



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00866

(22) Data de depozit: 05/12/2019

(41) Data publicării cererii:  
30/06/2021 BOPI nr. 6/2021

(71) Solicitant:  
• INSTITUTUL DE CHIMIE  
MACROMOLECULARĂ "PETRU PONI" DIN  
IAȘI, ALEEA GRIGORE GHICA VODĂ 41A,  
IAȘI, IS, RO

(72) Inventatori:  
• CIOLACU DIANA ELENA,  
ALEEA TRANDAFIRILOR, NR. 11, IAȘI, IS,  
RO;

• PETROVICI ANCA ROXANA,  
STR. STEJARULUI, NR.7, SAT HORPAZ,  
COMUNA MIROSLAVA, IS, RO;  
• MIHAILA ANDREEA CRISTINA,  
STR. TINERETULUI, NR.1334,  
SAT ZANEȘTI, COMUNA ZANEȘTI, NT, RO;  
• BUTOI ELENA, STR.HUEDIN, NR.7, BL.2,  
SC.2, AP.83, ET.3, SECTOR 4,  
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEU ȘI COMPOZIȚIE PENTRU OBTINEREA  
UNOR MATERIALE PE BAZĂ DE EXOPOLIZAHARIDE  
CU POTENȚIALE APLICAȚII ÎN INGINERIA TISULARĂ  
A VALVELOR AORTICE**

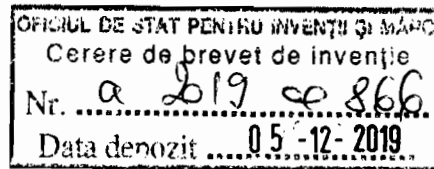
(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui material sub formă de hidrogel utilizat în ingineria tisulară a valvelor aortice. Procedeu, conform invenției, constă în dizolvarea unui amestec de exopolizaharidă bacteriană (EPZ)-celuloză microcristalină într-o soluție de 8% NaOH, la o temperatură de -29°C, timp de 24 h, se adaugă epilorhidrină la un raport molar R=4, după care compozițiile se reticulează la o temperatură de 85°C, timp de 5 min, gelurile obținute se imersează

într-o baie de apă, se usucă prin înghețare cu viteză lentă sau rapidă, în azot lichid și liofilizare ulterioară, rezultând hidrogeluri pe bază de EPZ-celuloză care prezintă viabilități celulare de peste 80%, indiferent de raportul celor două componente.

Revendicări: 3  
Figuri: 2





**PROCEDEU ȘI COMPOZIȚIE PENTRU OBTINEREA UNOR MATERIALE  
PE BAZĂ DE EXOPOLIZAHARIDE CU POTENȚIALE APLICAȚII  
ÎN INGINERIA TISULARĂ A VALVELOR AORTICE**

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui material sub formă de hidrogel, în urma reacției de reticulare chimică a unor exopolizaharide bacteriene obținute prin fermentarea tulpinii lactice *Weissella confusa* ICMPP29 cu celuloza, în diverse compoziții, în scopul utilizării lor în ingineria tisulară a valvelor aortice.

Este cunoscut faptul că hidrogelurile sunt unele dintre cele mai promițătoare materiale polimerice, care au atras un interes larg în ultimele decenii, dat fiind posibilitatea acestora de a fi proiectate într-o multitudine de structuri tri-dimensionale (3D), cu proprietăți specifice și cu o gamă largă de aplicații în diverse domenii, cum ar fi: medicină, farmacie, agricultură, industria alimentară, purificarea apei, etc [L. H. Fu, C. Qi, M. G. Ma, P. Wan, **Multifunctional cellulose-based hydrogels for biomedical applications, J. Mater. Chem. B, 7(10), 1541-1562, 2019**].

*Hidrogelurile* sunt rețele polimerice tri-dimensionale, caracterizate de o consistență moale, un grad de flexibilitate ridicat, și o capacitate de a se umfla și de a reține o cantitate

*Clara Dily*  
*Clara Dily*

substanțială de apă sau fluide biologice, fapt ce le oferă avantajul biocompatibilității cu țesuturile vii și a asemănării fizico-chimice cu matricea extracelulară (MEC). Mai mult, posibilitatea de a controla forma, dimensiunea, porozitatea și aspectele morfologice ale matricelor 3D a permis depășirea multiplelor provocări din domeniul ingineriei tisulare, cum ar fi vascularizarea și arhitectura țesuturilor, precum și creșterea concomitentă a mai multor tipuri de celule pe substrat, migrarea și proliferarea celulară ulterioară. Datorită acestor proprietăți, materialele polimerice și-au găsit aplicații ca sisteme pentru eliberarea controlată de principii active, iar în ingineria proiectării țesuturilor, ca matrici biodegradabile necesare în orientarea creșterii celulare pentru regenerarea tisulară și în transplantarea de celule noi în scopul înlocuirii celulelor distruse dintr-un țesut.

Se știe că, în funcție de natura polimerului constituent, hidrogelurile pot fi grupate în hidrogeluri obținute din polimeri naturali și cele realizate din polimeri sintetici. *Hidrogelurile pe bază de polimeri naturali* prezintă proprietăți importante, cum ar fi: biocompatibilitate, biodegradabilitate controlată, proprietăți mecanice similare țesuturilor biologice, non-toxicitate, etc. Aceste materiale 3D pot fi utilizate și clinic, datorită lipsei unui răspuns imun, sporind astfel performanța lor în sistemele biologice. Hidrogelurile pe bază de biopolimeri sunt utilizate frecvent în aplicații de inginerie tisulară, pentru înlocuirea sau refacerea țesuturilor umane moi sau dure, precum țesutul osos, cartilajinos, vascular, a meniscului, tendonului, pielii, corneei, etc., deoarece acestea aduc avantaje particulare, cum ar fi degradabilitatea ghidată a matricii și interacțiunea celulară inerentă [S. D. Dutta, D. K. Patel, K. T. Lim, **Functional cellulose-based hydrogels as extracellular matrices for tissue engineering**, *J. Biol. Eng.*, 13: 55, 1-19, 2019].

*Celuloza* este cel mai abundent polimer natural, cu o multitudine de posibilități de obținere, de la fibrele izolate din plante până la nanofibrilele produse de bacterii. Utilizarea celulozei în realizarea hidrogelurilor aduce un plus de valoare acestora, prin caracteristicile deosebite pe care le prezintă, cum ar fi biocompatibilitatea, biodegradabilitatea, non-toxicitatea, stabilitatea mecanică și termică, hidrofilicitatea și eficiența costurilor. În plus, prin proceduri relativ simple de modificare chimică a celulozei se obțin derivați ai celulozei cu funcționalități și proprietăți reglabile. Hidrogelurile pe bază de celuloză sau derivați de celuloză prezintă un potențial mare pentru o paletă largă de aplicații, de la materiale inteligente și agricultură, la sisteme de eliberare controlată a medicamentelor și inginerie tisulară. Realizarea unor structuri 3D hidrofile, cu costuri reduse, care asigură integritatea structurală a construcțiilor tisulare, organizarea celulelor (adeziune, creștere și proliferare) și direcționează formarea structurii de „scaffold” dorită, au stârnit un interes deosebit privind

aplicarea acestora în regenerarea tisulară [L.H. Fu, C. Qi, M.G. Ma, P. Wan, **Multifunctional cellulose-based hydrogels for biomedical applications**, *J. Mater. Chem. B*, 7, 1541-1562, 2019].

Se cunoaște faptul că hidrogelurile pe bază de celuloză cu aplicații în domeniul farmaceutic și biomedical sunt descrise în diferite brevete, cum ar fi;

- **US 5962005** - descrie procedeul de obținere a unui hidrogel transparent, pe bază de celuloză, utilizat ca materie primă a unui *material oftalmologic*, precum lentile de contact, cristalin artificial, cornee artificială, corp artificial vitros, etc. Metoda de obținere utilizată este reticularea fizică (reticulare realizată în lipsa unui agent de reticulare), care constă în coagularea și regenerarea celulozei în soluții apoase ce conțin un solvent organic de tipul: metanol, etanol, acetonitril, alcool izopropilic, acetonă, propanol sau tetrahidrofuran. Soluția apoasă de celuloză este obținută prin dizolvarea xantatului (xantogenat) de celuloză în soluții apoase alcaline, sau a celulozei în soluții cuproamoniacele, dimetil sulfoxid/paraformaldehidă, dimetilformamidă/tetraoxid de azot, dimetilformamidă/ trichloroacetaldehidă sau N, N-dimetilacetamidă/clorură de litiu. Brevetele **US 2013/0032059 A1** și **US 9211256 B2** prezintă obținerea unei clase de hidrogeluri pe bază de celuloză, urmând același procedeu de dizolvare/coagulare/regenerare a celulozei, însă utilizând celuloză din diverse surse, precum: (i) celuloza microbiană (microorganisme: *Gluconacetobacter*, *Agrobacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* sau *Alcaligenes*) sau bacteriană, (ii) celuloza din plante (celuloza chimică din lemn, celuloză din bumbac, celuloză microcristalină) sau (iii) derivați de celuloză: nitrat de celuloză (NC), acetat de celuloză (AC), carboximetilceluloză (CMC), metil celuloză (MC), hidroxietil celuloză (HEC), hidroxipropil celuloză (HPC), hidroxipropil metil celuloză (HPMC) sau o combinație a acestora. Hidrogelurile astfel obținute prezintă un conținut ridicat de apă, o transparență, o permeabilitate și o biocompatibilitate ridicată, rezistență mare la tracțiune și o grosime optimă, proprietăți care le fac deosebit de utile în *aplicații oftalmologice* sau ca *pansamente în tratarea rănilor*.
- **US 2010/0233234 A1** - se referă la un procedeu de obținere a unui hidrogelul pe bază de celuloză, utilizând metoda de electrofilare. În acest caz, matricea 3D realizată din fibre cu dimensiuni micronice și/sau nano, conține cel puțin doi derivați de celuloză solubili în apă, care sunt ulterior reticulați prin interacțiuni ionice. Matricea astfel obținută reprezintă un scaffold pentru susținerea și promovarea *regenerării și reparării cartilajelor*.

- **US 2011/0182957 A1** și **US 9193948 B2** - invențiile se referă la realizarea de hidrogeluri celulozice având proprietăți fizico-chimice optimizate, care permit creșterea și proliferarea celulară, astfel putând fi utilizate în *repararea și/sau reconstrucția țesuturilor moi*. Hidrogelurile obținute prezintă în compoziția lor derivați de celuloză de tipul: MC, HEC, CMC, metil hidroxietil celuloză (MHEC), metil hidroxipropil celuloză (MHPC) și metil hidroxietil hidroxipropil celuloză (MHEHPC) sau o combinație a acestora, iar rețeaua tridimensională se obține prin procesul de fotopolimerizare.
- **WO 2018/197946 A1** - descrie procedeul de obținere a unor hidrogelurilor bioadezive utilizate ca materiale de etanșare în multiple aplicații, cum ar fi *repararea și regenerarea țesuturilor moi și dure, în medicină dentară și în cosmetice*. Hidrogelurilor bioadezive pot fi folosite pentru stimularea epitelizării (închiderea plăgilor), la restaurarea structurii dinților și/sau a oaselor fracturate, aderarea dispozitivelor și aparatelor dentare și îmbunătățirea adeziunii produselor cosmetice la diverse părți a corpului. Acestea sunt realizate prin reticularea chimică (reticulare ce implică utilizarea unui agent de reticulare) a gelatinei, cu alginatul și fibrele de celuloză, în prezența unui agent de reticulare solubil în apă (carbodiimida), având ca rezultat obținerea unui hidrogel bioadeziv compozit cu proprietăți fizice și mecanice superioare.
- **WO 2019/217767 A1** - se referă la un procedeu de obținere a unor materiale compozite de tip nanofibre-hidrogeluri care restabilesc volumul pierdut al țesuturilor moi și promovează *regenerarea țesuturilor moi*. Hidrogelul este realizat din (i) acid hialuronic sau acid hialuronic funcționalizat, sau din (ii) derivați de celuloză, cum ar fi: acetat de celuloză, acetat de propionat de celuloză, acetat de butirat de celuloză, propionat de celuloză, butirat de celuloză, diacetat de celuloză sau triacetat de celuloză, prin reticulare chimică sau prin fotopolimerizare. Nanostructurile/nanofibrele sunt obținute prin electrofilare, utilizându-se un material polimeric hidrofil, hidrofob sau amfifil, în funcție de aplicația dorită.
- **CN 110229351 A** – prezintă procedeul de preparare a unor hidrogeluri ce conțin fibre cu proprietăți antibacteriene, realizat din derivați de celuloză (MC, HEC), suspensii coloidale de nanoparticule de dioxid de siliciu (SiO<sub>2</sub>) absorbite selectiv și Ciprofloxacina, ca agent antibacterian. Aceste hidrogeluri pot fi utilizate fie ca *pansamente regenerative pentru tratarea rănilor sau în igiena plăgilor*.

Se cunoaște faptul că brevetele **US 2015/0122687 A1** și **US 2017/0354765 A1** prezintă diferite procedee de obținere a unor proteze valvulară artificiale ce conțin hidrogeluri pe bază de celuloză. Astfel, în brevetul **US 2015/0122687 A1**, proteza valvulară artificială este

realizată dintr-o valvă biologică modificată, cuplată cu o structură polimerică ajustabilă și protejată de un ambalaj dublu steril. Valvele biologice sunt astfel tratate încât să permită depozitarea uscată a acestora, fără a necesita utilizarea unor soluții de stocare. Structura ajustabilă poate fi un hidrogel care se umflă și se extinde în prezența unei soluții saline sau a sângelui, realizat din derivați de celuloză (CMC, HEC sau HPMC) sau din diferiți polimeri sintetici: poli(oxid de etilenă), poli(2-hidroxiethyl metacrilat), poli(alcool vinilic), poliacrilamidă, polivinilpirolidonă, etc. Brevetul US 2017/0354765 A1 prezintă o proteză valvulară artificială realizată dintr-un stent de susținere, un element de valvă cardiacă și o cămașă polimerică. Cămașa polimerică este formată din celuloză bacteriană funcționalizată, ce prezintă o capacitate mai mare de umflare decât celuloza bacteriană netratată.

*Exopolizaharidele bacteriene (EPZ)*, polimeri naturali extracelulari, sunt produse și secretate de microorganisme de origine microbiană (bacterii și fungi), care prezintă o mare varietate de combinații structurale, ce le influențează proprietățile lor unice. Producția microbiană prezintă mai multe avantaje față de produsele obținute din plante sau din alge, cum ar fi utilizarea unor parametrii de producție bine-definiți și reproductibili, care permit evitarea influenței condițiilor de mediu asupra structurii ulterioare a EPZ, cât și obținerea unei calități ridicate a produsului final. Biocompatibilitatea inerentă și natura aparent non-toxică a EPZ a determinat utilizarea acestora în numeroase aplicații medicale cum ar fi, scaffold-uri în ingineria tisulară, sisteme de eliberare controlată de medicamente, pansamente, precum și ca agenți antioxidanți și antibiofilm, agenți antitumorali și anticarcinogeni, făcându-le astfel mult mai atractive comparativ cu polizaharidele obținute din plante și alge [M. Moscovici, **Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides**, *Front. Microbiol.*, 6:1012, 1-11, 2015].

Dintre polizaharidele cu origine bacteriană, dextranul este cea mai importantă formă, produsă la nivel industrial de bacterii lactice din genul *Leuconostoc* și utilizat pe scară largă în aplicații biomedicale datorită biocompatibilității sale, a toxicității scăzute și a costului de obținere relativ scăzut. Acest biopolimer a fost utilizat clinic timp de mai bine de cinci decenii ca substituent de plasma ce crește volumul plasmatic (plasma expander), ameliorator al fluxului periferic, agent antitrombotic și pentru îmbunătățirea proprietăților reologice, de exemplu, în cazul lacrimilor artificiale [G. Sun, J. J Mao, **Engineering dextran-based scaffolds for drug delivery and tissue repair**, *Nanomedicine (Lond)*, 7(11), 1771–1784, 2012]. În zilele noastre, aplicațiile și utilizarea dextranului depășesc cu mult utilizarea inițială ca transportor de molecule sau sistem de eliberare controlată a medicamentelor, fiind utilizat pentru a promova neovascularizarea și regenerarea pielii în arsurile de gradul III.



Conform invenției **EP 1184032 A1**, dextranul sau diverși derivați ai dextranului au fost utilizați în obținerea de hidrogeluri cu *aplicații farmaceutice, medicale și biotehnologice*, ca de ex. ca *sisteme de eliberare controlată* a principiilor active în aplicații *in vivo* și *in vitro*. Metoda constă în cristalizarea dextranului sau a unui derivat al dextranului, cu o greutate moleculară medie (Mw) de 2000 - 18000 Da, din soluția de dextran sau a derivatului acestuia. Când dextranul cristalizează din soluție, inițial se formează mici cristale, care ulterior cresc, cuprinzând apa în matricea formată și ducând în final la solidificarea sau gelifierea soluției. Ulterior, se formează un precipitat sub formă de hidrogel. Se consideră că hidrogelurile sunt formate din domenii cristaline mici care acționează ca legături de reticulare fizică între domeniile amorfe și contribuie astfel considerabil la stabilitatea hidrogelului.

Brevetul **US 2004/0185086 A1** se referă la un procedeu de obținere a unui hidrogel realizat din derivați de dextran (acrylyol-dex) și derivați ai acidului hialuronic (acrylyol-HyA), utilizați în diferite proporții și reticulați prin procesul de fotopolimerizare. Utilizarea acestor hidrogeluri în aplicațiile medicale, includ *prevenirea aderențelor chirurgicale, eliberarea controlată a medicamentelor, acoperirile tisulare, aderența la țesuturi și la structurile de susținere a țesuturilor și acoperirea dispozitivelor medicale și a articolelor conexe* înainte de introducerea acestora în organismul pacientului. Un alt tip de hidrogel pe bază de dextran realizat prin fotopolimerizare și utilizat în *aplicații medicale* este prezentat în brevetul **WO 2010/083039 A9**. Acesta este obținut prin expunerea metacrilatului de dextran, în mediu apos, la radiații ultraviolete (UV) sau la lumină vizibilă, în prezența riboflavonei/L-argininei sau riboflavonei/chitosanului pentru a determina fotoreticularea polizaharidului substituit cu grupări nesaturate. Brevetul **US 2010/0285086 A1** se referă la procedeul de obținere a unor hidrogeluri care imită MEC și la utilizarea acestora ca suport tri-dimensional pentru *creșterea și proliferarea celulară* (celule precursorale ale miocitelor, miocite cardiace, fibroblaste, fibroblaste cardiace, condrocite, osteoblaste, celule endoteliale, celule epiteliale, celule stem embrionare, celule neuronale, celule stem mezenchimale, etc). Hidrogelurile sunt realizate din două tipuri de dextran cu grade diferite de substituție, reticulate prin fotopolimerizare, a căror proprietăți mecanice sunt controlate de compozițiile utilizate.

Brevetul **US 2011/0076332 A1** prezintă procedeul de obținere a unui hidrogel biodegradabil pe bază de dextran și chitosan sau din formele modificate chimic a acestor polizaharide. Compoziția hidrogelurilor este proiectată în funcție de proprietățile mecanice dorite și de utilizările ulterioare ale acestora. În general, un grad mai mare de modificare chimică, conduce la o densitate mai mare de legături de reticulare și implicit la o gelifiere mai rapidă. Hidrogelul astfel obținut poate fi utilizat în ingineria tisulară pentru a restabili

structura țesuturilor deteriorate sau ca matrice, pentru proliferarea celulară. Componentele hidrogelului pot fi aplicate secvențial prin spreiere sau prin imersiune și se gelificază spontan la temperaturi fiziologice.

Brevetul **US 8821933 B2** se referă la un procedeu de obținere a unor hidrogeluri reticulate chimic, în componența cărora intră dextran și poloxamer sau derivați ai acestora, cu utilizări în *cosmetice și aplicații medicale*. Hidrogelurile pot fi utilizate ca *sisteme inteligente*, capabile să elibereze medicamente la schimbări de temperatură sau modificări ale pH-ului, *vehicul de livrare* a citokinelor, proteinelor, factorilor de creștere, și a biomarkerilor, ca *pansament* pentru vindecarea rănilor și arsurilor sau ca *matrice* pentru creșterea și proliferarea celulelor stem.

Alte procedee de obținere a unor hidrogelurilor pe bază de dextran sau dextran modificat chimic, reticulate prin metoda de reticulare chimică și care prezintă aplicații biomedicale, sunt prezentate în brevetele **CN 105111512 B**, **CN 104628885 B**, **CN 106039382 B**, **CN 109161036 A** și **WO 2019/210428**.

În ideea de a beneficia de proprietățile remarcabile atât ale celulozei, cât și a exopolizaharidelor bacteriene (EPZ) s-a procedat la realizarea unui hidrogel bi-component EPZ-celuloză. Exopolizaharida bacteriană utilizată în acest studiu are structură de dextran și a fost obținută prin fermentația tulpinii lactice *Weissella confusa* ICMPP29, izolată și purificată din iaurt comercial în laboratoarele Institutului de Chimie Macromoleculară „Petru Poni” (brevet **RO A 2017/00694**).

Se cunosc diverse procedee de obținere a hidrogelurilor pe bază de celuloză nativă sau pe bază de celuloză nativă-polimeri naturali/polimeri sintetici, care sunt prezentate în brevetele **RO 122780 B1** (hidrogel pe bază de celuloză sau alomorfi ai celulozei), **RO 123143 B1** (hidrogel pe bază de celuloză-xantan), **RO 126831 B1** (hidrogel pe bază de celuloză-condroitin sulfat) și **RO 127173 B1** (hidrogel pe bază de celuloză-lignină).

În urma studierii datelor de literatură, s-a stabilit că un dezavantaj în realizarea hidrogelurilor pe bază de celuloză este procesul de dizolvare al celulozei, care se realizează în cele mai multe cazuri cu solvenți costisitori, care prezintă o toxicitate ridicată și în condiții de reacție dificile, cum ar fi temperatură ridicată. Chiar dacă procedeul de realizare a hidrogelurilor pe bază de celuloză a fost îmbunătățit prin utilizarea metodei de dizolvare a celulozei în soluții apoase de NaOH, la temperaturi scăzute (-20 ÷ -30 °C), totuși a rămas problema obținerii unor hidrogeluri cu pori de dimensiuni uniforme și cu o distribuție îngustă a mărimii porilor, care în prezent este greu de controlat. Un alt dezavantaj al hidrogelurilor pe



bază de celuloză este faptul că acesta nu este degradat enzimatic în organismul uman, datorită lipsei enzimelor specifice (celulazelor).

Invenția de față oferă o soluție simplă pentru obținerea unui hidrogel cu consistență moale, asemănătoare matricii extracelulare, cu posibilitatea controlării dimensiunii și distribuției porilor, parametru important pentru creșterea și proliferarea celulară și cu o rezistență mecanică, o stabilitate dimensională și o viabilitate celulară îmbunătățită. În plus, exopolizaharida bacteriană cu structură de dextran (ICMPP29) utilizată în structura rețelei 3D a hidrogelului poate fi hidrolizată enzimatic în prezența dextranazei, enzimă care are capacitatea de a hidroliza legăturile glicozidice și care se găsește în organismul uman. Referitor la hidrogelurile pe bază de dextran, acestea prezintă dezavantajul unei rezistențe mecanice mai scăzute.

Problema tehnică propusă spre rezolvare de prezenta cerere constă în obținerea unui hidrogel pe bază de exopolizaharidă bacteriană-celuloză, cu potențiale aplicații în ingineria tisulară a valvelor aortice. Hidrogelul realizat prezintă o morfologie controlată, o rezistență mecanică ridicată și o capacitate îmbunătățită de creștere a celulele valvulare endoteliale (VEC) și a celulelor valvulare interstiale (VIC).

Constituenții hidrogelului EPZ-celuloză sunt:

- *celuloză microcristalină (C)* - Avicel PH-101, Sigma-Aldrich;
- *exopolizaharida bacteriană (EPZ)* - care este obținută prin fermentarea unei tulpini de bacterie lactică, izolată și purificată din iaurt comercial pe un mediu de cultură MRS agar suplimentat cu 1% CaCO<sub>3</sub>; tulpina lactică obținută și identificată prin analize moleculare ca fiind *Weissella confusa* ICMPP29, se cultivă în trei medii de cultură diferite: (i) mediu de cultură standard Man Rogosa Sharpe (MRS), glucoză și fructoză dizolvate în apă bi-distilată, (ii) MRS și sucroză dizolvate în apă bi-distilată precum și (iii) MRS și sucroză, ambele dizolvate în lapte UHT; mediile de cultură au fost incubate timp de 48 h la 33 °C, fără controlul pH-ului, în condiții statice și dinamice (100 rpm), după care se supun inactivării enzimatică la 100 °C, pentru 15 minute. La final, dextranul obținut se supune extracției și purificării după care se usucă prin liofilizare.

Hidrogelul pe bază de EPZ-celuloză, conform invenției, constă în aceea că este constituit din 0...100% în greutate exopolizaharidă bacteriană (EPZ) și 100...0% în greutate celuloză (C), iar procedeul de obținere, conform invenției, constă în aceea că 1 g amestec de EPZ-celuloză, în diferite rapoarte gravimetrice, se dizolvă într-o soluție de 8% NaOH, la o temperatură de -29 °C, timp de 24 ore, după care peste amestecul de polimeri dizolvați se

adaugă epichelorhidrină, la un raport molar  $R = 4$  ( $R = n \text{ mol ECH} / n \text{ mol AGU}$ ), iar compozițiile rezultate se reticulează la o temperatură de 85 °C, timp de 5 h, pentru ca apoi gelurile obținute să se imerseze într-o baie de non-solvent (apă) și să se spele de mai multe ori în vederea coagulării acestora și eliminării produselor secundare de reacție, iar la final, hidrogelurile obținute se usucă prin două metode: (i) *metoda I* - înghețare cu viteză lentă (la -20 °C) și liofilizare ulterioară și (ii) *metoda II* - înghețare rapidă, în azot lichid (la -196 °C) și uscarea corespunzătoare prin liofilizare.

Hidrogelul pe bază de exopolizaharidă bacteriană-celuloză, conform invenției, prezintă următoarele avantaje:

- prezintă o stabilitate dimensională în timp, după mai multe cicluri de umflare/uscare,
- este biocompatibil și nu este toxic,
- are o rezistență mecanică bună, determinată de prezența celulozei în matrice,
- are o viabilitate celulară ridicată,
- prezența exopolizaharidei bacteriene permite biodegradarea controlată a matricii polimerice în organismul uman.

În continuare sunt redate două exemple de realizare a invenției, cu referire și la datele prezentate în **Tabelul 1**.

**Exemplu 1.** Se dizolvă 1 g amestec de EPZ-celuloză, în diverse porții de 0...100% în greutate exopolizaharidă bacteriană (EPZ) și 100...0% în greutate celuloză (C), într-o soluție de 8% NaOH, la o temperatură de -29 °C, timp de 24 ore, după care peste amestecul de polimeri dizolvați se adaugă epichelorhidrină, la un raport molar  $R = 4$ , iar compozițiile rezultate se reticulează la o temperatură de 85 °C, timp de 5 h. În etapa următoare, gelurile obținute se imersează într-o baie de non-solvent (apă) și se spală de mai multe ori în vederea coagulării acestora și eliminării produselor secundare de reacție, iar la final, hidrogelurile obținute se usucă prin *metoda I* - înghețare cu viteză lentă (la -20 °C) și la final, liofilizare.

**Exemplu 2.** Se dizolvă 1 g amestec de EPZ-celuloză, în diverse porții de 0...100% în greutate exopolizaharidă bacteriană (EPZ) și 100...0% în greutate celuloză (C), într-o soluție de 8% NaOH, la o temperatură de -29 °C, timp de 24 ore, după care peste amestecul de polimeri dizolvați se adaugă epichelorhidrină, la un raport molar  $R = 4$ , iar compozițiile rezultate se reticulează la o temperatură de 85 °C, timp de 5 h. În etapa următoare, gelurile obținute se imersează într-o baie de non-solvent (apă) și se spală de mai multe ori în vederea coagulării acestora și eliminării produselor secundare de reacție, iar la final, hidrogelurile

obținute se usucă prin *metoda II* - înghetare rapidă, în azot lichid (la  $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) și uscare prin liofilizare.

*Gradul de umflare* ( $Q_{\max}$ ) a hidrogelurilor EPZ-celuloză a fost determinat cu ajutorul ecuației:

$$Q_{\max} = [(m - m_0)/m_0] \cdot 100 (\%), \quad (1)$$

unde:  $m_0$  – greutatea hidrogelului uscat (g);  $m$  – greutatea hidrogelului umflat (g).

Caracteristicile morfologice ale hidrogelurilor EPZ-celuloză au fost studiate prin *microscopia electronică de baleiaj (SEM)* cu ajutorul unui microscop electronic de baleiaj Quanta 200 (FEI, Olanda).

*Proliferarea celulară pe suporturile polimerice* - Proliferarea celulelor valvulare endoteliale umane (VEC) și a celulelor interstițiale (VIC) pe hidrogelurile EPZ-celuloză (CD-II) a fost evaluată folosind testul XTT, în prezența a 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide, conform protocolului producătorului (Roche).

Pe scurt, hidrogelurile CD-II au fost tăiate cu o lamă fină dublă, în bucăți mici ( $\sim 5\text{ mm} \times 5\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ ) și introduse într-o placă de cultură cu 96 de godeuri, sterilizate prin expunerea la lumină UV (30 minute pentru fiecare parte), apoi hidratate peste noapte în mediu de cultură (DMEM). A doua zi, hidrogelurile sau godeul de control (fără hidrogel) au fost cultivate cu 7500 celule/godeu timp de 48 de ore, în 10% DMEM. După 48 de ore, DMEM a fost înlocuit cu o soluție de lucru XTT (XTT amestecat cu un reactiv de cuplare a electronilor), urmat de o incubare timp de 2-3 ore, la  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ . După incubare, viabilitatea celulară a fost determinată cu ajutorul spectrometrului UV-VIS, prin măsurarea absorbției la 450 nm și la 660 nm. Au fost realizate trei experimente diferite, iar datele au fost exprimate ca procente în raport cu celulele de control.

Caracteristicile generale ale hidrogelurilor obținute, și anume gradul de umflare, randamentul de obținere și mărimea medie a porilor, sunt prezentate în **Tabelul 1**.

Se observă o diferență clară determinată de metoda de uscare utilizată, care este reflectată atât asupra gradului de umflare a hidrogelurilor EPZ-celuloză, dar mai ales asupra dimensiunii medii a porilor matricilor tri-dimensionale obținute (**Figura 1**). Astfel, gradul maxim de umflare al acestor hidrogeluri crește cu creșterea cantității de EPZ din biomatrice, ceea ce demonstrează funcționarea EPZ ca agent de expandare a structurii 3D a hidrogelurilor, datorită capacității mari de umflare a acestui polizaharid. În ceea ce privește randamentul de obținere a hidrogelurilor, acesta scade cu creșterea cantității de EPZ din matrice.

**Tabelul 1.** Caracteristici ale hidrogelurilor EPZ-celuloză

Proba	Compozitie, %		Qmax, %		$\eta$		Dimensiunea medie a porilor, $\mu\text{m}$	
	celuloza	EPZ	I	II	I	II	I	II
C	100	0	1875	2280	99,76	98,63	210,6	35,5
CD-1	75	25	2441	2718	96,18	97,16	140,4	44,4
CD-2	66	33	2436	3306	94,41	97,07	104,5	44,0
CD-3	50	50	2601	3620	93,44	88,15	102,2	41,6
CD-4	33	66	2714	4139	85,10	84,91	88,7	34,8
CD-5	25	75	2963	2668	76,61	80,80	71,7	27,1
D	0	100	3167	5013	68,55	65,60	26,8	14,7

**Figura 1.** Imagini SEM ale hidrogelurilor EPZ-celuloză obținute prin tehnici de uscare diferite (metoda I și metoda II)

Microscopia electronică de baleiaj (SEM) a fost utilizată pentru a evalua caracteristicile morfologice ale hidrogelurilor pe bază de EPZ-celuloză, în ceea ce privește integritatea, aspectul, porozitatea și nivelul de consistență. Morfologia hidrogelurilor liofilizate a variat semnificativ cu compoziția acestora și cu metoda de uscare utilizată, în ceea ce privește densitatea, dimensiunea și distribuția porilor. Analiza microgرافیilor SEM a hidrogelurilor obținute a indicat faptul ca matricile polimerice prezintă structuri de rețea 3D, sunt poroase, bine definite și interconectate (**Figura 1**).

Structura morfologică a hidrogelurilor este o consecință directă a tehnicii de uscare, așa cum se poate observa în imaginile SEM corespunzătoare fiecărui tip de material. Când operația de înghețare se realizează în congelator (*metoda I*), formarea gheții se desfășoară într-un ritm mai lent și generează cristale de dimensiuni mari, care se transformă în pori mari de dimensiuni neregulate (seria CD-I). Procesul de înghețare de mare viteză efectuat în azot lichid (*metoda II*) generează o organizare poroasă mai fină și o scădere a dimensiunii porilor, așa cum se poate observa în microgرافیile seriei CD-II. În acest caz, analiza SEM a evidențiat suprafețe mai uniforme, extrem de poroase, cu pori bine definiți și mai omogeni. Aceste

afirmații sunt confirmate de datele obținute pentru dimensiunea medie a porilor (**Tabel 1**), când se observă clar faptul că *metoda I* de uscare a hidrogelurilor conduce la obținerea unor pori de dimensiuni mari, cu valori cuprinse între  $26,8 \div 210,6 \mu\text{m}$ , pentru ca în cazul utilizării *metodei II*, dimensiunea medie a porilor să scadă pronunțat la valori cuprinse între  $14,7 \div 44,4 \mu\text{m}$ , valoarea maximă ( $44,4 \mu\text{m}$ ) fiind înregistrată pentru proba CDII-1.

De asemenea, s-a observat ca morfologia hidrogelurilor depinde și de compoziția acestora și anume, prezența unui conținut mai mare de celuloză în hidrogeluri conduce la o morfologie mai puțin omogenă, cu pori mai mari și o distribuție mai largă a dimensiunii porilor (seria CD-I), fapt care determină o obstrucție a interconectivității acestora. Introducerea EPZ în structura hidrogelurilor îmbunătățește morfologia acestora care astfel devine mai omogenă, cu porozitate uniform distribuită și cu pori interconectați.

Pentru a evalua viabilitatea celulară a hidrogelurilor pe bază de EPZ-celuloză (CD-II) s-au utilizat două tipuri de celule: (i) celulele valvulare endoteliale (VEC) și (ii) celulele valvulare interstițiale (VIC).

Celulele primare VEC și VIC au fost recoltate din foițele valvulare necalcificate (sau porțiuni din foițe) ale valvelor aortice umane calcificate, obținute de la pacienții cu valva aortică calcificată, care au suferit o înlocuire chirurgicală a valvei, conform protocolului Spitalului Militar Central de Urgență „Dr. Carol Davila”. Experimentele au fost realizate în conformitate cu principiile enunțate în Declarația de la Helsinki, pentru experimentele care implică probe umane, iar Comitetul de Etică al Institutului de Biologie și Patologie Celulară „Nicolae Simionescu” București a aprobat acest studiu.

Depozitele de calciu sau leziunile îngroșate au fost îndepărtate, iar țesutul rezultat a fost tăiat în bucăți mici, care au fost degradate enzimatic timp de 5-10 minute cu collagenază I (Biochrome/Merck) la  $37^\circ\text{C}$ . Celulele endoteliale valvulare eliberate au fost apoi colectate într-un tub, centrifugate și cultivate în plăci de cultură sau flask-uri (acoperite în prealabil cu gelatină) în DMEM cu 20% ser bovin fetal (FBS; Gibco) și 100 U/mL penicilină, 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  streptomycină, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  neomicină (Sigma-Aldrich, Germania) într-un incubator umidificat cu 5%  $\text{CO}_2$  la  $37^\circ\text{C}$ .

Pentru izolarea VIC, bucățile de foițe valvulare au fost în continuare degradate enzimatic cu Liberaza TL (Roche, Sigma), timp de 4-5 ore. VIC-urile rezultate au fost cultivate în vase Petri sau flask-uri, în DMEM cu 15% FBS și antibiotice. La primul pasaj celular, VEC-urile CD31 pozitive au fost purificate folosind anticorpul anti-CD31 conjugat cu bile magnetice (Miltenyi Biotec, Germania).



Fenotipul VEC a fost confirmat prin apariția inhibiției de contact la confluență și prin expresia markerilor endoteliali specifici precum PECAM1 (CD31), Factorul Von Willebrand (vWF) și fenotipul VIC prin expresia vimentinei și a actinei musculare netede alfa ( $\alpha$ -SMA).

Viabilitatea celulelor aflate în contact cu suprafețele hidrogelurilor a fost comparată cu cea a celulelor care nu au fost expuse la hidrogeluri (grup de control - Ctrl TCP) pentru a determina dacă rețelele 3D bazate pe EPZ și celuloză au produs vreun efect citotoxic (**Figura 2**).

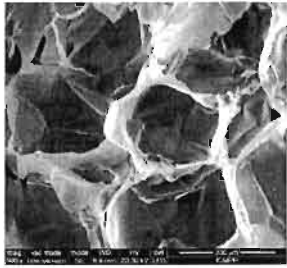
**Figura 2.** Viabilitatea hidrogelurilor EPZ-celuloză determinată pentru (a) celulele VEC și (b) celulele VIC

Prin utilizarea testelor XTT de determinare a viabilității relative a celulelor valvulare endoteliale (VEC) și a celulelor valvulare interstițiale (VIC), s-a observat că viabilitatea hidrogelurilor crește cu creșterea conținutului de celuloză din compoziția hidrogelului. Se observa în plus, faptul că viabilitatea celulelor în contact cu hidrogelurile s-a dovedit a fi mai mare atunci când se utilizează celule valvulare interstițiale (proba C: VIC - 106%), decât în cazul celulelor valvulare endoteliale (proba C: VEC - 95%).

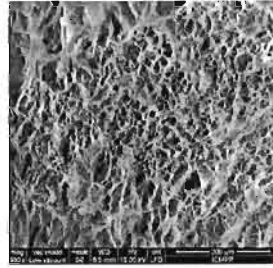
Ca o concluzie, se poate spune că toate hidrogelurile pe bază de EPZ-celuloză prezintă viabilități celulare foarte bune, de peste 80%, indiferent de raportul dintre cele două componente.

### Revendicări

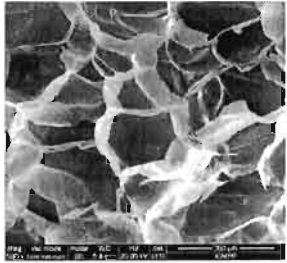
1. Compoziția hidrogelului absorbant pe bază de exopolizaharidă bacteriană-celuloză, **caracterizat prin aceea că**, este constituit din 0...100% în greutate exopolizaharidă bacteriană (EPZ) și 100...0% în greutate celuloză microcristalină (C), părțile fiind exprimate în procente de greutate.
2. Procedul de obținere a unui hidrogel absorbant pe bază de EPZ-celuloză, **caracterizat prin aceea că**, se dizolvă 1 g amestec de EPZ-celuloză, în diferite rapoarte gravimetrice, se dizolvă într-o soluție de 8% NaOH, la o temperatură de -29 °C, timp de 24 ore, după care peste amestecul de polimeri dizolvați se adaugă epichelorhidrină, la un raport molar  $R = 4$ , iar compozițiile rezultate se reticulează la o temperatură de 85 °C, timp de 5 h, pentru ca apoi gelurile obținute să se imerseze într-o baie de non-solvent (apă) și să se spele de mai multe ori în vederea coagulării acestora și eliminării produselor secundare de reacție, iar la final, hidrogelurile obținute se usucă prin *metoda I* - înghețare cu viteză lentă (la -20 °C) și liofilizare ulterioară.
3. Procedul de obținere a unui hidrogel absorbant pe bază de EPZ-celuloză, **caracterizat prin aceea că**, se dizolvă 1 g amestec de EPZ-celuloză, în diferite rapoarte gravimetrice, se dizolvă într-o soluție de 8% NaOH, la o temperatură de -29 °C, timp de 24 ore, după care peste amestecul de polimeri dizolvați se adaugă epichelorhidrină, la un raport molar  $R = 4$ , iar compozițiile rezultate se reticulează la o temperatură de 85 °C, timp de 5 h, pentru ca apoi gelurile obținute să se imerseze într-o baie de non-solvent (apă) și să se spele de mai multe ori în vederea coagulării acestora și eliminării produselor secundare de reacție, iar la final, hidrogelurile obținute se usucă prin *metoda II* - înghețare rapidă, în azot lichid (la -196 °C) și uscarea corespunzătoare prin liofilizare.



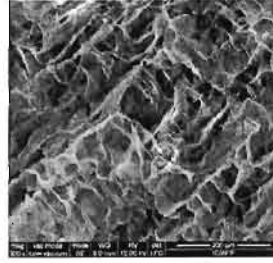
CDI-I



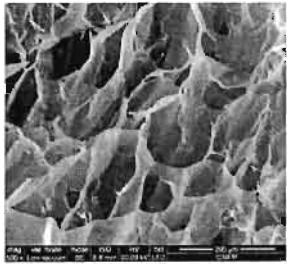
C-II



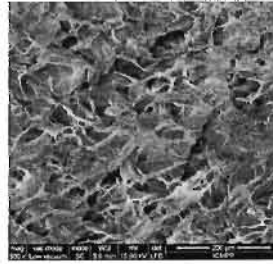
CDI-1



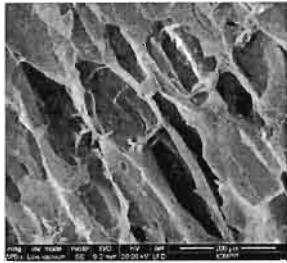
CDII-1



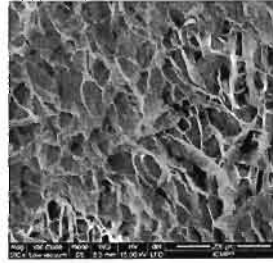
CDI-2



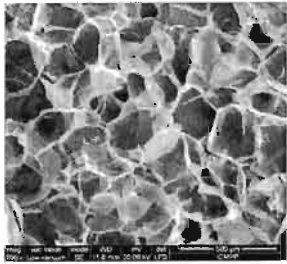
CDII-2



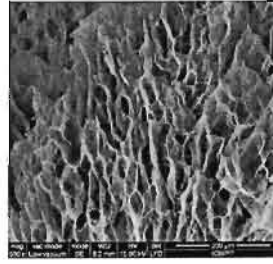
CDI-3



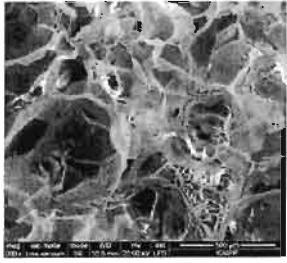
CDII-3



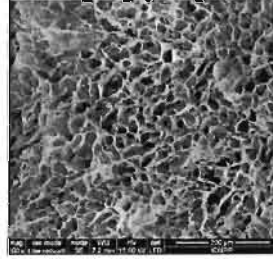
CDI-4



CDII-4



CDI-5

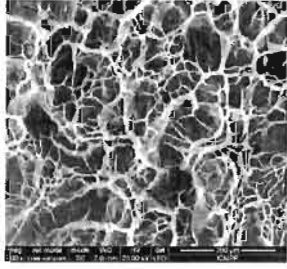


CDII-5

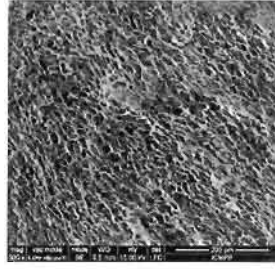
*Theresa J. Hill*  
*Dr. Hill*



48



D-I



D-II

Figura 1

*Alvaro Díaz  
Cristóbal*

64

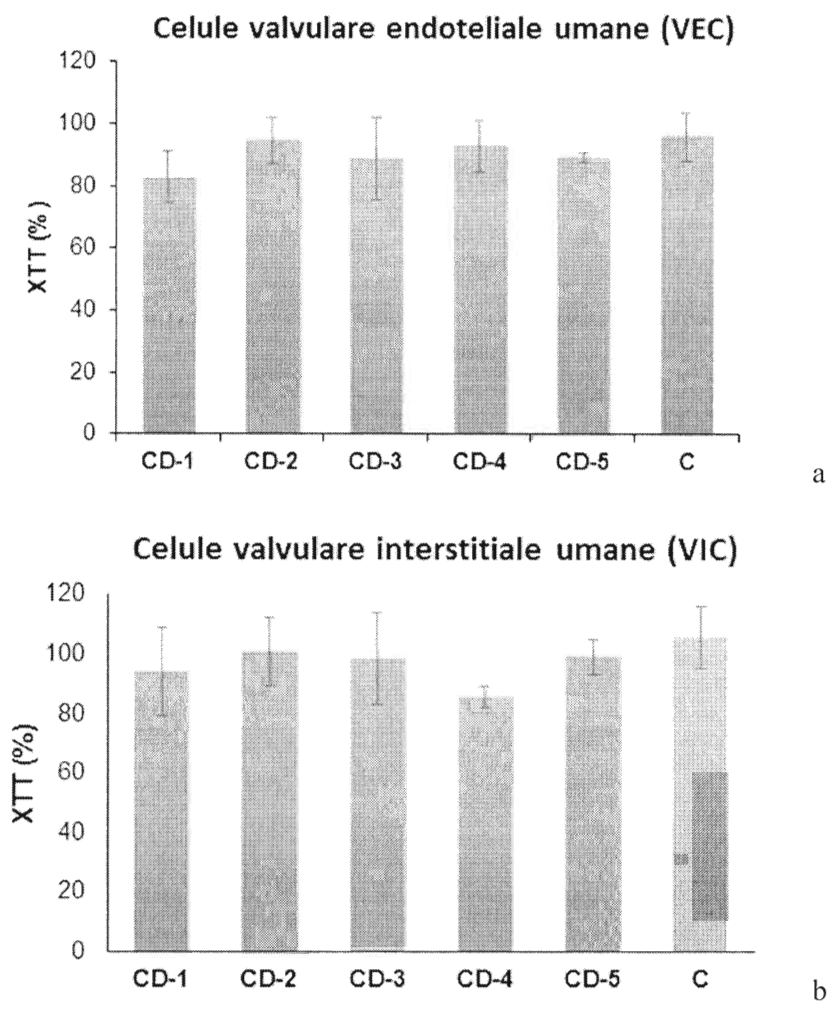


Figura 2

*Handwritten signatures:*  
Alex Del  
Cristian Albu