

(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00283

(22) Data de depozit: 24/05/2022

(41) Data publicării cererii:
29/11/2023 BOPI nr. 11/2023

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

(72) Inventatori:
• ENACHE TEODOR ADRIAN, SAT NANOV,
COMUNA NANOV, TR, RO;

• OPREA BRATU DANIELA,
STR.SURĂNEȘI, NR.4, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO;
• BUNEA MIHAELA CRISTINA,
STR.RÂMNICU VÂLCEA, NR.26, BL.15B,
SC.1, ET.8, AP.52, BUCUREȘTI, B, RO;
• BERGOI MIHAELA, STR.NOVACI,
NR.12, BL.P61, SC.1, ET.2, AP.7,
SECTOR 5, BUCUREȘTI, B, RO

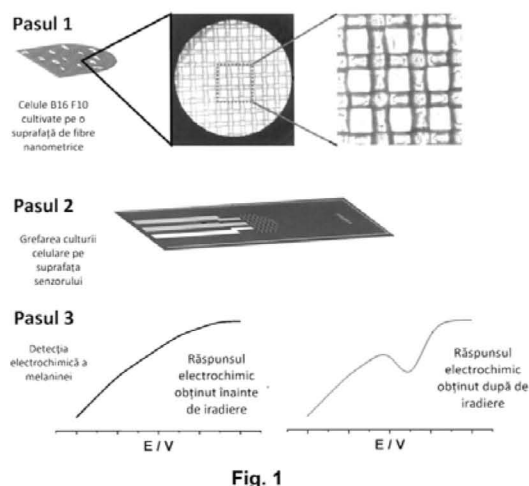
(54) PROCEDEU DE DETECȚIE A MELANINEI PRODUSĂ DE CULTURILE CELULARE B16

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de detecție a melaninei produsă de culturile celulare B16. Procedeu conform invenției se realizează în trei pași prin însămânțarea și cultivarea celulelor pe suprafața unei membrane poroase adezive, grefarea ansamblului de fibre și celule pe suprafața unui senzor electrochimic planar și măsurarea semnalului electrochimic al melaninei folosind tehnica de voltametrie în puls diferențial.

Revendicări: 2

Figuri: 3



DESCRIEREA BREVETULUI DE INVENȚIE

Titlu:

Procedeu de detecție a melaninei produsă de culturile celulare B16

Elaborat de:

Teodor Adrian Enache, Daniela Bratu Oprea, Mihaela Cristina Bunea, Mihaela Beregoi

Prezenta invenție descrie un procedeu de detecție a melaninei produsă de culturile celulare B16. Conform invenției, procedeul presupune într-o prima etapă însămânțarea și cultivarea celulelor pe suprafața unei membrane poroase adezivă. A doua etapă presupune grefarea ansamblului de fibre și celule pe suprafața unui senzor electrochimic planar format din trei electrozi, iar în cea de a treia etapă are loc măsurarea semnalului electrochimic al melaninei produsă de celulele B16 folosind tehnica de voltametrie în puls diferențial [1].

Studiul proceselor și al mecanismelor prin care diferite țesuturi sau organe răspund la diverși stimuli se bazează pe rezultatele testelor *in vitro* pe celule care ar trebui să permită corelarea cu aspectele esențiale ale fiziologiei *in vivo* [2]. În acest sens, modelele *in vitro*, ce presupun într-o primă etapă cultivarea celulelor pe suprafețe, sunt optimizate pentru un randament ridicat al predicției necesare pentru corelații precise cu mecanismele *in vivo*. Interacțiunea celulelor cu biomaterialele este dictată de biocompatibilitatea și biofuncționalitatea acestora și este puternic influențată de proprietățile suprafeței. În plus, pentru studii biologice și de diagnosticare este important să se controleze aderența celulelor la suprafețe deoarece proprietățile suprafeței influențează aderența și proliferarea celulelor. Fabricarea unei suprafețe biocompatibile, care asigură o proliferare optimă a celulelor, și totodată care să permită grefarea culturii celulare pentru analiză, se poate face prin tehnica de



electrofilare care permite obținerea de fibre polimerice biocompatibile cu diametre nanometrice.

Celulele B16 sunt linii celulare de melanom care produc melanină și prezintă comportamente metastatice. Acestea sunt utilizate pe scară largă pentru a studia melanogeneza și depigmentarea, metastazele tumorale și pentru măsurarea citotoxicității diferitelor substanțe în modelele de piele [3]. Astfel, măsurarea cu exactitate a cantității de melanină produsă de melanocite este esențială pentru a studia diferite afecțiuni ale pielii și pentru a evalua eficacitatea diverselor terapii.

În general, pentru măsurarea și cuantificarea melaninei sunt utilizate diverse metode analitice, cum ar fi spectrofotometria de fluorescență, spectrometria de rezonanță paramagnetică electronică, cromatografie lichidă de înaltă performanță și spectroscopie de absorbție [4]. Dintre acestea, spectroscopia de absorbție este cea mai utilizată metodă, deoarece procedura experimentală este simplă și nu necesită echipamente voluminoase sau operatori calificați. Cu toate acestea, deoarece înainte de măsurare celulele sunt dizolvate la temperatură ridicată într-un solvent cu pH alcalin, această metodă este distructivă. Mai mult, similar celorlalte metode menționate, poate fi utilizată numai pentru măsurători finale și nu permite măsurători în timp real [5].

Tehnicile electrochimice sunt metode analitice foarte sensibile care pot detecta unul sau mai mulți analiți dintr-o probă în timpul unei singure măsurători. În general, măsurătorile electrochimice necesită un transductor (sau electrodul de lucru), un electrod auxiliar și un electrod de referință [6]. Pentru minimizarea sistemului electrochimic acești electrozi pot fi fabricați pe același suport rezultând un sistem planar [7]. Metodele electrochimice utilizate în mod obișnuit includ amperometria, potențiomertia, conductometria și voltametria [8,9].

Soluția descrisă în prezenta cerere reprezintă un procedeu de detecție a melaninei produsă de culturile celulare B16 care se realizează în trei pași prin însămânțarea și cultivarea



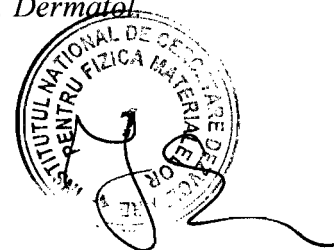
celulelor pe o suprafață nanostructurată de fibre electrofilate deasupra deasupra unei membrane poroase adezivă, grefarea ansamblului de fibre și celule pe suprafața unui senzor electrochimic planar și măsurarea semnalului electrochimic al melaninei folosind tehnica de voltametrie în puls diferențial [10]. Avantajul acestei soluții este că suprafața de fibre electrofilate asigură creșterea viabilă a celulelor, iar grefarea pe suprafața senzorului înainte de măsurare previne degradarea atât a culturii celulare cât și a senzorului, îmbunătățind astfel modelul experimental. De asemenea, procedeul permite o măsurarea în timp real a melaninei produse în urma a diverși stimuli.

În cele ce urmează se prezintă un exemplu de realizare a invenției în trei pași conform Figurii 1. Astfel, pornind de la o suprafața de fibre nanometrice electrofilate deasupra unei membrane poroasă adezivă, primul pas este reprezentat de însămânțarea cu celulele B16F10 la o densitate de 10000 celule / cm² și cultivate timp de 24 h în incubator în condiții de umiditate, 37 °C și 5% CO₂. În cel de-al doilea pas, ansamblul conținând cultura celulară este grefat pe suprafața unui senzor planar alcătuit dintr-un electrod de aur, un electrod auxiliar de platină și un electrod de referință din argint.

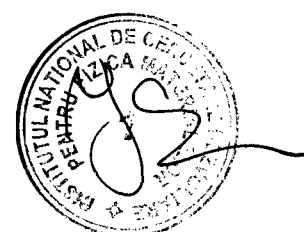
În ultimul pas melanina produsă de celulele B16F10 este detectată electrochimic folosind tehnica de voltametrie în puls diferențial prin baleierea potențialului de la 0 mV până la – 800 mV. Producția de melanină are loc ca proces metabolic normal al celulelor însă poate fi accelerată prin diverși stimuli, cum ar fi iradierea cu lumină ultravioletă.

Bibliografie:

1. Grabacka, M.; Wiczorek, J.; Michalczyk-Wetula, D.; Malinowski, M.; Wolan, N.; Wojcik, K.; Plonka, P.M. Peroxisome proliferator-activated receptor α (PPAR α) contributes to control of melanogenesis in B16 F10 melanoma cells. *Arch. Dermatol Res.* **2017**, *309*, doi:10.1007/s00403-016-1711-2.



2. Debnath, M.; Prasad, G.B.K.S.; Bisen, P.S. Omics Technology. *Mol. Diagnostics Promises Possibilities* **2010**, 11–31, doi:10.1007/978-90-481-3261-4_2.
3. Chung, S.; Lim, G.J.; Lee, J.Y. Quantitative analysis of melanin content in a three-dimensional melanoma cell culture. *Sci. Rep.* **2019**, 9, 1–9, doi:10.1038/s41598-018-37055-y.
4. Fernandes, B.; Matamá, T.; Guimarães, D.; Gomes, A.; Cavaco-Paulo, A. Fluorescent quantification of melanin. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2016**, 29, 707–712, doi:10.1111/PCMR.12535.
5. Godechal, Q.; Ghanem, G.E.; Cook, M.G.; Gallez, B. Electron Paramagnetic Resonance Spectrometry and Imaging in Melanomas: Comparison between Pigmented and Nonpigmented Human Malignant Melanomas., doi:10.2310/7290.2012.00037.
6. Thévenot, D.R.; Toth, K.; Durst, R.A.; Wilson, G.S. Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification. *Biosens. Bioelectron.* **2001**, 16, 121–131, doi:10.1016/S0956-5663(01)00115-4.
7. Faustino, L.C.; Cunha, J.P.C.; Andrade, A.P.S.; Bezerra, E.F.S.; Luz, R.A.S.; Gerônimo, E.T.S. Miniaturized Electrochemical (Bio)sensing Devices Going Wearable. *Adv. Bioelectrochemistry Vol. 3* **2022**, 51–90, doi:10.1007/978-3-030-97921-8_3.
8. A Brett, C.M.; Maria Oliveira Brett, A.; New York Tokyo, O. ELECTROCHEMISTRY Principles, Methods, and Applications.
9. Enache, T.A.; Amine, A.; Brett, C.M.A.; Oliveira-Brett, A.M. Virgin olive oil ortho-phenols - Electroanalytical quantification. *Talanta* **2013**, 105, 179–186, doi:10.1016/J.TALANTA.2012.11.055.
10. Siegrist, W.; Eberle, A.N. In situ melanin assay for MSH using mouse B16 melanoma cells in culture. *Anal. Biochem.* **1986**, 159, 191–197, doi:10.1016/0003-2697(86)90327-1.

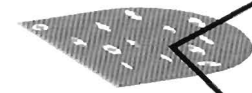


Revendicări

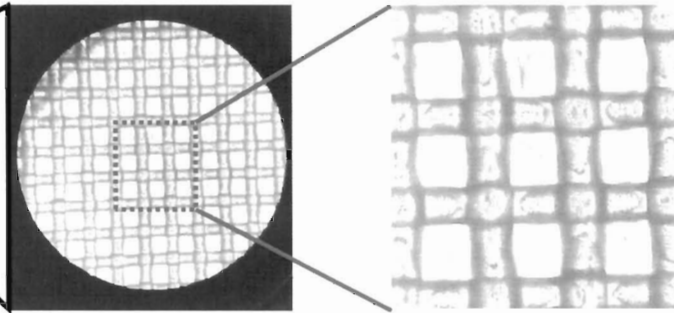
1. Procedeu de detecție a melaninei produsă de culturile celulare B16 caracterizat prin aceea că se realizează în trei pași prin însămânțarea și cultivarea celulelor pe suprafața unei membrane poroase adezive, grefarea ansamblului de fibre și celule pe suprafața unui senzor electrochimic planar și măsurarea semnalului electrochimic al melaninei folosind tehnica de voltametrie în puls diferențial.
2. Procedeul de detecție prezentat în revendicarea 1 caracterizat prin aceea că tehnică de detecție poate fi o metodă voltametrică, amperometrică sau spectrometrie electrochimică de impedanță.



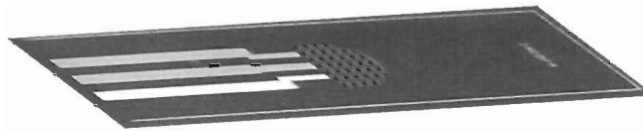
FIGURI EXPLICATIVE PENTRU INVENȚIE:

Pasul 1

Celule B16 F10
cultivate pe o
suprafață de fibre
nanometrice

**Pasul 2**

Grefarea culturii
celulare pe
suprafața
senzorului

**Pasul 3**

Detecția
electrochimică a
melaninei

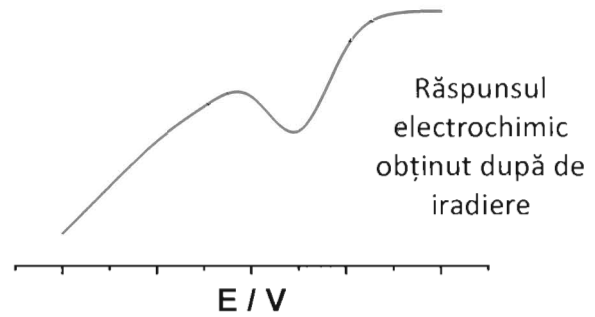
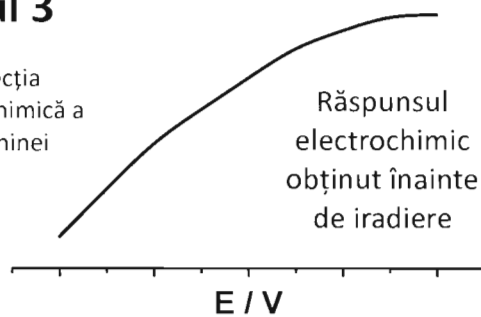


Figura 1. Prezentarea schematică a procedurii de detecție a melaninei produsă de celulele B16F10.

