



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00454

(22) Data de depozit: 26/07/2019

(41) Data publicării cererii:  
30/09/2020 BOPI nr. 9/2020

(71) Solicitant:  
• UNIVERSITATEA DIN BUCUREȘTI,  
BD. MIHAIL KOGĂLNICEANU NR. 36-46,  
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:  
• ZĂRNESCU OTILIA, BD. IULIU MANIU  
NR. 59, BL. 10A, SC. 1, AP. 17, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• CRĂCIUNESCU OANA,  
BD. NICOLAE GRIGORESCU NR. 33, BL. A 1,  
SC. 3, AP. 33, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,  
RO;

• SECIU ANA-MARIA, BD. 1 DECEMBRIE  
1918, NR. 22, BL. 3, SC. 1, AP. 28,  
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;  
• MOLDOVAN LUCIA,  
BD. CONSTRUCTORILOR NR. 24, BL. 19,  
SC. A, ET. 2, AP. 13, SECTOR 6,  
BUCUREȘTI, B, RO;  
• GASPĂR-PINTILIESCU ALEXANDRA,  
ȘOS. COLENTINA, NR. 55, BLOC. 83, SC. 1,  
AP. 17, SECTOR 2, BUCUREȘTI, B, RO;  
• STANCIUC ANA-MARIA,  
STR. NIȚU VASILE NR. 66, BL. 25, SC. 2,  
AP. 52, SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;  
• ȘTEFAN LAURA MIHAELA,  
STR. DEALUL ȚUGULEA NR. 54, BL. B9,  
SC. A, AP. 26, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,  
RO

(54) HIDROGEL COMPOZIT BIOPOLIMERIC  
PENTRU TRATAMENTUL BOLILOR PARODONTALE  
ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un biomaterial compozit natural utilizat în medicină pentru regenerarea tisulară ghidată a leziunilor complexe ale țesuturilor orale, și la un procedeu de obținere a acestuia. Hidro-gelul, conform invenției, este constituit din principii active naturale: collagen de tip I, glicozaminoglican, ales dintre condroitin sulfat și acid hialuronic, fibronectină și o soluție dispersă de nanoparticule de argint cu un diametru mediu mai mic de 60 nm. Procedeu, conform invenției, constă în amestecarea soluțiilor de collagen tip I, condroitin sulfat sau acid hialuronic și fibronectină, în raport masic 10:1:0, 001 și 10:1:0, 005 la 4°C timp de 5

h, amestecul este menținut la rece, după care se adaugă o soluție de nanoparticule de argint, urmată de o soluție de etil-dimetil-aminopropil carbodiimidă, compoziția reticulată este supusă unei etape de gelifiere cu o soluție de fosfat monosodic și bicarbonat de sodiu și incubare la 37°C, timp de 2...5 h, rezultând un biomaterial sub formă de hidrogel solid care se sterilizează prin expunere la radiații UV sau gamma.

Revendicări: 2  
Figuri: 3

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).



## HIDROGEL COMPOZIT BIOPOLIMERIC PENTRU TRATAMENTUL BOLILOR PARODONTALE ȘI PROCEDEU DE OBTINERE

**Autori:** Otilia Zărnescu, Oana Crăciunescu, Ana-Maria Seciu, Lucia Moldovan, Alexandra Gaspar-Pintiliescu, Ana-Maria Stanciuc, Laura Mihaela Ștefan

Prezenta propunere de invenție se referă la un biomaterial compozit natural utilizat în medicină pentru regenerarea tisulară ghidată a leziunilor complexe ale țesuturilor orale, precum și la procedeul de obținere al acestuia.

Biomaterialul, conform propunerii de invenție, se prezintă sub formă de hidrogel steril, biodegradabil și biocompatibil și prezintă proprietăți bioactive, antimicrobiene și de stimulare a regenerării țesuturilor lezate.

Componentele din compoziția acestui hidrogel compozit, colagenul, condroitin sulfatul sau acidul hialuronic, precum și fibronectina sunt constituenți naturali, care se regăsesc în matricea extracelulară a cavității orale, proprietate ce face ca acest produs să fie suportul ideal pentru stimularea creșterii și proliferării fibroblastelor gingivale și a osteoblastelor, celule implicate în sinteza componentelor matriceale ale noului țesut din cavitatea orală.

Studii anterioare au raportat că proteinele fibrilare ale matricei extracelulare, precum colagenul și glicozaminoglicanii (acid hialuronic și condroitin sulfat) se pot asocia *in vitro* în structuri complexe, tridimensionale, care constituie un suport pentru celule din punct de vedere mecanic și reprezintă o bază pentru modelarea formei țesutului (**Brevet RO 115693B1/2000**). Aceste structuri exercită semnale de mecanotransducție prin care stimulează migrarea, diferențierea și aderarea celulară, dar și numeroase semnale biochimice prin anumite secvențe specifice de aminoacizi pentru coordonarea activității celulare și răspunsurilor fiziologice (**Bachman H. et al., *Advanced Wound Care*, 4, 501-511, 2015**).

Se cunoaște că boala parodontală prezintă un risc ridicat pentru sănătatea organismului, conducând la boli sistemice, cum ar fi artrita reumatoidă, bronșita cronică și fibroza pulmonară (**Kaur S. et al., *Journal of Dental Research*, 92, 399-408, 2013**). Terapia parodontală vizează regenerarea structurală și funcțională a structurii complexe a parodontiului, cu scopul restaurării atașamentului ligamentului parodontal de cementul/rădăcina dentară și osul adiacent, împreună cu formarea osului alveolar nou și a gingiei. În același timp, spațiul subgingival necesită protecție împotriva florei bacteriene patogene (**Reed D. et al., *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*, Academic Press, Elsevier Inc, 445-458, 2015**).

De asemenea, este cunoscut faptul că procesul de regenerare a țesutului parodontal este afectat de factori chimici și biologici, deoarece acest țesut este în contact permanent cu mediul extern al cavității bucale și prezintă un risc de infecție în timpul procesului de regenerare. Apoi, se știe că stresul mecanic, cauzat de forțele ocluzale sau de întindere a gingiilor dentare, afectează mucoasa și reduce resorbția osoasă. Regenerarea tisulară ghidată este o procedură care vizează refacerea osului alveolar, a ligamentelor parodontale și a cementului. Cel mai cunoscut tratament de regenerare ghidată se bazează pe aplicarea unor membrane tip barieră cu scopul de a restrânge migrarea celulelor conjunctive epiteliale și gingivale în defectele parodontale și pentru a favoriza proliferarea celulelor fibroblaste și osteoblaste, care sintetizează matricea extracelulară și, în final, un țesut nou, funcțional (Ramseier C.A. et al., *Periodontology* 2000, 59, 185-202, 2012). Au fost descrise o serie de produse cu utilizare clinică, care constau din membrane neresorbabile, confecționate din polimeri sintetici (politetrafluoretilenă, nylon pe silicon) sau membrane resorbabile fabricate din materiale organice (colagen, condroitin sulfat, etc.) (Naung N.Y. et al., *Dental Clinics of North America*, 2019, doi: 10.1016/j.cden.2019.02.008; Tatakis D.N. et al., *Periodontology* 2000, 19, 59-73, 1999). În cazul utilizării membranelor neresorbabile, regenerarea oaselor este scăzută și se impune intervenția chirurgicală.

Au fost dezvoltate tipuri de membrane resorbabile cu utilizări clinice în regenerarea țesutului parodontal, precum: Avitene® (obținută din pericard bovin reticulat cu difenilfosforilazidă), Collistat® (preparată din derm bovin), BioMend® (fabricată din colagen tip I obținut din tendon bovin), Paroguide® (constituită din colagen și condroitin sulfat) (Behfarnia P. et al., *Dental Research Journal*, 9, 574-581, 2012; Parodi R. et al., *International Journal of Periodontics and Restorative Dentistry*, 17, 282-291, 1997), Biostite® (obținută din hidroxiapatită 9,5%, colagen tip I și condroitin sulfat), Periogen® (formată din colagen bovin tip I și III), BioGide® (formată din colagen de porc tip I și III) (Iviglia G. et al., *Journal of Functional Biomaterials*, 10, 3, 2019), etc.

Membranele resorbabile au multe beneficii ca produse medicale, fiind hemostatice, chemotactice și biocompatibile și permit formarea de țesuturi noi. Pe lângă aceste proprietăți, se impune ca produsele cu aplicații medicale să prezinte caracteristici structurale și mecanice pentru a conserva spațiul rănit și pentru a rezista împotriva forțelor externe, să inițieze integrarea tisulară, să nu producă inflamație și infecție, să fie ușor de utilizat pentru a reduce timpul de intervenție și disconfortul pacienților (Shin S.Y. et al., *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences*, Academic Press, Elsevier Inc, 459-469, 2015).

Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta propunere de invenție constă din realizarea unui nou biomaterial compozit condiționat ca hidrogel steril, biodegradabil și biocompatibil, având în compoziția sa componente biopolimerice specifice matricei extracelulare a țesuturilor cavității orale (colagen tip I, condroitin sulfat, acid hialuronic și fibronectină) cu efect de stimulare a procesului de regenerare a țesutului parodontal și nanoparticule de argint coloidal cu activitate antimicrobiană. În plus, condiționarea sub formă de hidrogel conferă produsului capacitatea de a umple situsul leziunii chiar și în profunzime.

Biomaterialul, conform propunerii de invenție, este un hidrogel compozit steril, biodegradabil și biocompatibil și este constituit din 60...80% colagen tip I obținut din tendon bovin sau piele bovină, cu greutatea moleculară medie cuprinsă între 250 și 350 kDa și o substanță uscată de 0,6...1,0%, 10...20% glicozaminoglican, ales dintre condroitin sulfat și acid hialuronic, cu un conținut în acizi uronici de minim 20%, 1...5% fibronectină obținută din plasmă bovină cu concentrația de 0,01...0,05%, 0,5...2% soluție dispersă de nanoparticule de argint cu un diametru maxim de 60 nm și concentrația de 0,01...0,02 mg/ml, 0,2...0,6% soluție de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDAC), 0,5...1,5% fosfat monosodic 200 mM și 0,03...0,1% bicarbonat de sodiu cu concentrația 4...10%, părțile fiind exprimate în greutate.

Procedeul de obținere al produsului, conform invenției, constă din aceea că se realizează un hidrogel compozit prin prepararea inițială a unei compoziții biopolimerice prin amestecarea sub agitare magnetică a unei soluții vâscoase de 0,6...1% colagen tip I acido-solubil obținut din tendon bovin sau piele bovină, dializat în prealabil față de apă distilată până la pH neutru, cu o soluție de 2...4% condroitin sulfat sau acid hialuronic și, în final, cu o soluție de fibronectină obținută din plasmă bovină de concentrație 0,01...0,05%, astfel încât raportul de combinare dintre cele trei componente să fie de 10:1:0,001...0,005 (g/g/g), la o temperatură de maxim 4 °C, timp de 5...10 ore; amestecul biopolimeric astfel obținut este menținut la rece, timp de 15...20 ore și apoi se omogenizează prin agitare continuă cu o soluție dispersă apoasă de nanoparticule de argint coloidal de concentrație 0,01...0,02 mg/ml, cu diametrul mediu mai mic de 60 nm, timp de 10...60 minute, la temperatura camerei, astfel încât raportul colagen:argint coloidal să fie de 1:0,001...0,005 (g/g); ulterior, compoziția obținută este supusă unei etape de reticulare, în vederea creșterii rezistenței produsului la degradarea enzimatică, prin adăugarea unei soluții de EDAC la o concentrație finală de 10...30 mM, sub agitare magnetică, la temperatura camerei, timp de 18...24 ore; urmează apoi etapa de gelificare care se realizează prin omogenizarea compoziției reticulate cu o soluție de fosfat monosodic 200 mM (pH 5,8...6,5) și apoi neutralizarea cu o soluție de bicarbonat de sodiu 4...10%, rezultând un amestec vâscos cu pH 7,0...7,4, care se incubează la temperatura de 37 °C, timp de 2...5

ore și se obține, în final, produsul sub formă de hidrogel solid, care se spală cu apă distilată de 3...5 ori câte 15...30 minute, apoi se decupează probe de biomaterial cu diametrul de 1...5 mm, se ambalează etanș în pungi speciale, se sterilizează prin expunere la radiații UV, timp de 8...15 ore sau cu radiații gamma la doze de 15...20 kGy.

Hidrogelul compozit biopolimeric, obținut în conformitate cu prezenta invenție, are următoarele avantaje:

- prezintă o eficiență mare în tratarea afecțiunilor paradontale (repararea ligamentului parodontal, a cementului și a osului alveolar) având în compoziția sa biopolimeri (colagen, glicozaminoglicani, fibronectină) care se găsesc, în mod natural, în țesuturile orale;
- poate fi utilizat ca matrice suport 3D pentru celule specifice cavității orale (fibroblaste gingivale, osteoblaste, celule stem din țesuturi orale), în vederea creșterii ratei de supraviețuire a celulelor după transplantare;
- este biocompatibil, nu produce inflamație, acționează ca o barieră împotriva infecțiilor și asigură absorbția optimă a fluidelor la nivelul țesutului lezat;
- umple situsul leziunii chiar și în profunzime, realizează un contact strâns cu zona lezată facilitând, astfel, influxul celulelor din țesutul înconjurător neafectat și proliferarea acestora în vederea formării noului țesut;
- componentele hidrogelului se dizolvă la locul aplicării printr-un proces de biodegradare controlată și au un efect sinergic asupra regenerării țesutului lezat;
- este ușor de manevrat, ceea ce determină reducerea timpului de intervenție și al disconfortului pacienților;
- este stabil în timp, nu creează toxicitate sau antigenicitate în contact cu organismul;
- procedeul de obținere este relativ simplu, nu necesită aparatură complexă și este fezabil.

Prezenta propunere de invenție se ilustrează prin următoarele exemple:

#### **Exemplul 1**

##### *Etapa I. Obținerea amestecului biopolimeric*

Se ia o cantitate de 1000 ml soluție de colagen tip I obținut din tendon bovin prin extracție cu acid acetic 0,5 M, se dializează față de apă distilată până la pH neutru, după care peste aceasta se adaugă, sub agitare magnetică, 30 ml soluție de condroitin sulfat de concentrație 2%. După 2 ore de agitare, la temperatura de 4 °C, se introduc peste amestecul obținut 6 ml soluție de fibronectină din plasmă bovină de concentrație 0,01% și se agită continuu timp de 5 ore în condițiile prezentate mai sus. Se formează astfel amestecul biopolimeric care se menține la rece timp de 15 ore. Peste

amestecul rezultat se adaugă 400 ml suspensie de nanoparticule de argint cu diametrul mediu de 60 nm și concentrația de 0,02 mg/ml, sub agitare magnetică, la temperatura camerei, timp de 20 de minute.

#### *Etapa II. Reticularea amestecului*

În vederea creșterii rezistenței la degradarea enzimatică a amestecului polimeric, se realizează reticularea chimică prin adăugarea unei soluții de EDAC, la o concentrație finală de 10 mM. Reticularea are loc la temperatura camerei timp de 18 ore, sub agitare continuă.

#### *Etapa III. Gelifierea*

Amestecul reticulat se supune procesului de gelifiere, care se realizează prin amestecarea compoziției reticulate cu o soluție de fosfat monosodic 200 mM, la sfârșitul acestui tratament compoziția are pH-ul 5,8-6,0. Se reglează apoi pH-ul în domeniul 7,0-7,4 cu o soluție de bicarbonat de sodiu 4%, rezultând un amestec vâscos. Se incubează acest amestec la temperatura de 37 °C, timp de 2 ore și se obține, în final, produsul sub formă de hidrogel solid, care se spală de 3 ori cu apă distilată câte 30 de minute.

#### *Etapa IV. Condiționarea*

Condiționarea hidrogelului constă din decuparea unor probe de hidrogel cu diametrul de 5 mm și ambalarea etanșă a acestora în pungi speciale. Probele ambalate se sterilizează prin expunere la radiații UV, timp de 10 ore.

### **Exemplul 2**

Este similar exemplului 1, cu deosebirea că amestecul biopolimeric este constituit din collagen tip I extras din piele bovină, de concentrație 0,8%, acid hialuronic cu un conținut de 27% acizi uronici și fibronectină din plasmă bovină de concentrație 0,02%, în raportul de combinare 10:1:0,005 (g/g/g). După agitarea magnetică, la temperatura camerei, timp de 7 ore, soluția se menține la rece, timp de 20 de ore și se amestecă cu soluția dispersă de nanoparticule de argint coloidal cu diametrul mediu de 40 nm, sub agitare magnetică, timp de 60 de minute, la temperatura camerei.

Etapele ulterioare corespund celor descrise în cadrul exemplului 1, cu excepția fazei de reticulare, care se face prin tratare cu o soluție de EDAC la o concentrație finală de 10 mM. În final, se obține hidrogelul în formă solidă, care se supune spălării repetate cu apă distilată, timp de 20 de minute fiecare spălare, apoi se ambalează și se sterilizează prin expunere la radiații gamma, la o doză de 15 kGy.

Hidrogelurile obținute conform exemplurilor de mai sus au fost caracterizate fizico-chimic, structural și biologic.

**Caracterizarea fizico-chimică** a constat din determinarea: (a) gradului de reticulare prin metoda TNBS, care cuantifică numărul de grupări amino libere; (b) gradului de gonflare prin măsurători gravimetrice ale probelor menținute într-o soluție tampon fosfat 0,1 M, la 37 °C, timp de 24 de ore și (c) gradului de biodegradare prin incubarea probelor în tampon TES, pH 7,4 care conține collagenază bacteriană, la temperatura de 37 °C, timp de 6 ore.

Rezultatele metodei cu TNBS au aratat că hidrogelurile solide obținute au prezentat un grad de reticulare ridicat, cu formarea de legături covalente intercatenare implicate în creșterea rezistenței materialului, care a variat între 85,14 % pentru varianta din exemplul 1 și 83,50% pentru varianta din exemplul 2, comparativ cu proba martor constituită dintr-o soluție de collagen simplă tratată similar cu probele, pentru care gradul de reticulare a fost de 63,37%.

Gradul de gonflare, indicator important al capacității biomaterialului de absorbție a exudatului la situsul leziunii, a variat între 2409% și 2227% pentru hidrogelurile biopolimerice din exemplul 1 și, respectiv, exemplul 2, comparativ cu 2042% pentru hidrogelul care conține numai collagen.

Biodegradarea enzimatică a hidrogelurilor a variat între 8,33% și 9,91% pentru hidrogelurile biopolimerice față de 12,04% în cazul hidrogelului de collagen simplu. Aceste valori ale gradului de biodegradare se corelează cu gradul de reticulare al hidrogelurilor, astfel că o creștere a acestuia a avut ca rezultat o degradare mai redusă.

### **Caracterizarea structurală**

Identificarea distribuției collagenului tip I, condroitin sulfatului și a fibronectinei în hidrogelurile biopolimerice s-a realizat prin tehnica imunohistochimică, folosind anticorpi primari anti-collagen I, anti-condroitin sulfat și anti-fibronectină, precum și anticorpi secundari specifici cuplați cu fluorofori. Imaginile de microscopie optică de fluorescență au indicat prezența collagenului tip I, ca fiind componentul major al hidrogelurilor reticulate, iar condroitin sulfatul (colorat în roșu) și fibronectina (colorată în verde) sunt distribuite uniform pe suprafața fibrelor de collagen (Fig. 1).

### **Evaluarea biocompatibilității *in vitro***

Pentru a evalua gradul de citotoxicitate al hidrogelurilor compozite, s-au utilizat în experimente două tipuri de culturi celulare, respectiv o cultură primară de fibroblaste gingivale și una de osteoblaste, care au fost însămânțate pe suprafața probelor (metoda contactului direct) și cultivate timp de 24 și, respectiv, 48 de ore. În acest context, s-a realizat un model experimental 3D de tip

matrice-celule pe care s-au investigat viabilitatea și proliferarea celulară utilizând kitul CCK-8, aderarea și morfologia celulelor prin microscopie optică. Rezultatele obținute au evidențiat efectul benefic al hidrogelurilor biopolimerice asupra viabilității și proliferării celulelor specifice țesuturilor din cavitatea orală (fibroblaste gingivale și osteoblaste în cultură) (valori mai mari de 80%) (Fig. 2). Cultivarea celulelor de tip fibroblast pe hidrogeluri a indicat că acestea proliferază și aderă ferm la suprafața acestora (Fig. 3). Densitatea celulară a fost mai mare în cazul hidrogelurilor compozite, comparativ cu hidrogelul de colagen simplu. Observațiile de microscopie optică au arătat că celulele aderate prezintă un aspect normal, caracteristic, similar cu cel al culturii martor.



**REVENDICĂRI**

1. Biomaterialul, conform propunerii de invenție, este un hidrogel compozit steril, biodegradabil și biocompatibil și este constituit din 60...80% collagen tip I obținut din tendon bovin sau piele bovină, cu greutatea moleculară medie cuprinsă între 250 și 350 kDa și o substanță uscată de 0,6...1,0%, 10...20% glicozaminoglican, ales dintre condroitin sulfat și acid hialuronic, cu un conținut în acizi uronici de minim 20%, 1...5% fibronectină obținută din plasmă bovină cu concentrația de 0,01...0,05%, 0,5...2% soluție dispersă de nanoparticule de argint cu un diametru de maxim 60 nm și concentrația de 0,01...0,02 mg/ml, 0,2...0,6% soluție de etil-dimetil-aminopropil carbodiimida (EDAC), 0,5...1,5% fosfat monosodic 200 mM și 0,03...0,1% bicarbonat de sodiu cu concentrația de 4...10%, părțile fiind exprimate în greutate.
2. Procedul de obținere al produsului, conform invenției, constă din aceea că se realizează un hidrogel compozit, în care se formează inițial o compoziție biopolimerică prin amestecarea, sub agitare magnetică, a unei soluții vâscoase de 0,6...1% collagen tip I acido-solubil, obținut din tendon bovin sau piele bovină, dializat în prealabil față de apă distilată până la pH neutru, cu o soluție de 2...4% condroitin sulfat sau acid hialuronic și, în final, cu o soluție de fibronectină obținută din plasmă bovină de concentrație 0,01...0,05%, astfel încât raportul de combinare dintre cele trei componente să fie de 10:1:0,001...0,005 (g/g/g), la o temperatură de maxim 4 °C, timp de 5...10 ore; amestecul biopolimeric astfel obținut este menținut la rece, timp de 15...20 de ore și, apoi, se amestecă prin agitare continuă cu o soluție dispersă apoasă de nanoparticule de argint coloidal, cu diametrul mediu mai mic de 60 nm, timp de 10...60 minute, la temperatura camerei; ulterior, compoziția obținută este supusă unei etape de reticulare, în vederea creșterii rezistenței produsului la degradarea enzimatică, prin adăugarea unei soluții de etil-dimetil-aminopropil carbodiimidă (EDAC) la o concentrație finală de 10...30 mM, sub agitare magnetică, la temperatura camerei, timp de 18...24 ore; urmează apoi etapa de gelifiere, care se realizează prin neutralizarea compoziției reticulate cu o soluție de fosfat monosodic 200 mM (pH 5,8...6,5) și, apoi, cu o soluție de bicarbonat de sodiu 4...10%, rezultând un amestec vâscos cu pH 7,0...7,4, care se incubează la temperatura de 37 °C, timp de 2...5 ore și se obține, în final, produsul sub formă de hidrogel solid, care se spală cu apă distilată de 3...5 ori câte 15...30 minute, apoi se decupează probe de biomaterial cu diametrul de 1...5 mm, se ambalează etanș în pungi speciale, se sterilizează prin expunere la radiații UV, timp de 8...15 ore sau cu radiații gamma la doze de 15...20 kGy.

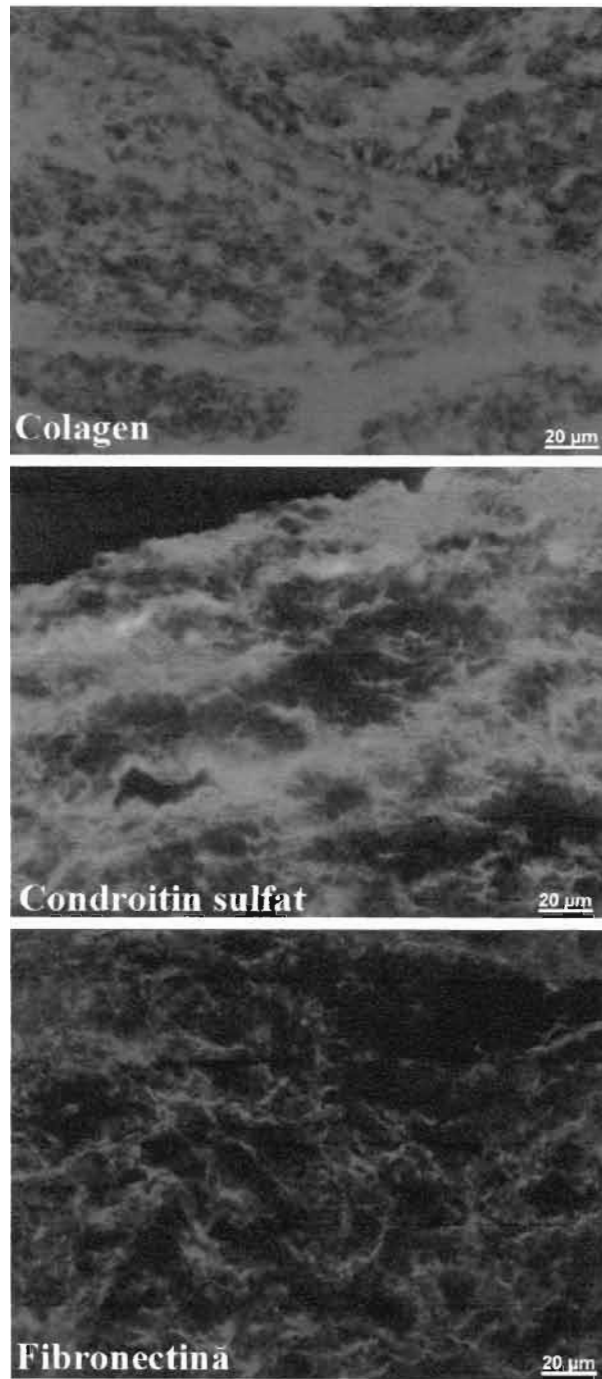


Fig. 1

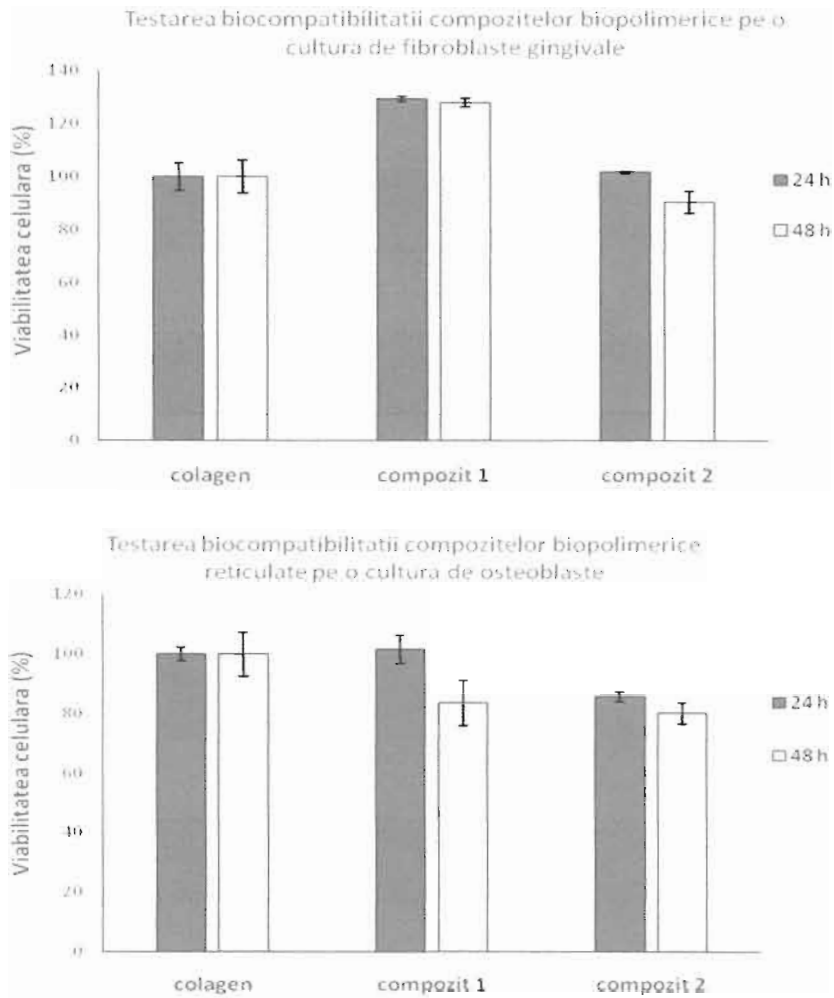


Fig. 2

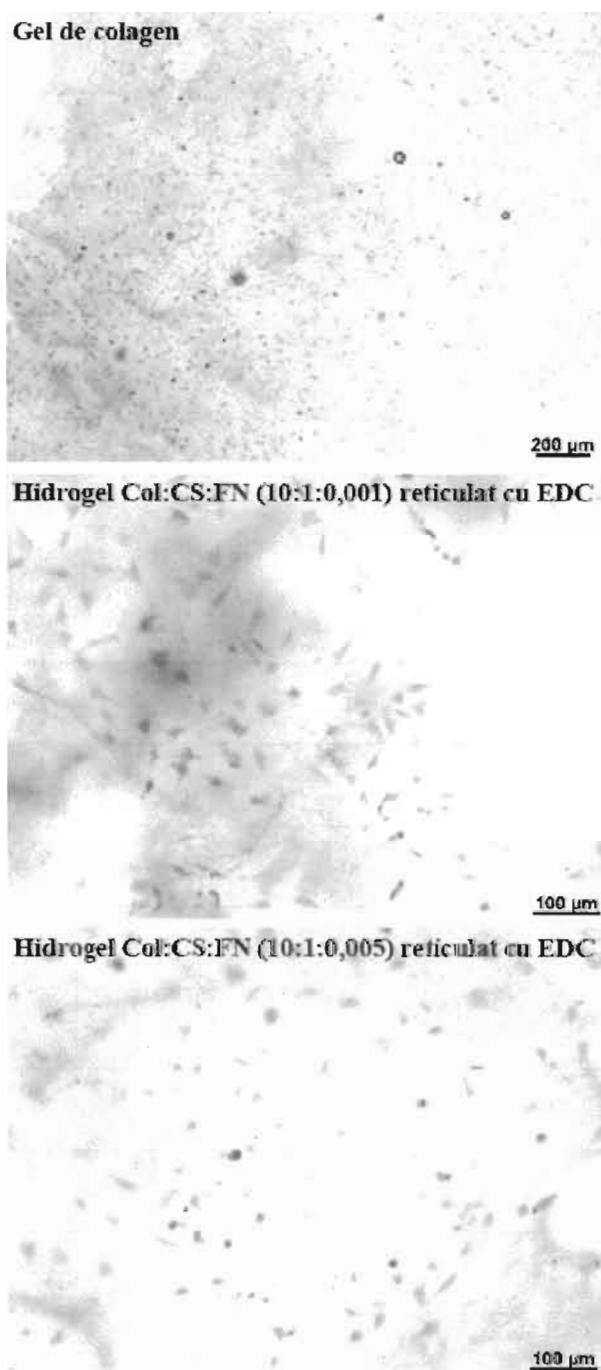


Fig. 3