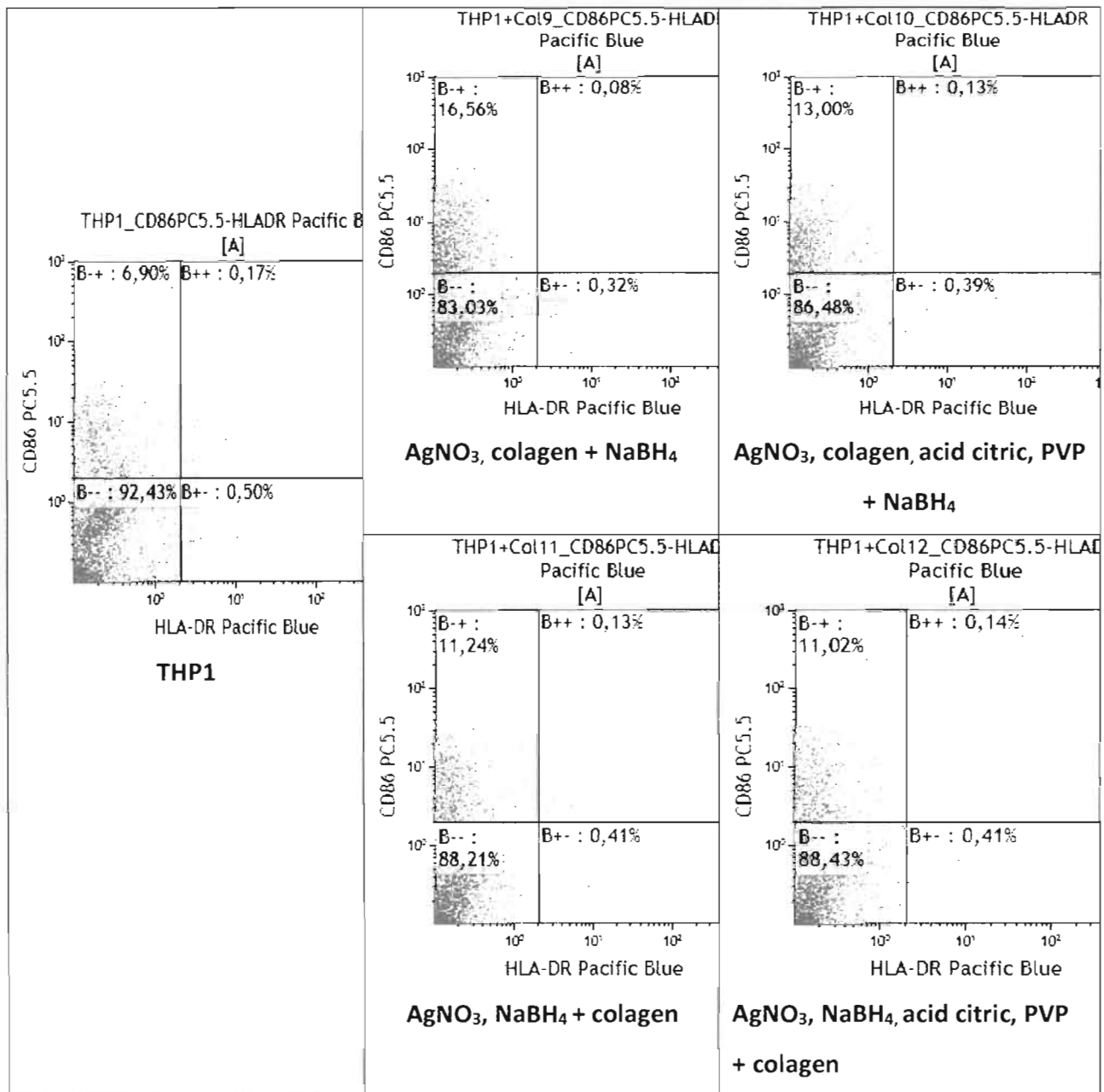


Fig. 7. Reprezentare dot blot a activării celulelor THP-1 în prezența materialelor colagenice (h-CLAT -human cell line activation test)

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Catalin-Robertino
HIDEG

Universitatea din
București

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Universitatea
Politehnica
București

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

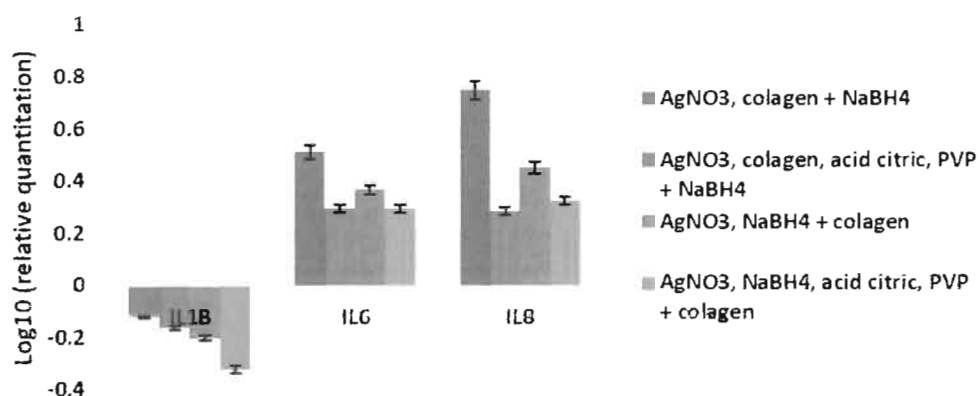


Fig. 8. Expresia citokinelor inflamatorii în culturi de celule epiteliale în prezența materialelor colagenice cu Ag.

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Catalin-Robertino
HIDEG

Universitatea din
București

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Universitatea
Politehnica
București

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

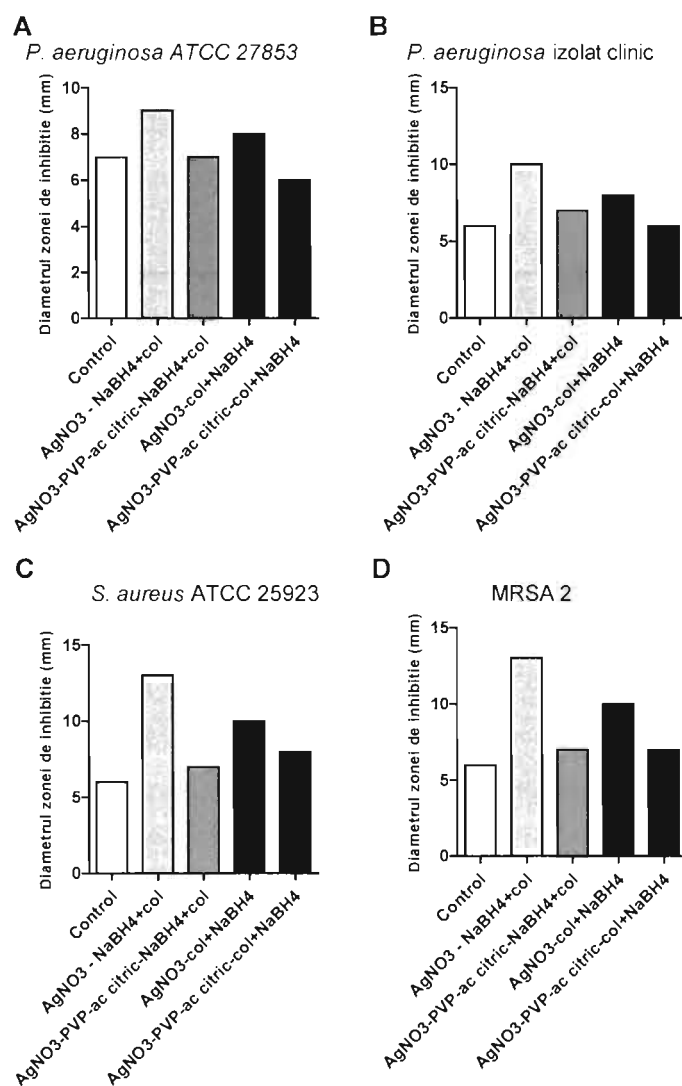


Fig. 9. Reprezentarea grafică a efectului antimicrobian al materialelor colagenice cuantificat prin metoda calitativă.

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Catalin-Robertino
HIDEG

Universitatea din
București

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Universitatea
Politehnica
București

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

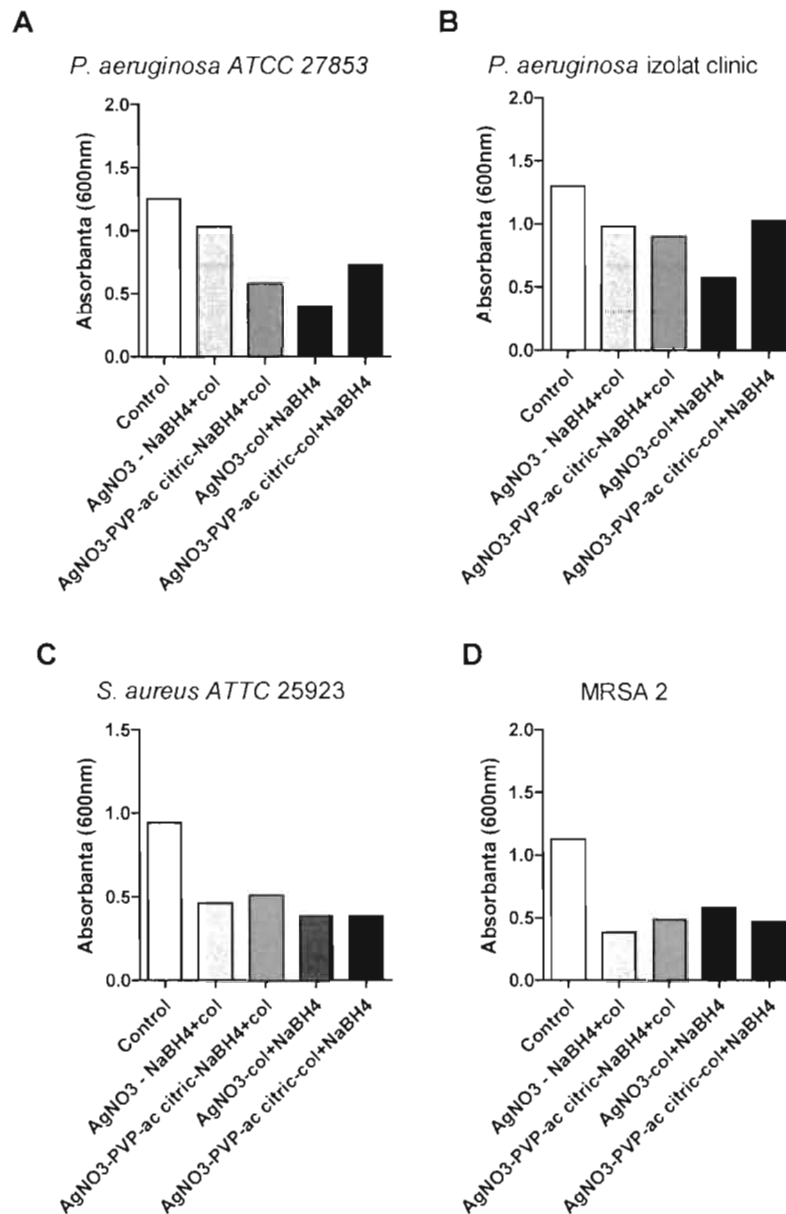


Fig. 10. Reprezentarea grafică a efectului antimicrobian al materialelor colagenice cuantificat prin metoda cantitativă față de celule microbiene planctonice.

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Catalin-Robertino
HIDEG

Universitatea din
București

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Universitatea
Politehnica
București

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

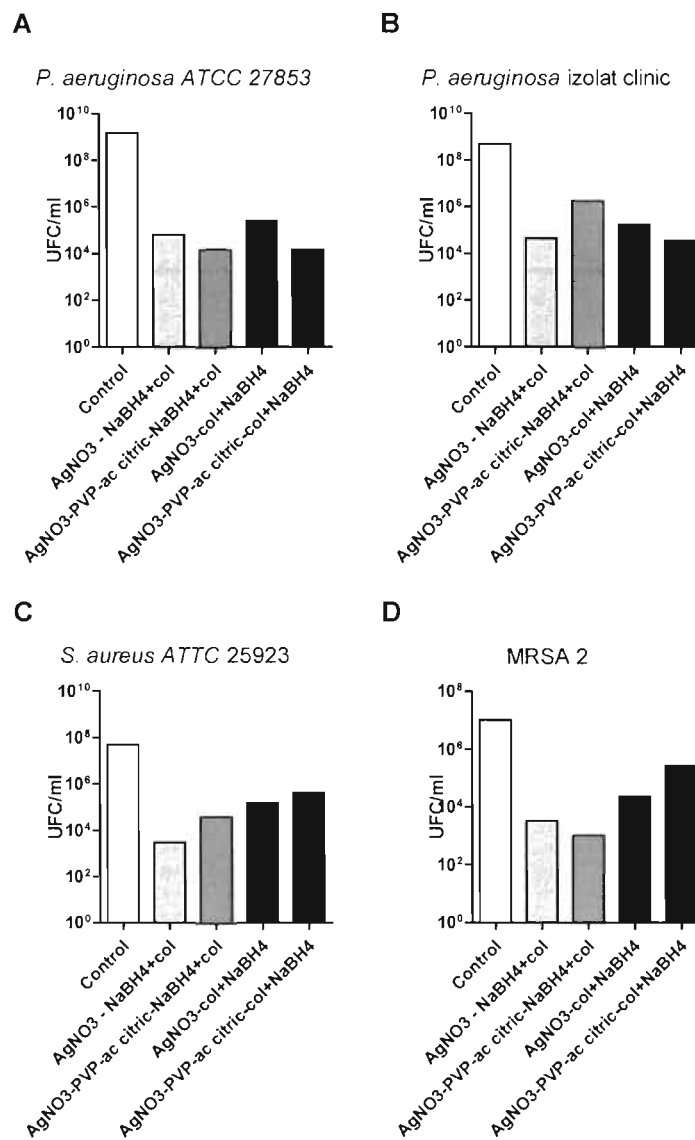


Fig. 11. Reprezentarea grafică a efectului antimicrobian al materialelor colagenice cuantificat prin metoda cantitativă față de celulele microbiene aderate.

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Catalin-Robertino
HIDEG

Universitatea din
București

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Universitatea
Politehnica
București

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

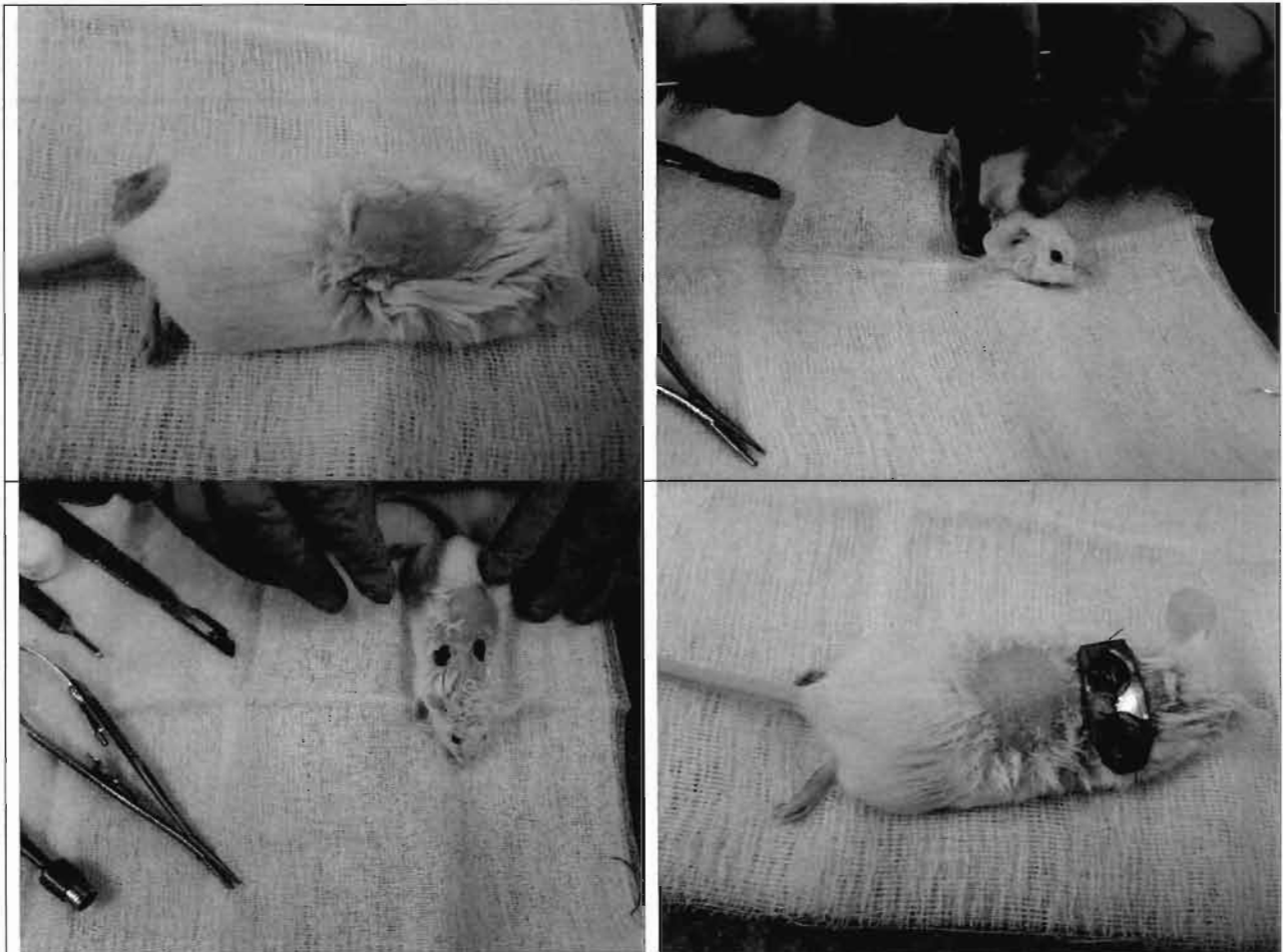


Fig. 12. Pregătirea animalului, excizia biopptică a unei porțiuni din piele, și implantarea materialului colagenic.

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Catalin-Robertino
HIDEG

Universitatea din
București

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Universitatea
Politehnica
București

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

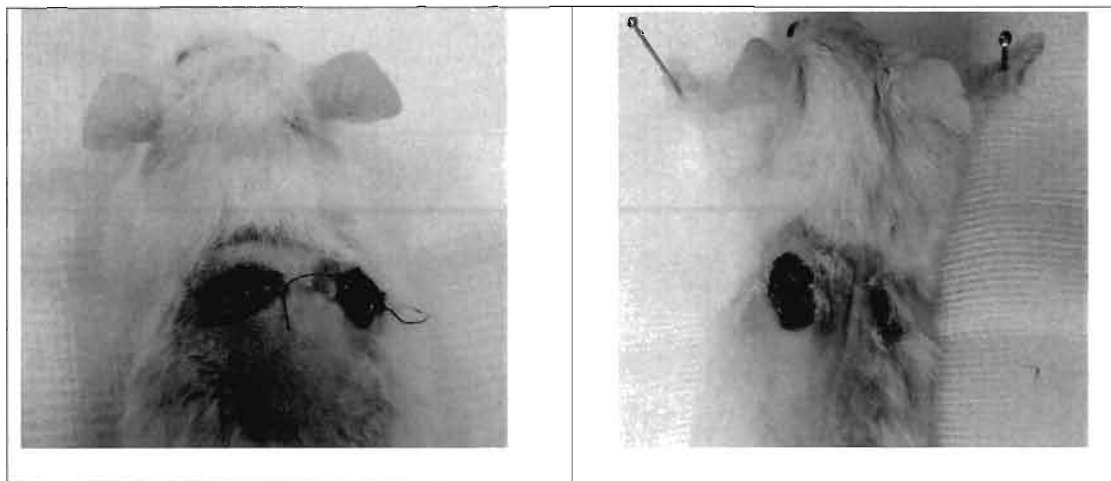


Fig. 13. Aspectul plăgii la 4 zile de la implantarea materialului colagenic.

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Catalin-Robertino
HIDEG

Universitatea din
București

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Universitatea
Politehnica
București

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

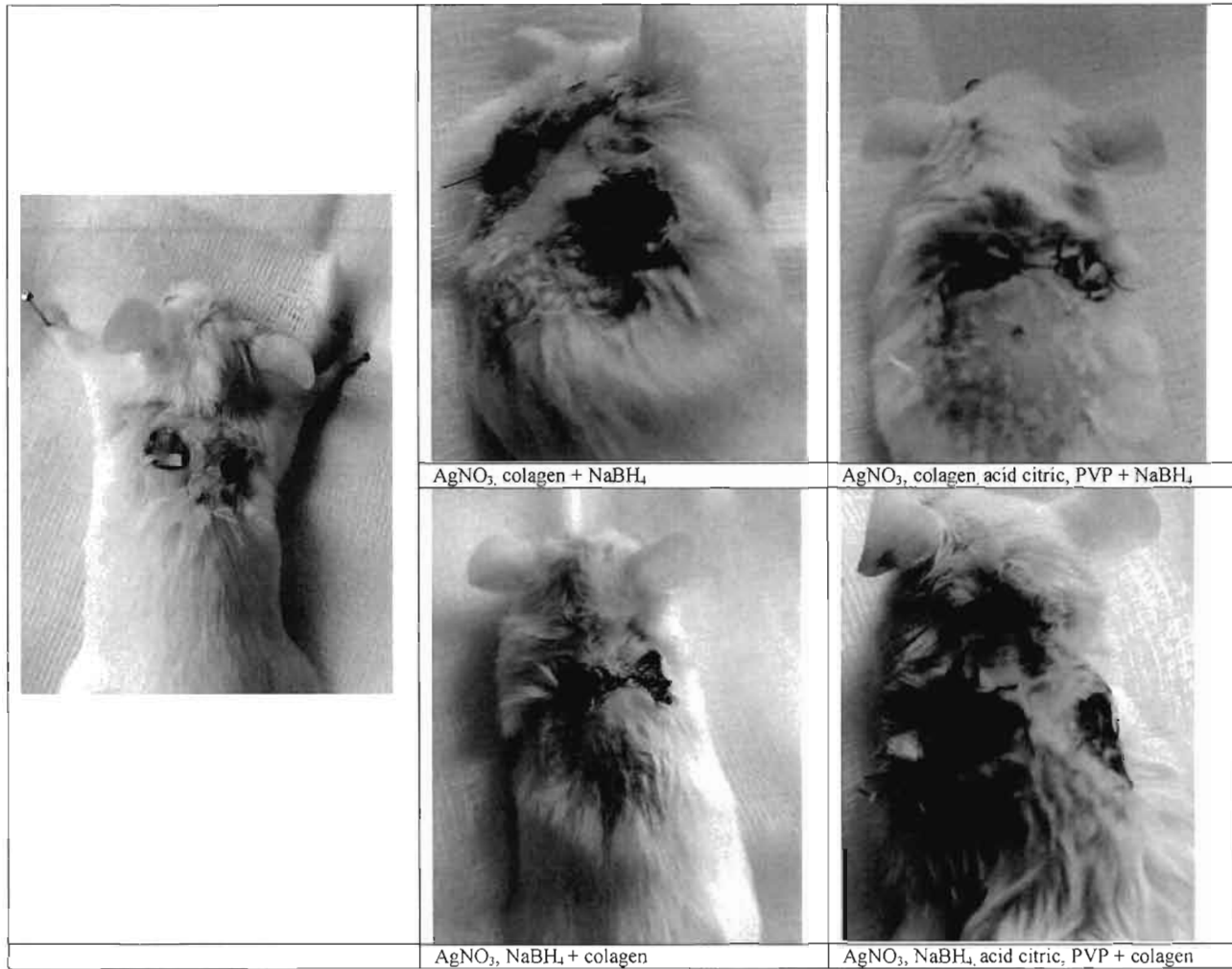


Fig. 14. Aspectul plăgii la 4 zile de la inocularea bacteriană și implantarea materialului colagenic.

SANIMED
INTERNATIONAL
IMPEX SRL

Catalin-Robertino
HIDEG

Universitatea din
București

Prof. dr. Mircea
DUMITRU

Universitatea
Politehnica
București

Prof.dr. Mihnea
COSTOIU

Institutul de Virusologie
Stefan S. Nicolau, București

Dr. Carmen Cristina
DIACONU

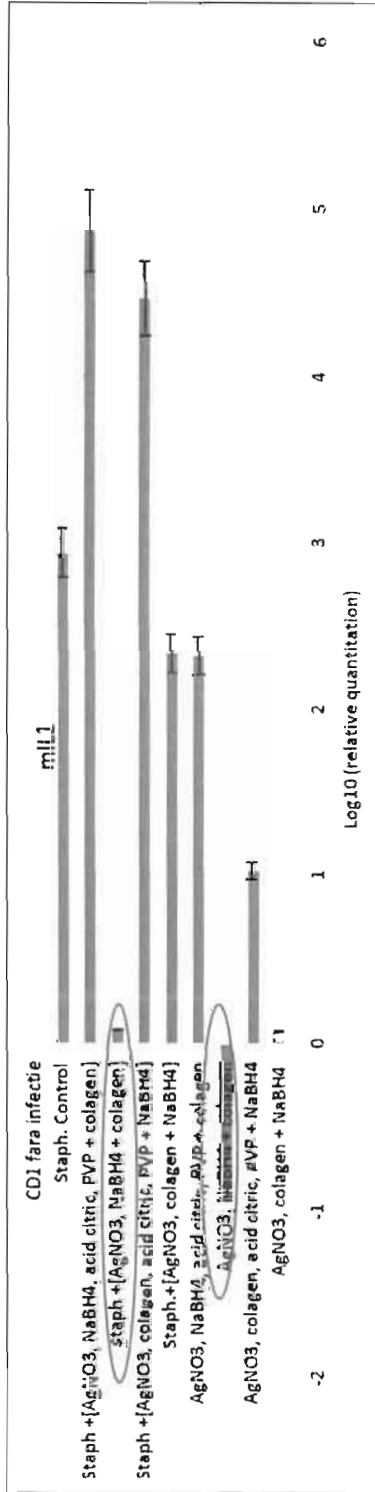


Fig. 15. Analiza expresiei IL-1 la nivelul plăgii.

SANIMED INTERNATIONAL IMPEX SRL	Universitatea din București	Universitatea Politehnica București	Institutul de Stefan S. Nicolau, București Virusologie
Catalin-Robertino HIDEG	Prof. dr. Mircea DUMITRU	Prof. dr. Mihnea COSTOIU	Dr. Carmen Cristina DIACONU

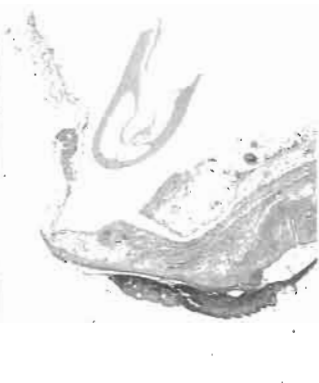
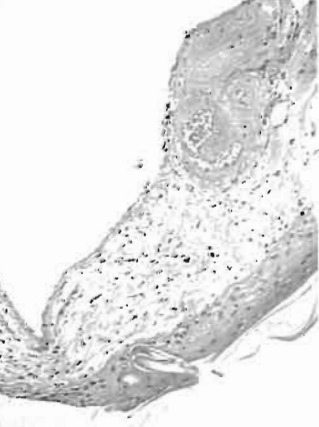


			
<p>Fragment de tegument si tesut adipos care bordeaza cavitate in care se identifica material eozinofil, omogen, anhist (A HE x 100).</p>	<p>Minim infiltrat inflamator limfomonocitar cu foarte rare PMN in derm (B HE x 200).</p>	<p>Membrana anhista fara infiltrat inflamator (C HE x 200)</p>	<p>Fragment de tegument si tesut adipos cu mici ulceratii epidermice acoperite de depozite fibrinoleucocitare. Minim infiltrat inflamator dermic. (D HE x 100).</p>

Fig. 16. Analiza histopatologica al nivelului plăgii

<p>SANIMED INTERNATIONAL IMPEX SRL</p>	<p>Universitatea din București</p>	<p>Universitatea Politehnica București</p>	<p>Institutul de Virusologie Stefan S. Nicolau, București</p>
<p>Catalin-Robertino HIDEG</p>	<p>Prof. dr. Mircea DUMITRU</p>	<p>Prof.dr. Mihnea COSTOIU</p>	<p>Dr. Carmen Cristina DIACONU</p>