



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00483

(22) Data de depozit: 09/08/2022

(41) Data publicării cererii:
30/01/2023 BOPI nr. 1/2023

(71) Solicitant:
• INSTITUTUL NAȚIONAL DE
CERCETARE-DEZVOLTARE PENTRU
ȘTIINȚE BIOLOGICE BUCUREȘTI,
SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR. 296,
SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• ȘTEFAN LAURA MIHAELA,
STR. DEALUL ȚUGULEA NR. 54, BL. B9,
SC. A, AP. 26, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• UȚOIU ELENA, STR. TEIUL DOAMNEI,
NR.6, BL.22, SC.A, ET.2, AP.8, SECTOR 2,
BUCUREȘTI, B, RO;

• SECIU-GRAMA ANA-MARIA,
BD. 1 DECEMBRIE 1918, NR.22, BL.3, SC.1,
ET.6, AP.28, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO;
• PRELIPCEAN ANA- MARIA, STR.SG.NIȚU
VASILE NR.66, BL.25, ET.3, SC.2, AP.52,
SECTOR 4, BUCUREȘTI, B, RO;
• IOSĂGEANU ANDREEA,
STR.REVOLUȚIEI, NR.704,
SAT TABARASTI, COMUNA GĂLBINAȘI,
BZ, RO;
• MOLDOVAN LUCIA,
BD.CONSTRUCTORILOR NR.24, BL.19,
SC.A, AP.13, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B,
RO;
• CRĂCIUNESCU OANA,
BD.NICOLAE GRIGORESCU NR.33, BL.A 1,
SC.3, AP.33, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B,
RO

(54) BIOMATERIAL COMPOZIT POROS CU PROPRIETĂȚI
DE STIMULARE A REGENERĂRII ȚESUTULUI DERMIC

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unui biomaterial compozit poros cu proprietăți de stimulare a regenerării țesutului dermic. Procedeu, conform invenției, constă în etapele: preparare a unei soluții de alginat de sodiu de concentrație 3%, respectiv, a unei soluții de gelatină 4%, precum și a unei soluții de alcool polivinilic de concentrație 10%, prin dizolvare în apă ultrapură, sub agitare continuă, răcirea soluțiilor preparate la temperatura de maximum 40°C, amestecare cu agitare puternică, în rapoarte masice de 1:0,2...0,5:0,1...0,4, adăugare a unei pulberi de metilceluloză, urmată de răcire și adăugare a 0,01...0,1%

fibronectină sau heparină, repartizarea compoziției polimerice în plăci Petri și incubarea la 4°C timp de 30 min, reticulare a gelurilor prin imersare într-o soluție de clorură de calciu 2% timp de 2...3 h, urmată de spălare repetată de 3...5 ori, liofilizarea gelurilor reticulate timp de 48...72 h, urmată de tăierea la dimensiuni, din care rezultă un biomaterial poros la dimensiuni dorite care este sterilizat prin iradiere cu radiații UV, timp de 8...12 h.

Revendicări: 2
Figuri: 2

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).



OFICIUL DE STAT PENTRU INVENȚII ȘI MĂRCI	
Cerere de brevet de invenție	
Nr.	a 2022 0483
Data depozit	09-08-2022

BIOMATERIAL COMPOZIT POROS CU PROPRIETĂȚI DE STIMULARE A REGENERĂRII ȚESUTULUI DERMIC

Autori:

Ștefan Laura Mihaela, Uțoiu Elena, Seciu-Grama Ana-Maria, Prelipcean Ana-Maria, Iosăgeanu Andreea, Moldovan Lucia, Crăciunescu Oana

Prezenta propunere de invenție se referă la un nou biomaterial compozit poros pe bază de polimeri naturali și sintetici utilizabil în medicină ca suport pentru stimularea procesului de regenerare a leziunilor țesutului dermic, precum și la un procedeu de obținere al acestuia.

Biomaterialul se prezintă sub formă de compozit polimeric cu structură poroasă, biocompatibil și biodegradabil, cu proprietăți fizico-chimice și biologice care stimulează viabilitatea, proliferarea și aderarea celulelor specifice țesutului dermic (fibroblaste, keratinocite) în structura sa alveolară, facilitând astfel procesul de vindecare a leziunilor.

Pielea este cel mai vast și complex organ al corpului uman, care joacă un rol important în menținerea homeostaziei, precum și în protecția față de mediul înconjurător și împotriva agenților patogeni. Structura complexă, ierarhică și stratificată a pielii acționează ca o barieră fizică împotriva pătrunderii de xenobiotice în organism și, de asemenea, reglează transportul apei și a metaboliților în afara organismului (Lee V et al., *Tissue Engineering C: Methods*, 20, 473-484, 2014; Yan WC et al., *Advanced Drug Delivery Reviews*, 132, 270-295, 2018). Rănile care provin din traume fizice sau chimice pot compromite semnificativ bariera pielii și pot afecta funcțiile sale fiziologice. În cazul în care o parte importantă a pielii a fost pierdută în urma unei traume, înlocuirea pielii lezate cu grefe devine critică pentru a proteja pierderea apei din organism, a atenua riscul reprezentat de agenții patogeni și a promova procesul de vindecare.

Folosirea de biomateriale pe bază de polimeri naturali și sintetici, care se aseamănă structural și funcțional cu țesuturile umane, precum și a unor surse de celule reprezintă o alternativă la grefele de piele (Jang J et al., *Biomaterials*, 156, 88-106, 2018). Aceste biomateriale trebuie să îndeplinească anumite caracteristici, cum ar fi: să fie ușor de manevrat și aplicat pe suprafața lezată, să fie biodegradabile, necitotoxice, să prezinte o reactivitate inflamatorie minimă, să fie bine tolerate de organism, să stimuleze proliferarea și aderarea celulară, să aibă proprietăți fizice și mecanice

adecvate și să asigure reconstrucția țesutului normal (Vyas & Vasconez, In: *Healthcare (Basel, Switzerland)*, 2(3), 356-400, 2014).

În ultimii ani, există un interes crescut pentru dezvoltarea de biomateriale compozite în vederea autorizării lor în construcția unor substituenți echivalenți de piele. Interesul pentru aceste materiale se bazează, în principal, pe faptul că structura și proprietățile lor sunt similare cu cele ale matricei extracelulare native (Caliari SR et al., *Nature Methods*, 13(5), 405-414, 2016).

Se știe că, matricile poroase pe bază de polimeri naturali, cum sunt colagenul și gelatina, sunt biocompatibile, prezintă proprietăți hemostatice, biodegradabilitate controlată, antigenicitate scăzută, precum și capacitate de a stimula creșterea și proliferarea celulelor (Suarato G et al., *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 6, 137, 2018). Aplicate pe răni, ca și pansamente, acestea sunt hemostatice, absorb exudatul rănii și mențin un mediu prielnic pentru creșterea celulelor, stimulând astfel procesul de vindecare (Gorgieva S & Kokol V, In: *Biomaterials Applications for Nanomedicine*, 17-52, 2011). Studii anterioare au descris o serie de compozite obținute prin combinarea biopolimerilor colagen și gelatină cu alți compuși naturali, precum polizaharidele de origine animală (acid hialuronic, chitosan) sau vegetală (celuloză), polifenoli din plante și diverși polimeri sintetici biocompatibili (poliuretani, alcool polivinilic, polietilen glicol, acid polilactic, polivinil pirolidonă, etc) (Gaspar-Pintiliescu A et al., *International Journal of Biological Macromolecules*, 138, 854-865, 2019; Vasile C et al., *Polymers*, 11(6), 941, 2019; Râpă M et al., *Brevet RO 132576B1/2021*).

În literatura brevetelor s-a raportat că proteinele și polizaharidele matricei extracelulare, precum colagenul și glicozaminoglicanii (condroitin sulfat, acid hialuronic) 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 remodelarea și reepitelizarea țesutului (*Brevet RO 115693B1/2000*). De asemenea, au fost descrise compoziții pentru ghidarea regenerării tisulare pe bază de colagen și chitosan cu efect în tratarea escarelor pielii. S-a observat că acest material compozit condiționat sub formă de bureți, hidrogeluri sau nanofibre, prezintă proprietăți biocompatibile, nu produce inflamație și este necitotoxic, are performanțe mecanice bune și eficiență în stimularea creșterii celulare (*Brevet EP 3620186A1/2020*). În brevetul *WO2019175036A1* este prezentată o metodă de obținere a unui material poros pentru regenerarea tisulară pe baza unui amestec format dintr-o proteină insolubilă, fibroina și polizaharidele acid hialuronic și celuloză. Produsul realizat prezintă un grad scăzut de biodegradare la locul aplicării și mimează structura matricei extracelulare. Brevetul *WO2004002460A1* descrie un produs pentru tratarea pielii lezate pe

bază de polimeri sintetici, respectiv carboximetilceluloză și polivinilpirolidonă, condiționat sub formă de filme sau folii spongioase. Înainte de aplicarea pe rană, biomaterialul solid se infuzează în soluții de acid ascorbic, vitamina E sau colagen tip I pentru îmbunătățirea procesului de regenerare.

Problema tehnică pe care o rezolvă prezenta propunere de invenție constă în realizarea unui nou biomaterial condiționat sub formă de compozit polimeric spongios steril, biodegradabil și biocompatibil, având în compoziția sa componente biopolimerice, cum sunt: proteina gelatină și polizaharidul natural alginat, cu efect de stimulare a procesului de regenerare a țesutului dermic, precum și polimeri sintetici biocompatibili, alcoolul polivinilic și metilceluloza, care asigură și rezistența mecanică a produsului. Componentele sunt asociate într-o manieră care oferă compoziției condiționate sub formă de structură alveolară, proprietăți îmbunătățite pentru a asigura un suport adecvat infiltrării și aderenței fibroblastelor și keratinocitelor, cu rol în regenerarea țesutului dermic. În plus, condiționarea sub formă de suport spongios tridimensional conferă celulelor capacitatea de a iniția depozitarea de țesut conjunctiv nou. Adăugarea în compoziția biomaterialului a biomoleculelor de fibronectină sau heparină, care prezintă proprietăți de stimulare a aderenței celulare, accelerează procesul de vindecare a rănilor pielii.

Biomaterialul, conform propunerii de invenție, este un compozit polimeric cu structură poroasă, steril, biodegradabil și biocompatibil și este constituit din 60...80% gelatină din piele porcine, cu greutatea moleculară medie cuprinsă între 90...180 kDa și o substanță uscată de 0,6...1,0%, 10...30% alginat de sodiu cu vâscozitatea de 200.000-400.000 cP, 4...22% polimer sintetic, ales între alcool polivinilic cu greutatea moleculară medie de 72 kDa, metilceluloză cu vâscozitatea de 1500...4000 cP și 0,01...0,1% biomolecule, alese între fibronectină și heparină, părțile fiind exprimate în greutate.

Procedeele de obținere al produsului, conform invenției, constă din aceea că se realizează un gel compozit prin prepararea inițială a unei compoziții biopolimerice, urmată de asocierea cu polimeri sintetici, amestecarea acestor compoziții și adăugarea de biomolecule, reticularea și spălarea, urmate de liofilizarea, ambalarea și sterilizarea biomaterialului poros obținut.

Etapele procedeele de obținere sunt următoarele: a) prepararea soluției de alginat de sodiu de concentrație 3% prin dizolvarea unei pulberi de alginat de sodiu cu vâscozitatea de 200.000-400.000 cP în apă ultrapură, la temperatura de maxim 40 °C, timp de 12...16 ore, cu agitare continuă; b) prepararea soluției de gelatină 4% prin dizolvarea unei pulberi de gelatină farmaceutică, provenită

din piele de porc, cu greutatea moleculară medie de 90...180 kDa, în apă ultrapură, sub agitare continuă pe o plită magnetică, la temperatura de 50...60 °C, timp de 20...30 de minute; c) prepararea soluției de alcool polivinilic de concentrație 10% se realizează prin dizolvarea acestuia în apă ultrapură folosind o baie de apă prevăzută cu agitare, la temperatura de 45...60 °C. Timpul de dizolvare este de minim 12 ore, după care se realizează un proces de sonicare timp de 10...15 minute; d) obținerea compoziției polimerice se face după răcirea soluțiilor de mai sus la temperatura de maxim 40 °C, după care se amestecă, cu agitare puternică, soluțiile de gelatină:alginat:alcool polivinilic în rapoarte de 1:0,2...0,5:0,1...0,4 g/g/g, peste care se adaugă o pulbere de metilceluloză. Adăugarea metilcelulozei este urmată de agitare pe o plită magnetică la 300...500 rpm, la temperatura de maxim 40 °C și sonicare la această temperatură timp de 15...25 minute; e) răcirea amestecului polimeric la temperatura camerei și adăugarea în această compoziție a fibronectinei sau a heparinei de concentrație 0,01-0,1%; f) repartizarea compoziției polimerice omogene în plăci Petri și incubarea acestora la 4 °C, timp de 30 de minute, obținând astfel geluri omogene, cu grosimea constantă de 5...10 mm; g) reticularea gelurilor se face prin imersarea acestora într-o soluție apoasă de clorură de calciu 2%, timp de 2...3 ore, la temperatura camerei, după care se spală prin imersare în apă ultrapură, timp de minim 5 minute, procedura de spălare se repetă de 3...5 ori; h) liofilizarea gelurilor reticulate timp de 48...72 ore; i) tăierea la dimensiunile dorite și ambalarea produsului poros prin introducerea în pungi de polietilenă care se sigilează și, apoi, se sterilizează prin iradiere cu radiații UV, timp de 8...12 ore.

Biomaterialul compozit poros, obținut în conformitate cu prezenta invenție, are următoarele avantaje:

- prezintă o eficiență mare în tratarea leziunilor pielii având în compoziția sa biopolimeri specifici țesutului dermic (gelatină, fibronectină), precum și polizaharide naturale (alginat de sodiu, heparină), care prezintă un efect de stimulare a procesului de regenerare a țesutului dermic;
- compozitul reprezintă o matrice suport tridimensională pentru înglobarea celulelor specifice țesutului dermic (fibroblaste, keratinocite), în vederea prelungirii timpului de viabilitate și proliferare a acestora și de inițiere a procesului de vindecare tisulară;
- este biocompatibil, biodegradabil, biodisponibil și necitotoxic;
- produsul nu generează inflamație, acționează ca o barieră împotriva infecțiilor și asigură absorbția optimă a fluidelor (exudat) la nivelul țesutului lezat;

- biomaterialul compozit pătrunde în interiorul leziunii, unde polimerii naturali din compoziția sa se dizolvă la locul aplicării, printr-un proces de biodegradare controlată și au un efect sinergic asupra regenerării țesutului dermic 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 soluțiilor polimerice

Într-un vas de sticlă cu volumul de 500 mL, se prepară 125 mL soluție de alginat de sodiu de concentrație 3% prin dizolvarea a 3,75 g pulbere de alginat de sodiu cu vâscozitatea de 300.000 cP, în apă ultrapură, prin agitare continuă pe o plită magnetică, la temperatura de 40 °C, timp de 16 ore. Separat, se prepară 350 mL soluție de gelatină prin dizolvarea a 14 g pulbere de gelatină farmaceutică din piele porcină, cu greutatea moleculară medie de 180 kDa, în apă ultrapură. Dizolvarea gelatinei se realizează la temperatura de 50 °C, timp de 25 de minute, sub agitare continuă pe o plită magnetică.

Într-un alt vas de sticlă, se prepară 25 mL soluție de alcool polivinilic prin dizolvarea a 2,5 g pulbere de polimer, în apă ultrapură, cu ajutorul unei băi de apă prevăzută cu agitare, la turația de 120 rpm, la 60 °C, timp de 14 ore, după care se face o sonicare a soluției polimerice, timp de 10 minute, în vederea eliminării bulelor de aer formate în timpul agitării.

Etapa II. Obținerea gelului polimeric

Se răcește soluția de alcool polivinilic 10% la temperatura de 40 °C și se adaugă peste amestecul soluțiilor de gelatină 4% și alginat de sodiu 3%. Amestecarea se realizează prin agitare continuă pe o plită magnetică, la turația de 500 rpm. După 2 ore de agitare, la temperatura camerei, se introduc peste amestecul obținut 2 mL soluție de fibronectină din plasmă bovină de concentrație 0,01% și se omogenizează. Se formează, astfel, amestecul biopolimeric care se repartizează în plăci Petri și se incubează la 4 °C, timp de 30 de minute, pentru a se solidifica. Se obține un gel omogen cu grosimea de 10 mm, care se reticulează prin imersare într-o soluție de clorură de calciu 2%, timp de 3 ore. Gelul astfel reticulat se spală în apă ultrapură, pentru a elimina excesul de clorură de calciu, prin imersare de cel puțin 3 ori, timp de 5 minute.

Etapa III. Uscarea și ambalarea

Uscarea gelului reticulat se face prin liofilizare la temperatura de înghețare de $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ și temperatura de uscare $+35\text{ }^{\circ}\text{C}$, timp de 48 ore. Se obține un biomaterial poros, care se taie la dimensiunile dorite și se ambalează etanș în pungi de polietilenă. Se sterilizează, apoi, compozitul poros prin expunere la radiații UV, timp de 12 ore.

Exemplul 2

Etapele de obținere a soluțiilor polimerice și a amestecului acestora sunt similare cu cele prevăzute în exemplul 1, cu deosebirea că amestecul polimeric este constituit din soluții de gelatină 4%, alginat de sodiu 15% și pulbere de metilceluloză cu vâscozitatea de 1500 cP, în raport de combinare de 1:0,26:0,35 (g/g/g).

Adăugarea pulberii de metilceluloză cu vâscozitatea de 1500 cP peste amestecul de gelatină și alginat de sodiu se realizează la temperatura de $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, prin agitare continuă la 500 rpm, după care amestecul polimeric obținut se supune sonicării timp de 15 minute, pentru îndepărtarea bulelor de aer formate. După răcire la temperatura camerei, peste amestecul polimeric, se adaugă 3 mL heparină 0.01% și se omogenizează ușor, timp de 30 de minute.

Etapele ulterioare de gelifiere, liofilizare și ambalare corespund celor descrise în cadrul exemplului 1.

Exemplul 3

Se procedează conform exemplului 2, cu excepția faptului că, în loc de metilceluloză cu vâscozitatea de 1500 cP, se folosește metilceluloză cu vâscozitatea de 4000 cP. De asemenea, după răcirea amestecului polimeric la temperatura camerei, se adaugă în această compoziție 1 mL fibronectină 0.01% și se omogenizează ușor amestecul. Obținerea gelului polimeric, uscarea și ambalarea produsului sunt similare cu cele descrise anterior.

Biomaterialul compozit poros, obținut conform exemplurilor de mai sus, a fost caracterizat fizico-chimic, biochimic și biologic.

Caracterizarea fizico-chimică a constat în: determinarea porozității, densității și a gradului de gonflare, iar caracterizarea biochimică în determinarea gradului de biodegradare, utilizând metode gravimetrice. Rezultatele analizelor fizico-chimice și biochimice, prezentate în tabelul 1, au arătat că porozitatea probelor are valori moderate, variind între minim 54,80% pentru varianta 1 și maxim

62,50% pentru varianta 2, în funcție de compoziția acestora. Valorile de densitate a variantelor de materiale obținute au variat invers proporțional cu porozitatea, varianta 1 având o densitate mai mare (0,091 g/cm³), comparativ cu varianta 2 (0,076 g/cm³). Varianta 3 a prezentat valori ale densității și porozității situate între valorile primelor două variante. S-a observat că o probă martor a prezentat o porozitate ridicată (87,22%), iar prin combinarea cu polimeri sintetici se poate regla gradul de porozitate al biomaterialului poros.

Datele privind gradul de gonflare au arătat că toate variantele prezintă valori ridicate, situate între 610,34% pentru varianta 1 și 727,68% pentru varianta 3. Polizaharidele au proprietatea de gonflare, astfel că variantele obținute în exemplele 2 și 3, care conțin metilceluloză, posedă o capacitate ridicată de absorbție a apei, foarte utilă în cazul exudatului prezent în leziuni cronice ale pielii.

Tabelul 1-Characteristicile fizico-chimice și biochimice ale variantelor de biomaterial obținute

Probe de biomateriale	Porozitate (%)	Densitate (g/cm ³)	Grad de gonflare (%)	Grad de biodegradare la 48 h (%)
Exemplul 1 (Gel:Alg:APV:Fn)	54,80	0,091	610,34	82,34
Exemplul 2 (Gel:Alg:CM1500:Hep)	62,50	0,076	727,68	62,86
Exemplul 3 (Gel:Alg:CM4000:Fn)	57,20	0,087	656,06	94,55
Martor (Gel:Alg)	87,22	0,056	161,16	90,37

Testul de simulare a biodegradării variantelor de biomaterial, s-a realizat într-un mediu fiziologic similar celui inflammat, în condiții de rănire a pielii (pH 7,4, 37 °C, în prezența colagenazei). Probele testate prezintă o biodegradare controlată în timp, care a atins valori de 62-94%, după 48 h de incubare. Astfel, amestecarea gelatinei și alginatului de sodiu cu polimeri sintetici și polizaharide, și condiționarea ca structuri poroase, nu blochează acțiunea colagenazei, iar degradarea controlată le asigură un rol de pansament temporar, care permite formarea de țesut nou în zona afectată, pe măsură ce suportul este biodegradat.

Caracterizarea biologică a constat în evaluarea biocompatibilității compozitelor polimerice, a aderenței celulelor la structura alveolară a acestora și testarea *in vitro* a efectului de vindecare tisulară.

Biocompatibilitatea *in vitro* a fost evaluată pe 2 linii celulare stabilizate: fibroblaste de șoarece NCTC clona L929 și keratinocite umane HaCaT, folosind metoda contactului direct, în acord cu standardul SR EN ISO 10993-5:2009. Pentru aceasta, s-a determinat viabilitatea celulară prin metoda cantitativă MTT (bromură de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoliu), după cultivarea celulelor în prezența variantelor de biomateriale obținute, timp de 48 de ore. Testul MTT evaluează activitatea metabolică celulară prin capacitatea de reducere a colorantului tetrazolic de către dehidrogenazele mitocondriale. Densitatea optică a soluției de formazan formată este măsurată spectrofotometric, iar valorile obținute sunt direct proporționale cu numărul celulelor vii prezente la finalul incubării. Rezultatele viabilității celulare, prezentate în tabelul 2, au evidențiat efectul benefic al variantelor de biomateriale compozite testate asupra viabilității și proliferării celulelor specifice țesutului dermic (fibroblaste și keratinocite), valorile situându-se peste 80% (efect necitotoxic), comparativ cu martorul de cultură.

Tabelul 2-Viabilitatea celulelor NCTC și HaCaT tratate cu variantele de materiale compozite timp de 48 de ore

Probe de biomaterial	Viabilitate celulară într-o cultură de fibroblaste NCTC (%)	Viabilitate celulară într-o cultură de keratinocite HaCaT (%)
Martor de cultură	100	100
Exemplul 1 (Gel:Alg:APV:Fn)	94,71	90,84
Exemplul 2 (Gel:Alg:CM1500:Hep)	89,92	90,29
Exemplul 3 (Gel:Alg:CM4000:Fn)	88,22	86,84
Martor (Gel-Alg)	89,92	83,90

Evaluarea aderării celulare la structura poroasă a biomaterialului a fost efectuată prin microscopie de fluorescență utilizând testul LIVE/DEAD, care se bazează pe detecția simultană a celulelor vii (emit fluorescență de culoare verde) și a celulelor moarte (emit fluorescență de culoare roșie). Pentru realizarea acestui experiment, au fost utilizate două linii celulare caracteristice tegumentului, respectiv fibroblastele și keratinocitele, care au fost însămânțate pe suprafața biomaterialului cu structură poroasă la o densitate de 5×10^4 celule/probă și cultivate pentru 48 de ore. La finalul perioadei de cultivare, biomaterialul a fost tratat cu cei doi reactivi specifici testului (calceină și bromură de etidiu) și vizualizate la un microscop de fluorescență. Rezultatele obținute

demonstrează că, atât fibroblastele cât și keratinocitele au pătruns și au aderat ferm în interiorul structurilor poroase ale biomaterialului (Fig. 1). Densitatea celulară a fost mai mare în cazul variantelor de compozite obținute conform exemplilor 1, 2 și 3 (Fig. 1b, 1c, 1d), comparativ cu proba martor (Fig 1a). Celulele aderate prezintă un aspect normal, caracteristic, iar raportul dintre celulele vii și celulele moarte confirmă rezultatele pozitive obținute în urma testelor de biocompatibilitate.

Testarea *in vitro* a efectului de vindecare tisulară s-a efectuat cu ajutorul unui model experimental *in vitro* în care s-au realizat leziuni cutanate (metoda scratch) și s-a evaluat capacitatea variantelor de biomaterial de a accelera migrarea și proliferarea celulelor pentru acoperirea zonei lezate. Această evaluare s-a efectuat pe o linie de keratinocite umane HaCaT, însămânțate la o densitate celulară de 2×10^5 celule/mL. După 24 ore de cultivare, când celulele au ajuns la confluență, s-a realizat o zgâriere a monostratului celular (leziune cutanată *in vitro*) și s-au adăugat probele de biomaterial incubate, în prealabil, în mediul de cultură, timp de 24 de ore (metoda extractului). Celulele au fost fotografiate imediat după zgâriere (timp=0 ore) (Fig. 2 b, c, d) și după 24 ore de tratament (Fig. 2 f, g, h). O cultură de celule zgâriate (Fig. 2 a) și netratate (Fig. 2 e) a servit drept cultură control. Rata de migrare și de refacere a monostratului celular s-a determinat prin prelucrarea analitică a imaginilor cu ajutorul programului ImageJ.

Rezultatele obținute au aratat că toate variantele de biomaterial testate, obținute conform exemplilor 1, 2 și 3 au fost mai eficiente în refacerea monostratului celular zgâriat (Fig. 2 f, g, h), în comparație cu proba control (leziune netratată) (Fig. 2 e), după 24 de ore de tratament. S-a observat că, în prezența variantelor de biomaterial, celulele au avut o capacitate mai mare de a migra și prolifera în zona lezată, prezentând un procent de închidere a acesteia cu 17-23% mai mult decât în cazul probei control.

Experimentele realizate demonstrează ca biomaterialul obținut conform propunerii de invenție, se prezintă sub formă de compozit polimeric cu structură poroasă, biodegradabil, biocompatibil și prezintă proprietăți bioactive și de stimulare a regenerării țesuturilor dermice lezate. Biomaterialul poros se aplică direct pe suprafața țesuturilor dermice lezate, unde are loc o biodegradare controlată a componentelor sale, care asigură celulelor din interiorul biomaterialului un suport necesar formării unui țesut conjunctiv nou și, respectiv, reepitelizarea țesuturilor.

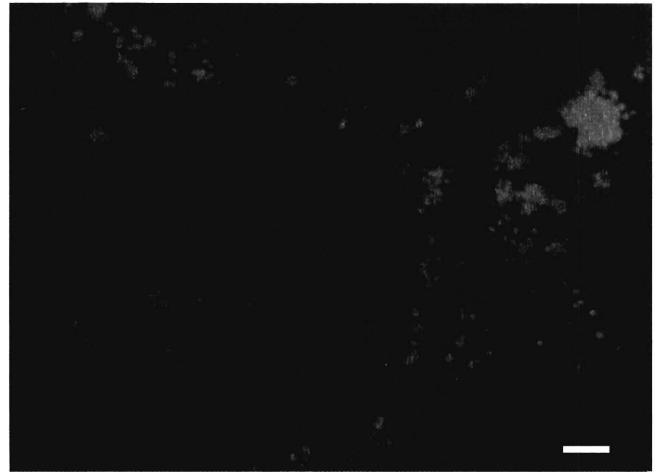
REVENDICĂRI

1. Biomaterialul compozit poros, **caracterizat prin aceea că**, este constituit din 60...80% gelatină din piele porcină, cu greutatea moleculară medie cuprinsă între 90...180 kDa și o substanță uscată de 0,6...1,0%, 10...30% alginat de sodiu cu vâscozitatea de 200.000-400.000 cP, 4...22% polimer sintetic ales între alcool polivinilic cu greutatea moleculară medie de 72 kDa și metilceluloză cu vâscozitatea de 1500...4000 cP și 0,01...0,1% biomolecule, alese între fibronectină și heparină, părțile fiind exprimate în greutate.

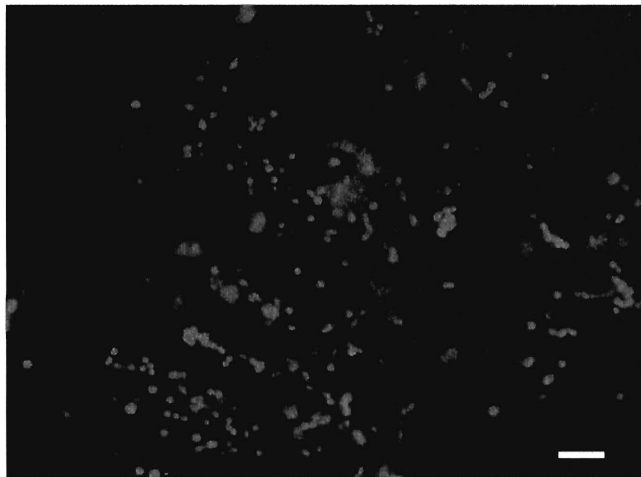
2. Procedul de obținere al produsului, **caracterizat prin aceea că**, prezintă următoarele etape: a) prepararea soluției de alginat de sodiu de concentrație 3% prin dizolvarea unei pulberi de alginat de sodiu cu vâscozitatea de 200.000-400.000 cP în apă ultrapură, la temperatura de maxim 40 °C, timp de 12...16 ore, cu agitare continuă; b) prepararea soluției de gelatină 4% prin dizolvarea unei pulberi de gelatină farmaceutică, provenită din piele de porc, cu greutatea moleculară medie de 90...180 kDa, în apă ultrapură, sub agitare continuă pe o plită magnetică, la temperatura de 50...60 °C timp de 20...30 de minute; c) prepararea soluției de alcool polivinilic de concentrație 10% se realizează prin dizolvarea acestuia în apă ultrapură, folosind o baie de apă prevăzută cu agitare, la temperatura de 45...60 °C. Timpul de dizolvare este de minim 12 ore, după care se face sonicarea timp de 10...15 minute; d) obținerea compoziției polimerice se face după răcirea soluțiilor de mai sus, la temperatura de maxim 40 °C, după care se amestecă cu agitare puternică soluțiile de gelatină, alginat de sodiu, alcool polivinilic în raport de 1:0,2...0,5:0,1...0,4 (g/g/g), peste care se adaugă o pulbere de metilceluloză. Adăugarea metilcelulozei este urmată de amestecare la 300...500 rpm, la temperatura de maxim 40 °C și sonicare la această temperatură, timp de 15...25 minute; e) răcirea amestecului polimeric la temperatura camerei și adăugarea în această compoziție a fibronectinei sau heparinei de concentrație 0,01...0,1%; f) repartizarea compoziției polimerice omogene în plăci Petri și incubarea acestora la 4 °C, timp de 30 de minute. Se obțin gelurile omogene, cu grosimea constantă de 5...10 mm; g) reticularea gelurilor se face prin imersarea acestora într-o soluție apoasă de clorură de calciu 2%, timp de 2...3 ore, la temperatura camerei, după care se spală prin imersare în apă ultrapură, timp de minim 5 minute, procedura de spălare se repetă de 3...5 ori; h) liofilizarea gelurilor reticulate timp de 48...72 ore; i) tăierea la dimensiunile dorite și ambalarea produsului poros prin introducerea în pungi de polietilenă, care se sigilează și, apoi, se sterilizează prin iradiere cu radiații UV, timp de 8...12 ore.



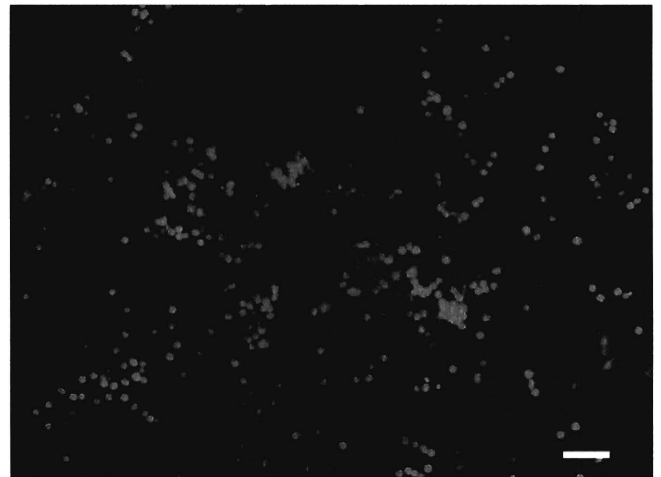
(a)



(b)



(c)



(d)

Figura 1

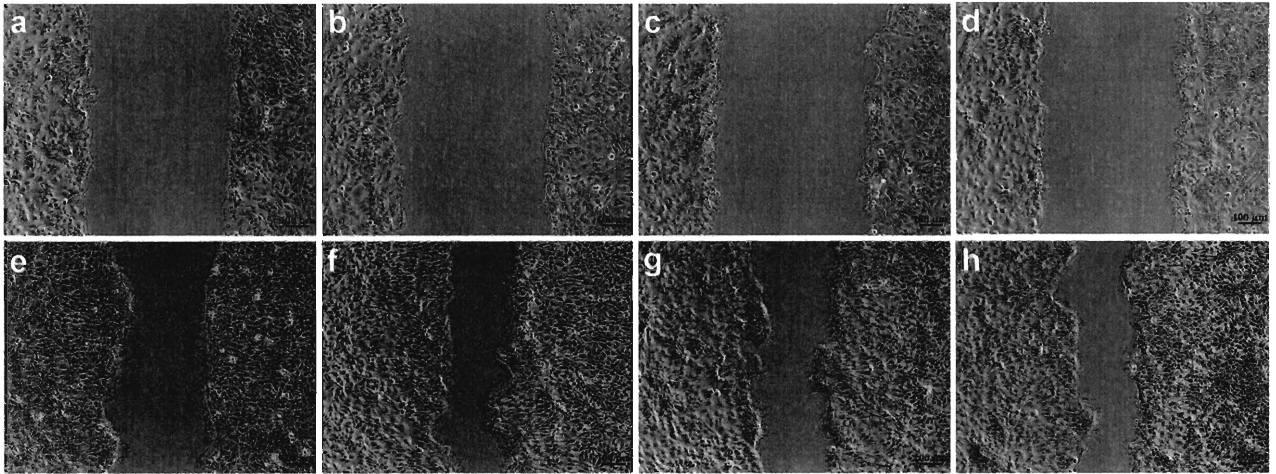


Figura 2