

(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00857

(22) Data de depozit: 04/12/2019

(41) Data publicării cererii:  
30/07/2020 BOPI nr. 7/2020

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE  
DEZVOLTARE PENTRU FIZICA  
MATERIALELOR (INCDFM),  
STR.ATOMIȘTILOR, NR. 405A, CP.MG-7,  
MĂGURELE, IF, RO

(72) Inventatori:  
• MICLEA CORNELIU FLORIN,  
PIAȚA PACHE PROTOPOPESCU, NR.1,  
AP.8, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;  
• MICLEA CORNEL, BD.G-RAL MAGHERU,  
NR.24, BL.G, ET.4, AP.5, SECTOR 1,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• CIOANGHER MARIUS CRISTIAN,  
STR.RITMULUI NR.29, SECTOR 2,  
BUCUREȘTI, B, RO;

• AMARANDE LUMINIȚA, STR. SLT. POPA  
NR. 7, BL. 17, AP. 15, SECTOR 5,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• MICLEA LUMINIȚA CLAUDIA,  
PIAȚA PACHE PROTOPOPESCU, NR.1,  
AP.8, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;  
• MOISESCU GEORGETA MIHAELA,  
STR. ORȘOVA, NR.10, BL.F4, SC.1, AP.15,  
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;  
• SAVOPOL TUDOR, STR. BOZIENI NR. 2,  
BL. 833, SC. B, AP. 72, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO

Această publicație include și modificările descrierii,  
revendicărilor și desenelor, depuse conform art. 35,  
alin. (20), din HG nr. 547/2008.

(54) SISTEM DE TESTARE *IN VITRO* A PROLIFERĂRII  
(CULTURILOR) CELULARE PE MEDII STRESATE MECANIC  
ÎN ATMOSFERĂ CONTROLATĂ

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un sistem de testare *in vitro* a proliferării culturilor celulare pe medii stresate mecanic în atmosferă controlată. Sistemul conform invenției cuprinde o celulă de presiune atașată la un actuator conectat la un controler, pentru transmiterea unei forțe cu amplitudine și dependență de timp controlate, prin intermediul unor pistoane și unor coloane, la o probă imersată într-un mediu de cultură, întregul ansamblu fiind plasat într-o carcasă ermetică, și conectată la un incubator medical, carcasa fiind dispusă în interiorul unei hote biologice care asigură accesul și transferul probelor în condiții sterile, hota fiind prevăzută cu o lampă de lumină ultravioletă, ce asigură sterilizarea suplimentară a întregului sistem.

Revendicări inițiale: 2  
Revendicări amendate: 2  
Figuri: 6

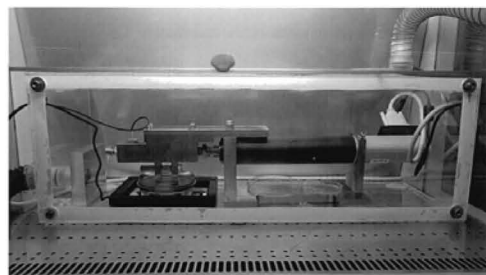


Fig. 4

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).



## **Sistem de testare in vitro a proliferării (culturilor) celulare pe medii stresate mecanic în atmosfera controlată.**

Corneliu Florin Miclea<sup>1</sup>, Cornel Miclea<sup>1</sup>, Marius Cioangher<sup>1</sup>, Luminita Amarande<sup>1</sup>,

Luminita Claudia Miclea<sup>2</sup>, Mihaela Georgeta Moiescu<sup>2</sup>, Tudor Savopol<sup>2</sup>

1. Institutul National de Fizica Materialelor Atomistilor str. 405, Magurele, 077125 Ilfov, Romania.
2. Universitatea de Medicina si Farmacie Carol Davila Disciplina Masterat de Biofizică și Biotehnologie Celulară Centru de Cercetare de Excelență în Biofizică și Biotehnologie Celulară, Blvd. Eroii Sanitari, nr 8, cod 050474, sector 5, București

### **Descriere generală**

Invenția descrisă în această aplicație de brevet se referă la un dispozitiv de testare biologică, in vitro, a culturilor celulare pe medii biocompatibile stresate mecanic aflate în mediu de cultură și în atmosferă controlată specifică. Domeniul principal (dar nu exclusiv) de aplicare al invenției este studiul proliferării celulare pe materiale piezoceramice biocompatibile. Acest obiectiv are la baza prezența efectului piezoelectric în oase [1,2], datorat în special colagenului. Materialele piezoelectrice, în urma aplicării unei tensiuni mecanice acumulează sarcini electrice pe suprafețe prin intermediul efectului piezoelectric direct [3]. Astfel sarcinile electrice acumulate datorită piezoelectricității colagenului au o influență semnificativă asupra unor celule din sistemul osos; în special osteocitele sunt sensibile la modificările de potențial electric care duc la activarea unor canale transmembranare. Deschiderea canalelor membranare mediază mesaje intracelulare către nucleu. Osteocitele interacționează cu osteoblastele și osteoclastele și în final sarcinile generate prin efectul piezoelectric duc la fenomene celulare colective ca de exemplu sintetizarea de matrice extracelulară, creștere celulară și regenerare de țesuturi [4, 5]. Există numeroase investigații ce confirmă rolul efectului piezoelectric în dezvoltarea celulară [6-11]. Printre materialele piezoelectrice biocompatibile cu un potențial deosebit pentru aceste teste sunt materialele ceramice piezoelectrice fără plumb ca de exemplu titanatul de bariu [12].

Dispozitivul ce face obiectul acestei aplicații de brevet, permite aplicarea unei tensiuni mecanice repetate, de frecvență și intensitate reglabile, asupra unei probe rectangulare piezoelectrice pe care au fost aderate în prealabil celule. Pot fi reproduse condițiile biomecanice tipice pentru sistemul osos uman [13] cu presiuni în probă de ordinul a 2.5MPa. Pe tot parcursul



studiului proba este imersată într-un mediu specific culturilor celulare. Vasul de cultură este termostatat și plasat împreună cu întreg sistemul de stresare mecanică în mediu septic, în atmosferă controlată, într-o incinta din policarbonat special construită, conectată la un incubator medical. Incubatorul controlează temperatura culturii celulare, temperatura amestecului de gaz, viteza de circulație, cantitatea de CO<sub>2</sub> din atmosferă și umiditatea.

După cunoștințele noastre, în literatură, sunt menționate, doua sisteme destinate studiului culturilor celulare pe medii stresate mecanice. Astfel în [14] este prezentat un sistem de cultură celule și vasele de cultură corespunzătoare ce au fost folosite pentru evaluarea efectelor generării de sarcini electrice prin efect piezoelectric asupra celulelor osoase medulare. Vasele de cultură au fost realizate din oțel inoxidabil și policarbonat prevăzut cu excavații în partea superioară. Asupra structurii a fost aplicat cu ajutorul unui echipament de testare la oboseală un stres mecanic compresiv ciclic. Din parametrii prezentați în lucrare se poate observa că sistemul de cultură astfel realizat a fost supus unui stres mecanic cu caracteristici de undă sinusoidală cu frecvența de 1 Hz. Se poate observa că dispozitivul prezentat în lucrare acoperă o plajă limitată de valori ale parametrilor compresiei mecanice cum ar fi frecvența și mărimea forței. Vasul de cultură de o complexitate deosebită nu este unul standard pentru culturile medicală. În protocoalele medicale aceste vase sunt de unica folosință datorită problemelor deosebite pe care le-ar reprezenta reutilizarea. Construcția unui astfel de vas ca cel din [14] este costisitoare și dimensiunile acestuia trebuie ajustate strict în funcție de dimensiunile probelor. În plus, forța aplicată nu este distribuită direct pe probe ci este preluată și de pereții vasului făcând astfel dificilă estimarea presiunii reale. În timpul utilizării proba se mișcă în raport cu vasul fapt ce duce la uzuri ce pot contamina mediul de cultură. Aplicarea forței necesită un echipament auxiliar voluminos.

Un alt sistem descris în [15] aplică forța mecanică prin intermediul unui ax cu came și al unui resort asupra unui vas de cultură în care este imersată proba ceramică. Forța este aplicată în planul transversal al probei cu o frecvență dată de turația a motorului. Valoarea forței depinde în special de coeficientul elastic al resortului iar dependența de timp de profilul camei. Frecvența compresiilor a fost de 0-5 Hz iar forțele aplicate au avut valorile situate în intervalul 0-100 N. Dezavantajele acestui dispozitiv sunt multiple; controlul redus al parametrilor compresiei mecanice, forța este aplicată transversal pe probă, o mare parte din suprafața orizontală a probei



(zona unde adera și proliferază celulele) de studiat este obturată de dispozitivul de aplicare a forței mecanice.

Dispozitivul de testare biologică în condiții de stres mecanic în mediu septic ce face obiectul acestei invenții elimină aceste dezavantaje prin aceea că permite aplicarea unei largi plaje de valori ale forței pe suprafețele laterale ale probei (plachetei ceramice), permite studiul probelor cu dimensiuni diferite și de asemenea oferă posibilitatea folosirii întregii suprafețe superioare pentru observarea efectelor efectului piezoelectric asupra celulelor pentru testele biologice. De asemenea este posibilă utilizarea vaselor standard de cultura celulară, sistemul este conectat la un incubator și plasat într-o hotă biologică ce facilitează operarea dispozitivului și transferul probelor în condiții septice.

#### **Detalii:**

Dispozitivul nostru se bazează pe o celulă de presiune realizată din oțel inoxidabil medical foarte rezistent la coroziune de tip W1.4404/316L prezentat în figura 1. Aceasta celulă este atașată la carcasa unui actuator PI 238.5PG conectat la un controler PI-C863 controlat de calculator. Actuatorul permite aplicarea unei forțe maxime de 400 N, o deplasare de 50 mm cu pas variabil cu o rezoluție de 0.1  $\mu\text{m}$  și viteză maximă de 30 mm/s. Forța este transmisă de actuator către proba 5 (fig. 1) prin intermediul pistonului 2 și al coloanei 3. Mai departe stresul este preluat de coloana 6 și pistonul 7 către senzorul de forță 8. Șurubul 9 asigură pretensionarea inițială a întregului ansamblu și este blocat printr-o contrapiuliță nereprezentată în figură. Senzorul de forță este rezistiv de tip strain gauge model Mark-10 R04 controlat de o unitate Mark-10 7i. Frecvența de citire a forței este de 14 KHz, valoarea maximă suportată de senzor de 500 N iar valorile furnizate sunt citite de calculator. Pistoanele și senzorul de presiune pot culisa liber în interiorul carcasei 1 realizată de asemenea din inox W1.4404/316L. Aliniamentul pistoanelor este asigurat de carcasa 1 și suplimentar prin pistonul 4 înșurubat rigid în coloana 3 și culisând liber prin coloana 6. Toate piesele au fost prelucrate prin așchiere cu toleranțe mici și printr-un număr minim de prinderi. Lubrifierea pistoanelor este asigurată de vaselina siliconică medicală. Deplasările tipice ale pistonului 2, necesare obținerii valorilor de presiune tipice femurului uman, sunt relativ mici, de ordinul a 0.1 - 0.4 mm. Sistemul mecanic asamblat este prezentat în figurile 2 (vedere laterală) și 3 (vedere de sus).



Întreg sistemul este plasat într-o carcasă de policarbonat ce se poate închide ermetic și este conectată la un incubator medical (fig. 4). Pe tubul de ieșire din cutie (colțul dreapta, sus al fig. 4) sunt plasați un senzor de CO<sub>2</sub> și un termometru ce facilitează ajustarea concentrației de CO<sub>2</sub> respectiv controlul temperaturii gazului circulat de incubator. Sistemul de susținere al actuatorului și placa orizontală superioară de prindere a sistemului de actuator sunt de asemenea realizate din inox W1.4404/316L.

Recipientul de cultură folosit este un vas Petri standard. Proba plasată între coloane este imersată în mediul de cultură (figura 5). Vasul este plasat pe o masa termostată de către incubator cu temperatura reglabilă menținută de regulă între 36 și 37 °C. O a doua probă martor este de asemenea plasată în vas în aceleași condiții, fără a fi supusă însă stresului mecanic și pentru a servi ca referință pentru studiu. Accesul în interiorul cutiei de policarbonat se face prin intermediul unui capac frontal fixat cu șuruburi și etanșat cu ajutorul unei garnituri de silicon (figura 5). Trecurile de fire (pentru cablul de date al actuatorului, alimentarea acestuia, cablul senzorului de forță și cablurile termometrului și rezistenței de încălzire a mesei termostate) au fost realizate din cauciuc silionic turnat în matrițe cu forma specifică.

La rândul ei cutia de policarbonat este plasată în interiorul unei hote biologice ce asigură accesul și transferul probelor în condiții sterile (figura 6). De asemenea hota este prevăzută cu o lampă de lumină ultravioletă ce asigură sterilizarea adițională a întregului sistem.

După pretensionarea inițială făcută cu ajutorul șurubului poziția sistemului se ajustează fin cu ajutorul actuatorului și al senzorului de forță. Datele furnizate de senzor sunt reprezentate grafic și salvate în calculator.

Pentru testare au fost aderate celule în aceleași condiții timp de 24h pe fețele superioare ale unor probe identice de BaTiO<sub>3</sub>. Probele au fost în prealabil tăiate rectangular, din aceeași prindere, folosind un fierăștrău circular de viteză mică. Probele au fost apoi transferate în sistemul de măsură, amândouă în același vas, una dintre ele fiind supusă stresului mecanic. După 24 h celulele de pe cele două probe au fost recoltate și investigate. Celulele au proliferat și nu au fost observate urme de infecții sau contaminare.



**Bibliografie.**

1. Fukada E. and Yasuda, On the piezoelectric effect of bone, *J. Phys. Soc. Japan* 12, 1158-1162, (1957).
2. Fukada E, Piezoelectricity of bone and osteogenesis by piezoelectric films. In: *Mechanisms of Growth Control* (Edited by Becker R. O.), Thomas, Springfield, Ill. 192-210 (1981).
3. B. Jaffe, W.R. Cook, H. Jaffe, *Piezoelectric Ceramics*. Academic Press, London and New York, (1971).
4. J. Jacob, N. More, K. Kalia, and G. Kapusetti, Piezoelectric smart biomaterials for bone and cartilage tissue engineering, *Inflammation and Regeneration* 38:2, (2018).
5. Miara B, Rohan E, Zidi M, Labat B. Piezomaterials for bone regeneration design homogenization approach. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*. 53, 2529 (2005).
6. I. Sabree, J. E. Gough, B. Derby, Mechanical properties of porous ceramic scaffolds: Influence of internal dimensions, *Ceramics International* 41, 8425–8432 (2015).
7. Current Trends in Fabrication of Biomaterials for Bone and Cartilage Regeneration: Materials Modifications and Biophysical Stimulations, *Int. J. Mol. Sci.* 20, 435 (2019).
8. B. Tandon, Jo. J. Blaker, S. H. Cartmell, Piezoelectric materials as stimulatory biomedical materials and scaffolds for bone repair, *Acta Biomaterialia* 73, 1-20 (2018).
9. M. Acosta, R. Detsch, A. Greunewald, V. Rojas, J. Schultheis, A. Wajda, R. W. Stark, S. Narayan, M. Sitarz, J. Koruza, A. R. Boccaccini, Cytotoxicity, chemical stability, and surface properties of ferroelectric ceramics for biomaterials, *J. Am Ceram Soc.* 101, 440–449 (2018).
10. A. Przekora, Current Trends in Fabrication of Biomaterials for Bone and Cartilage Regeneration: Materials Modifications and Biophysical Stimulations, *Int. J. Mol. Sci.* 20, 435 (2019).
11. P. Vaněk, Z. Kolská, T. Luxbacher, J. A. L. García, M. Lehocky, M. Vandrovcova, L. Bacakova and J. Petzelt, Electrical activity of ferroelectric biomaterials and its effects on the adhesion, growth and enzymatic activity of human osteoblast-like cells, *J. Phys. D: Appl. Phys.* 49, 175403 (2016).



12. M. Acosta, N. Novak, V. Rojas, S. Patel, R. Vaish, J. Koruza, G. A. Rossetti, and J. Rödel, BaTiO<sub>3</sub>-based piezoelectrics: Fundamentals, current status, and perspectives, *Applied Physics Reviews* **4**, 041305 (2017).
13. A. E. Yousif, M.Y. Aziz, Biomechanical Analysis of the human femur bone during normal walking and standing up, *IOSR Journal of Engineering (IOSRJEN)* **2** (8), 13-19 (2012).
14. K. Furuya, Y. Morita, K. Tanaka, T. Katayama, E. Nakamachi, Acceleration of osteogenesis by using barium titanate piezoelectric ceramic as an implant material, *Proc. of SPIE* **7975**, 79750U-1, (2011). DOI: 10.1117/12.881858.
15. Y. Tang, C. Wu, Z. Wu, L. Hu, W. Zhang, Kang Zhao, Fabrication and in vitro biological properties of piezoelectric bioceramics for bone regeneration, *Scientific Reports* **7**, 43360 (2017) DOI: 10.1038/srep43360.



**Revendicări**

1. Dispozitiv de testare biologică, in vitro, a culturilor celulare pe medii biocompatibile stresate mecanic aflate în mediu de cultură și în atmosfera controlată specifică. Dispozitivul permite aplicarea unei largi plaje de valori ale forței pe suprafețele laterale ale unei probe rectangulare, permite studiul probelor cu dimensiuni diferite și de asemenea oferă posibilitatea folosirii întregii suprafețe superioare pentru observarea efectelor efectului piezoelectric asupra celulelor pentru testele biologice. De asemenea este posibilă utilizarea vaselor standard de cultură celulară, sistemul este conectat la un incubator plasat într-o hota biologică ce facilitează operarea dispozitivului și transferul probelor în condiții sterile. De asemenea este posibilă plasarea unei probe martor, în același vas cu mediu de cultură dar nesupusă stresului mecanic pentru a servi ca referință pentru studiu.
2. Dispozitiv de testare biologică conform revendicării 1 instalat într-o carcasă de policarbonat cu porturi ce permit conectarea la un incubator biologic fiind astfel posibilă termostatarea vasului de cultura celulară, controlul concentrației de CO<sub>2</sub> și temperatura gazului circulat.





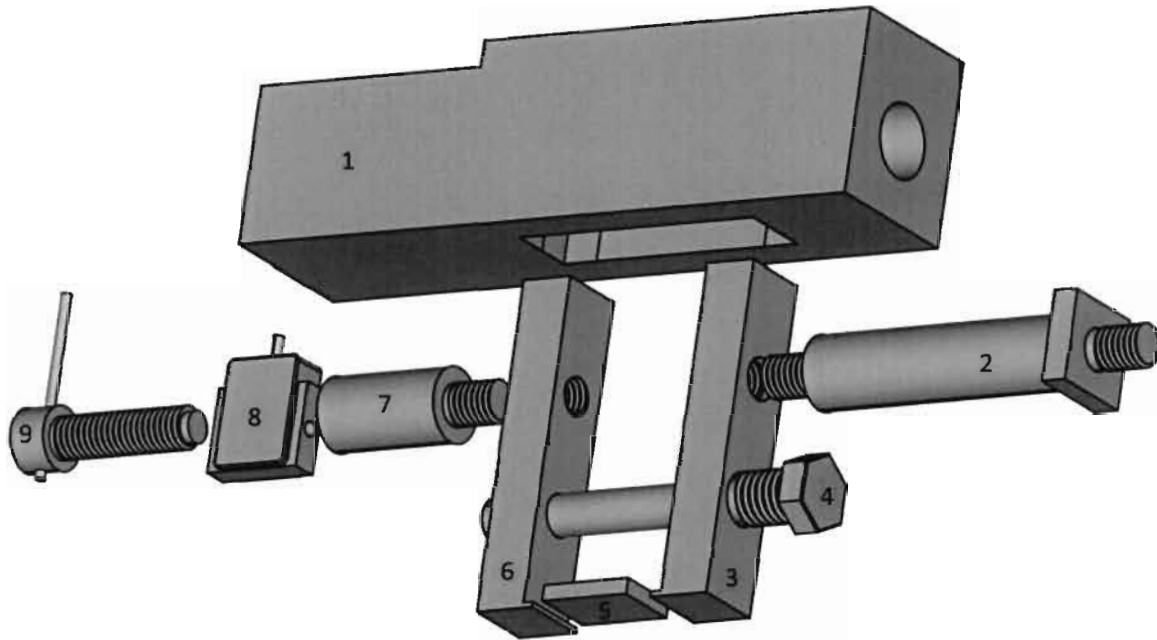


Figura 1: Reprezentare la scala a componentelor principale ale sistemului de stresare mecanica așa cum sunt descrise in text.

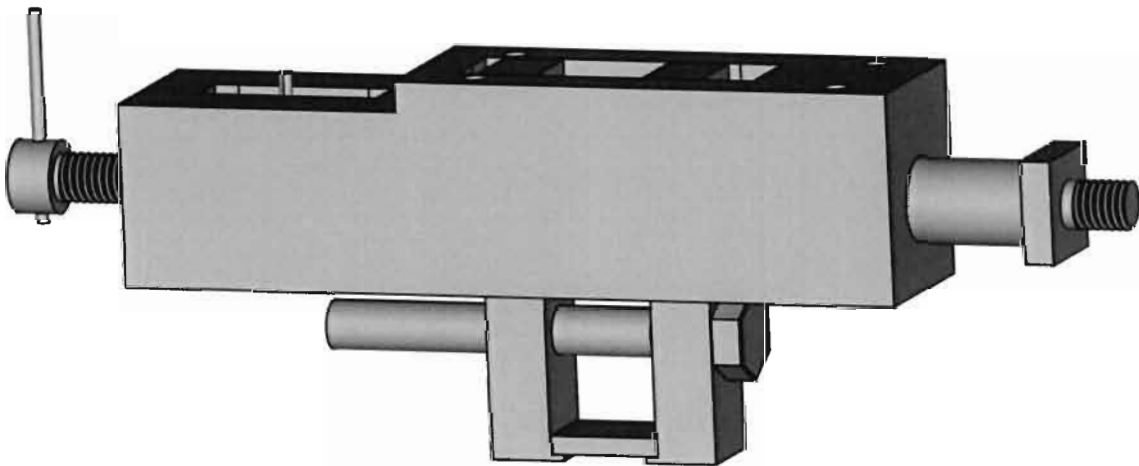


Figura 2: Partea principala a sistemului de stresare mecanica asamblata, vedere laterala.



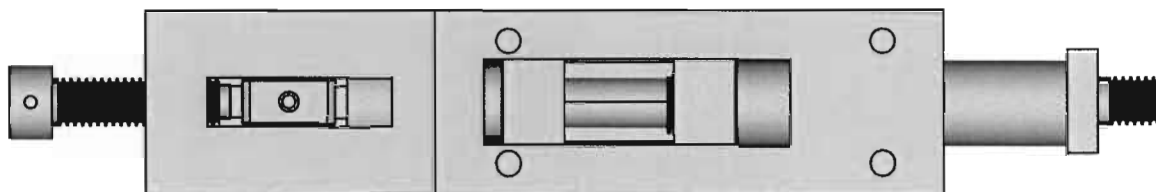


Figura 3: Partea principala a sistemului de stresare mecanica asamblata, vedere de sus

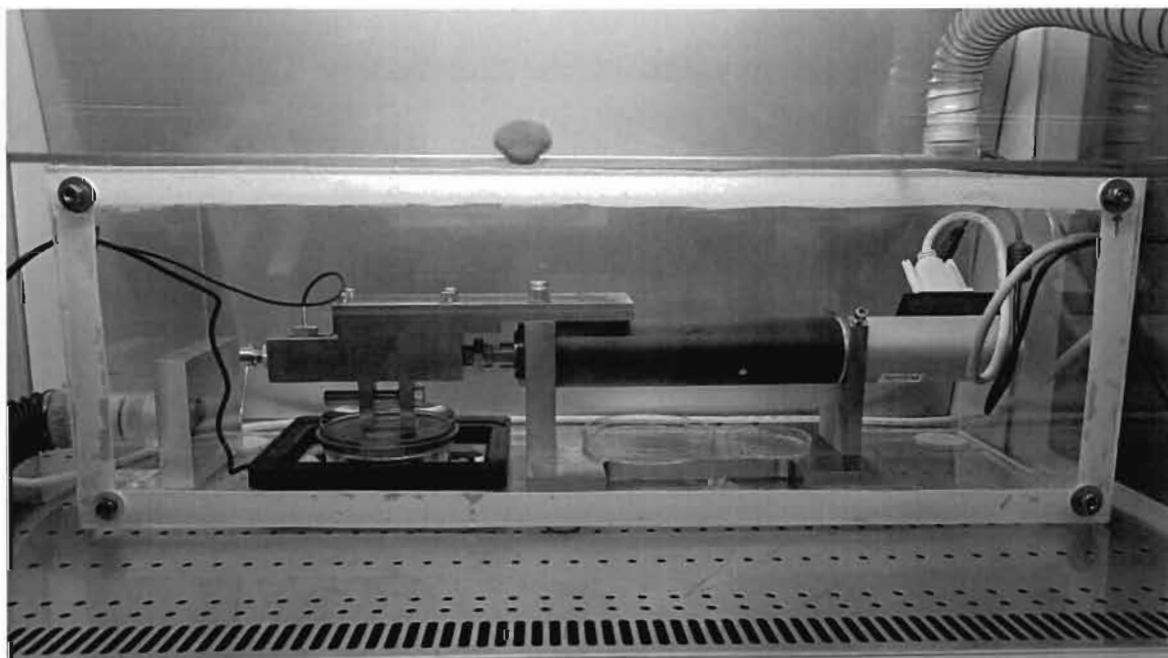
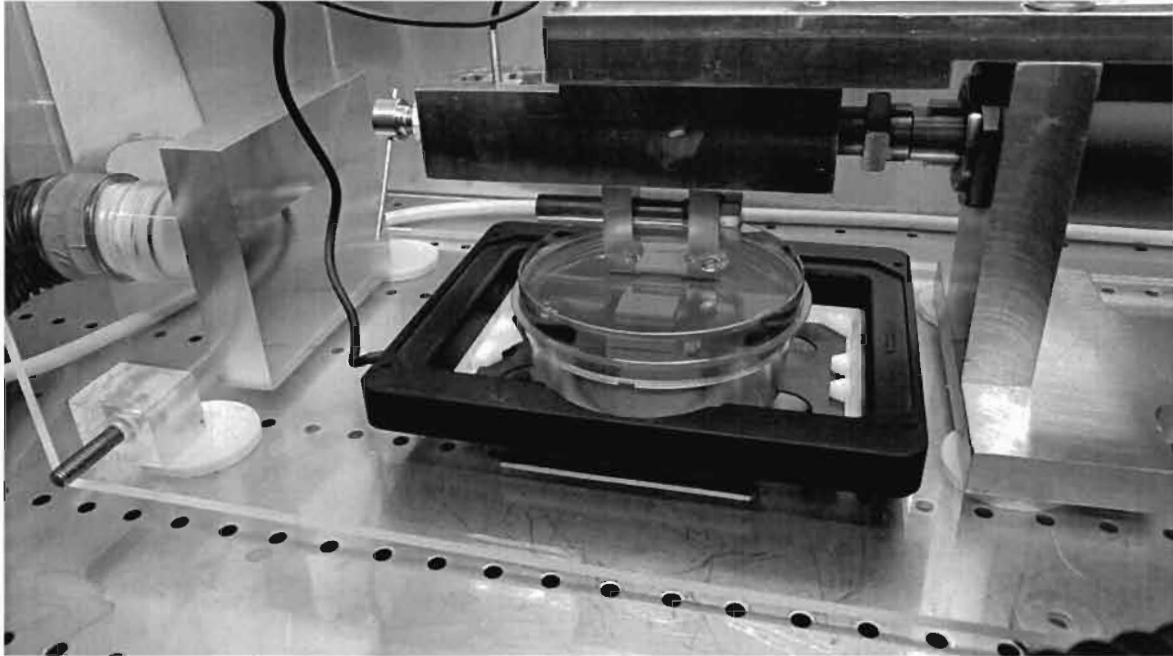


Figura 4: Poză a întregului prototip realizat incluzând carcasa de policarbonat conectata la incubator. Întregul ansamblu este plasat in interiorul unei hote biologice.





*Figura 5: Vasul de cultura folosit in timpul experimentului plasat pe masa termostata; proba stresata se afla intre coloanele verticale ale sistemului, imersata in mediu. O a doua proba, de referinta, se afla de asemenea in vas pe fundul acestuia.*



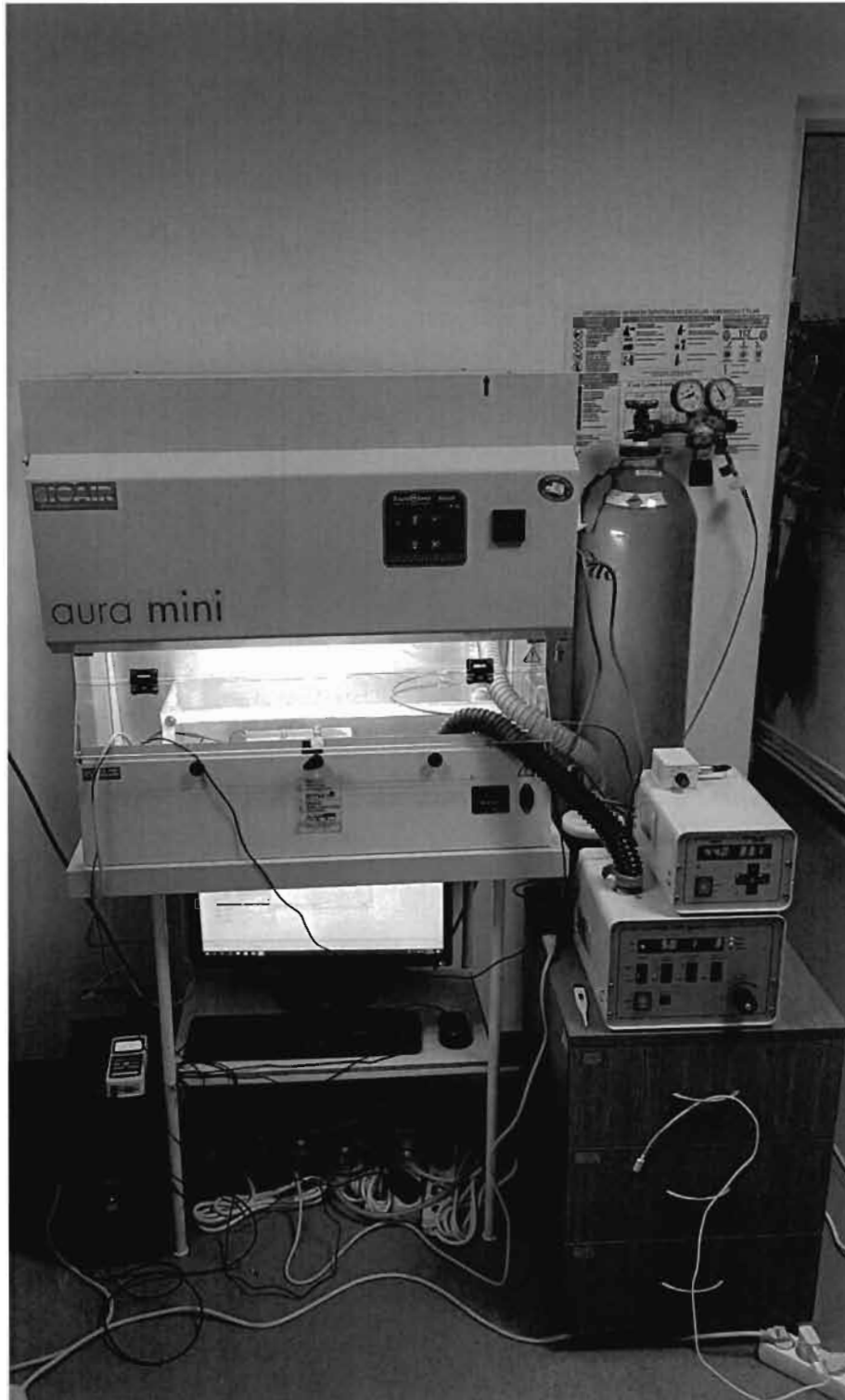


Figura 6: Întregul ansamblu incluzând sistemul de stresare mecanică, incubatorul, butelia de CO<sub>2</sub>, hota biologică și sistemul de control.



**Revendicări**

1. Dispozitiv de testare biologică, in vitro, a culturilor celulare pe substraturi (materiale) biocompatibile, stesate mecanic si imersate in mediul de cultură, în atmosfera controlată specifică **caracterizat prin aceea că** este alcătuit dintr-o celulă de presiune uni-axiala realizată din oțel inoxidabil medical foarte rezistent la coroziune de tip W1.4404/316L, atașată unui actuator PI 238.5PG acționat de un controler PI-C863 comandat de calculator, forța este transmisă de actuator către proba (5) prin intermediul pistonului (2) si al coloanei (3), mai departe stresul fiind preluat de coloana (6) si pistonul (7) către senzorul de forță (8), șurubul (9) asigură pretensionarea inițială a întregului ansamblu și este blocat printr-o contrapiuliță, pistoanele și senzorul de presiune pot culisa liber în interiorul carcasei (1) realizată de asemenea din inox W1.4404/316L, aliniamentul pistoanelor este asigurat de carcasa (1) și suplimentar prin pistonul (4) înșurubat rigid în coloana (3) și culisând liber prin coloana (6).
2. Dispozitiv de testare biologică conform revendicării 1 **caracterizat prin aceea că** este instalat într-o carcasă de policarbonat cu porturi ce permit conectarea la un incubator biologic fiind astfel posibile termostatarea vasului de cultura celulară, controlul concentrației de CO<sub>2</sub> si al temperaturii gazului circulat.