



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2022 00779

(22) Data de depozit: 28/11/2022

(41) Data publicării cererii:
30/05/2024 BOPI nr. 5/2024

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN
BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI
NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:
• GIOL ELENA- DIANA, VALEA CETĂȚII,
NR.25, BL.A32B, SC.A, AP.28, BRAȘOV,
BV, RO;

• MILITARU DARIA, BD.DECEBAL, NR.28,
BL.S1, SC.2, ET.7, AP.48, SECTOR 3,
BUCUREȘTI, B, RO;
• STANCU IZABELA- CRISTINA,
CALEA GRIVIȚEI, NR.232, BL.2, SC.F,
AP.167, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
• IOVU HORIA, STR.MARIA TĂNASE, NR.3,
BL.13, SC.B, ET.4, AP.49, SECTOR 4,
BUCUREȘTI, B, RO

(54) **PROCEDEE DE OBTINERE A UNOR HIDROGELURI
BICOMPONENTE FOTO-RETICULATE BAZATE PE
GELATINĂ METACRILAMIDATĂ ȘI 2-METACRILLOILOXI-ETIL
FOSFORILCOLINĂ PENTRU APLICAȚII BIOMEDICALE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor materiale hibride non-citotoxice utilizate ca hidrogeluri foto-reticulate pentru proliferarea celulară și regenerare/modelare tisulară în aplicații biomedicale și sub formă de coating pentru plasele folosite în tratarea herniei abdominale. Procedeu, conform invenției, de obținere a hidrogelurilor bicomponente foto-reticulare constă în etapele: amestecarea unei soluții apoase precursor de gelatină metacrilamică (GelMA, grad de substituție 6 și 99%) de concentrație 10% cu 2-metacrililoixi-etil fosforilcolină (MPC) în raport masic de 10 : 1 până la 1 : 2, în prezența unui agent de foto-reticulare uzual și un tratament cu raze ultra-violete (UV) cu lungimea de undă de 365nm timp de 60 min, rezultând hidrogeluri GelMA-MPC cu stabilitate în condiții fiziologice și grade de gonflare de până la 1000%. Procedeu, conform

invenției, de obținere de coating, constă în etapele: sinteză de hidrogeluri bicomponente prin amestecarea unei soluții apoase precursor de GelMA (10%) cu MPC, în prezența unui agent de foto-reticulare uzual, imersarea plaselor chirurgicale de polipropilenă (PP) în amestec timp de 10 min la 40 grade, tratament UV la lungime de undă 365 nm timp de 20 min per față plasă rezultând plase hibride hidrofile de PP acoperite cu GelMA-MPC bio- și hemo-compatibile, cu rezistență mecanică ridicată, pentru tratarea herniilor abdominale, facilitând bio-integrarea implantului în corp prin promovarea atașării și proliferării de celule și diminuarea absorbției de proteine pe coating.

Revendicări: 3
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).



PROCEDEE DE OBTINERE A UNOR HIDROGELURI BICOMPONENTE FOTO-RETICULATE BAZATE PE GELATINĂ METACRILAMIDATĂ ȘI 2-METACRILILOXI-ETIL FOSFORILCOLINĂ PENTRU APLICAȚII BIOMEDICALE

Elena Diana GIOL, Daria MILITARU, Izabela-Cristina STANCU, Horia IOVU

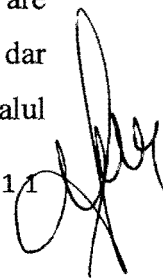
1. Domeniul tehnic în care poate fi folosită invenția

Prezenta invenție se referă la dezvoltarea unor hidrogeluri bicomponente pe bază de gelatină metacrilamidată (GelMA) și 2-metacrililoxi-etil fosforilcolină (MPC), sub formă de hidrogeluri foto-reticulate sau coating, ce pot fi folosite în aplicații biomedicale, sub formă de suport pentru proliferarea celulară și regenerare/modulare tisulară, și, în particular, sub formă de coating pentru plasele folosite în tratarea herniei abdominale. Hidrogelurile bicomponente foto-reticulate au prezentat o stabilitate reglabilă în condiții fiziologice normale (PBS, pH 7.4, 37 grade), cu grade de gonflare între 300 și 1000 %, dependente de gradul de substituție al gelatinei și raportul GelMA:MPC. Mai mult, suprafața unor plase de hernie de polipropilenă a fost modificată cu hidrogeluri bicomponente de GelMA-MPC foto-reticulate, pentru a obține materiale hibride non-citotoxice, care stimulează atașarea și proliferarea de celule fibroblaste, diminuează adsorpția de proteine și pot fi folosite în tratarea herniilor abdominale, facilitând integrarea implantului în corpul uman.

2. Descrierea stadiului actual

Dezvoltarea de suporturi capabile să permită atașarea și proliferarea celulară, în vederea regenerării sau modelării tisulare, este la mare căutare în domeniul biomaterialelor. Materialele de origine biologică precum gelatina, chitosanul, alginatul sunt considerate materiale ideale pentru astfel de suporturi.

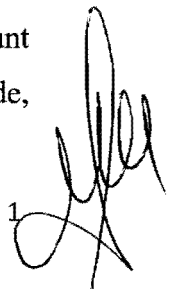
Gelatina este un compus natural, provenit din matricea extracelulară, obținut direct din hidroliza colagenului. Acest lucru îi oferă o biocompatibilitate ridicată, fiind recunoscută drept o substanță non-citotoxică cu proprietăți celulare excelente, ce permit atașarea și proliferarea celulelor, după cum a fost deja raportat în mai multe studii¹⁻⁴. Cu toate acestea, proprietățile mecanice slabe și capacitatea de gelifiere termoreversibilă a gelatinei împiedică folosirea acesteia ca atare, în absența unei reticulări chimice. Astfel, o pseudo-reticulare a gelatinei are loc la temperaturi joase, prin recăpătarea structurii inițiale de triplu helix a colagenului, dar aceasta este o tranziție sol-gel reversibilă la schimbările de temperatură, fiind principalul



impediment în folosirea gelatinei în aplicații de implantologie, unde temperatura fiziologică este 37°C (temperatură peste valoarea necesară pentru a stimula tranziția sol-gel) ⁵. Împiedicarea acestei tranziții spontane poate fi efectuată prin folosirea unor metode de reticulare ireversibile, folosind agenți de reticulare chimici, precum glutaraldehida, genipin și carbodiimide, sau enzimatici, precum transglutaminaza sau tirozinaza ⁵. Însă, marea lor majoritate din aceste metode de reticulare ireversibilă sunt caracterizate de dezavantaje precum citotoxicitate ridicată, disponibilitate redusă asociată cu costuri ridicate ale agentului de reticulare, modificarea activității celulare sau timpi de reticulare îndelungați ⁶⁻¹². Alternativ, derivați de gelatină modificată au fost dezvoltați prin modificarea funcționalităților multiple existente în structura gelatinei, pentru a facilita crearea de grupări polimerizabile, precum grupările metacrilamidice în cazul gelatinei metacrilamidată.

Peste 20 de milioane de intervenții anuale la nivel global sunt efectuate pentru tratarea herniilor abdominale, o afecțiune medicală comună, caracterizată prin slăbirea mușchilor abdominali ce permit pătrunderea prin peritoneu și peretele abdominal a organelor interne ^{13, 14}. Tratamentul pentru hernie depinde în funcție de severitatea acesteia. Astfel, în cazul herniilor de dimensiuni mici și de severitate redusă, care nu pun în pericol viața pacientului, medicul poate înclina spre atenta monitorizare a afecțiunii, pentru a împiedica agravarea herniei, fără alte intervenții ¹⁵; în timp ce în cazul herniilor avansate este recomandată intervenția chirurgicală, deschisă sau laparoscopică, prin implantarea unei plase chirurgicale poziționată astfel încât să acopere orificiul herniei și să ofere rezistență peretelui abdominal ¹⁵⁻¹⁷. La mai bine de 50 ani de la introducerea plaselor chirurgicale ca tratament pentru herniile abdominale, în ziua de astăzi, sunt utilizate în peste 80% din intervenții ^{17, 18}. În urma folosirii plaselor chirurgicale a fost observată o scădere semnificativă a ratei de reapariție a herniilor, definită ca rata de recurență, de la 25 - 50% în cazul tratamentelor clasice (supraveghere medicală, repaus la pat sau tratament medicamentos), la 4 - 24% pentru intervențiile chirurgicale ¹⁵. Mai mult, riscul de infecție a scăzut la aproximativ 1 - 8%, fiind influențat de factori precum natura materialului, procedurile și tehnicile operative sau istoricul medical al pacientului ¹⁹.

În prezent patru mari producători: Ethicon, o filială a companiei Johnson & Johnson, Covidien, Bard și Atrium comercializează la nivel internațional mai multe produse fabricate din materiale sintetice, biologice sau compozite, resorbabile sau nu. Goretex, Marlex, Parietene, Versatex sunt câteva exemple de plase comercializate din materiale sintetice precum politetrafluoroetilenă sau polipropilena (PP), în timp ce AlloDerm, FlexHD, Permacol sunt plase comerciale fabricate din materiale biologice, iar Proceed sau Vypro sunt plase hibride, alcătuite din PP și compuși biologici precum colagenul.

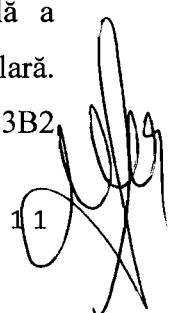


3. Problema tehnică

O complicație ce apare în cazul plaselor chirurgicale este aderarea fibrovasculară, ce are loc la aproximativ 50 - 90% dintre pacienți, cu grade diferite de severitate, prin formare de seroame (acumulări de lichid) sau hematoame (lezarea unor vase mari de sânge) între implant și peretele abdominal ²⁰, formare de biofilm la suprafața implantului ¹⁵ sau chiar ocluzie intestinală ca urmare a aderării implantului la organele viscerale ¹⁷. Mai mult, în cazul materialelor inerte precum PP trebuie considerată problema "răspunsului la corp străin" ("foreign body response", FBR) după implantare. În ciuda considerării plaselor inerte de PP ca „standard de aur” („golden standard”) datorită biocompatibilității, non-citotoxicității și non-imunogenității, suprafața inertă a materialului duce la formarea unei capsule fibroase împrejurul implantului, datorită lipsei interacțiunilor celulare dintre material și țesuturile înconjurătoare; astfel corpul uman izolează implantul, îl consideră "corp străin", și împiedică biointegrarea acestuia. Prin urmare, există în continuare o cerere mare pentru dezvoltarea unei plase pentru tratarea herniilor abdominale, adecvată și capabilă să susțină interacții celulare și să depășească provocările și limitările actuale.

Prezentată pentru prima dată în anul 2000 ⁷, GelMA este un biomaterial relativ nou, care prin adăugarea de grupări laterale duble în lanțului proteic al gelatinei, duce la obținerea unui monomer macromolecular foto-polimerizabil ²¹, devenind un material ideal pentru formarea de hidrogeluri în urma unui proces simplu (care nu necesită condiții speciale, precum pH sau temperatură), ușor de controlat și ajustabil (în funcție de gradul de substituție, inițiator și parametrii de foto-reticulare aplicați) ²². Îmbinând avantajelor materialelor de origine naturală cu cele de origine sintetică, GelMA a fost utilizată în numeroase domenii, ca și scaffold pentru regenerarea țesutului osos sau cartilagin ²³, ca și pansamente pentru arsuri și afecțiuni ale pielii, de sine stătătoare sau în amestec cu alți compuși precum celuloza ^{24, 25}, ca și material pentru aplicații de printare 3D ²⁶ sau ca și sistem pentru eliberarea controlată a substanțelor bioactive ²⁷.

În paralel, studii *in vitro* au arătat că derivații organici purtând lanțuri laterale de oligo(etilen glicol) sau grupări zwitterionice precum fosforilcolina (PC) sau carboxibetaina formează materiale ce împiedică adsorbția de proteine ²⁸⁻³⁰. Proprietățile lor antiadezive incomparabile sunt datorate, printre altele, de proprietatea acestora de a atrage o cantitate mare de apă pe suprafață ³¹ și biocompatibilitatea lor sporită, PC fiind de altfel partea hidrofilă a glicerofosfolipidelor, componentele principale a stratul dublu peptidic din membrana celulară. În plus, o stimulare a răspunsului imun a fost asociată cu unii derivați de PC. US10028813B2



prezintă folosirea unei plase de PP acoperită cu derivați de fosforilcolină, modificată prin imersare și un tratament termic sau chimic pentru a îngloba antibiotice precum minociclina sau rifampina, pentru a obține un implant pelvian pentru tratarea infecțiilor aparatului urinar.

4. Soluția tehnică

Soluția tehnică propusă se bazează pe folosirea unor soluții apoase de gelatină metacrilamică și 2-metacriloloxi-etil fosforilcolină ca soluții precursorare care, în prezența unui agent de foto-reticulare precum Irgacure 2959, duc la obținerea de 1) hidrogeluri bicomponente foto-reticulate, sau 2) coating, pentru a modifica la suprafață plase sintetice, precum plasa de polipropilenă, cu scopul de a forma suporturi biocompatibile, non-citotoxice ce permit atașarea și proliferarea celulelor și diminuează adsorpția proteinelor pe suprafață.

Ținând cont de cele menționate mai sus, este de așteptat ca plasa hibridă de PP acoperită cu GelMA-MPC să evidențieze beneficiile materialelor componente: rezistență mecanică ridicată și biocompatibilitate sporită (proprietăți specifice materialului inert sintetic), combinate cu biointegritatea, stimularea interacțiunilor celulare și accesibilitatea economică (caracteristici specifice materialelor biologice).

Hidrogelurile de GelMA-MPC foto-reticulate în prezență de Irgacure 2959, obținute din GelMA cu grade de substituție cuprinse între 6 și 99%, sub formă de amestecuri de GelMA:MPC:Irgacure, post un tratament cu raze ultra-violete (UV) timp de 60 minute, au prezentat grade de gonflare de până la 1000% după 4 ore de incubare în condiții fiziologice (PBS, pH 7.4, la 37 grade). O dependență a gradului de gonflare și stabilitate a hidrogelurilor *in vitro* a fost observată în raport cu gradul de substituție al GelMA și raportul componentelor GelMA:MPC, ceea ce indică posibilitatea customizării proprietăților hidrogelurilor în funcție de aplicația targetată. Hidrogeluri GelMA-MPC, cu o compoziție de 10:1 w/w și un grad de substituție de peste 80% pentru GelMA, au prezentat o stabilitate în condiții fiziologice de minim 3 săptămâni, non-citotoxicitate și interacțiuni celulare, comparativ hidrogelurile obținute dintr-o GelMA cu grad mediu de substituție, sub 50%, hidrogeluri care au prezentat o stabilitate de 1-2 săptămâni.

Plase de PP acoperite cu hidrogeluri bicomponente de GelMA-MPC, formate în urma imersării plasei, în absența sau post un tratament de plasmă, în soluții precursorare de 10% derivați de gelatină și MPC (raport 10:1 w/w), împreună cu un agent de foto-reticulare (raport 20:1 w/w) și supuse la UV la o lungime de undă de 365 nm, duc la formarea unui material hibrid hidrofili,

bio- și hemo-compatibil, care stimulează atașarea și proliferarea celulară, și reduce adsorbția de proteine.

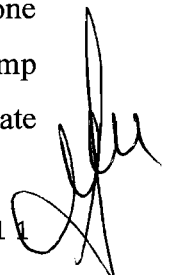
5. Avantajele invenției în raport cu stadiul tehnicii

În continuare sunt prezentate principalele avantaje a hidrogelurilor bicomponente GelMA-MPC:

- a) *Produsul interacționează favorabil cu celulele* datorită componentilor biologici, gelatina și fosforilcolina, derivați a colagenului și respectiv membranelor intra/extracelulare.
- b) *Usurința în manipulare* a componentilor - toate substanțele sunt utilizate în soluții apoase, prezentând o solubilitate ridicată în apă, și o toxicitate redusă (în cazul în care există).
- c) *Simplitatea* procesului de formare a unor hidrogeluri bicomponente de sine stătătoare sau sub formă de coating, foto-reticulate, prin amestecarea soluțiilor apoase precursoră, a agentului de foto-inițiere și supunerea la raze de ultra-violete pentru a induce procesul de reticulare.
- d) *Versatilitate* în a crea hidrogeluri cu proprietăți reglabile/adaptabile, datorită posibilității de modificare a gradului de substituție a gelatinei modificate folosite (GelMA), a raportului GelMA:MPC folosit, a concentrației agentului de foto-polimerizare sau a parametrilor de foto-polimerizare aplicați.
- e) *Diversitatea* de a folosi GelMA-MPC ca și coating, pentru a modifica suprafața plaselor sintetice, precum plasele de PP, prin simplă imersare în amestecul de soluții apoase precursoră și un agent foto-inițiator pentru a forma un strat de hidrogel pe suprafața plasei post foto-reticulare.
- f) *Eficiență biologică* datorită posibilității hidrogelurilor de GelMA-MPC de a stimula interacțiuni celulare și de a influența adsorbția de proteine, reducând reacțiile inflamatorii care acompaniază în general adsorpțiile nespecifice.

6. Descriere detaliată a invenției

1. Hidrogeluri bicomponente, pe bază de GelMA și MPC, în raport masic de 10:1, 10:2 și 1:2, unde GelMA are un grad de substituție (sau grad de înlocuire a grupărilor aminice din structura gelatinei cu grupări metacrilamidice) între 6% și 99%, obținute prin adăugarea unui agent de foto-inițiere precum 1-[4-(2-Hydroxyethoxy)-phenyl]-2-hydroxy-2-methyl-1-propane-1-one (Irgacure 2959) în raport de 0.5% și supus unui tratament de iradiere cu raze ultraviolete timp de 60 min la lungimea de undă fixă de 365 nm. Hidrogelurile bicomponente foto-reticulate



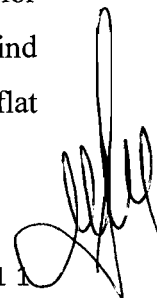
astfel obținute au prezentat o stabilitate reglabilă în condiții fiziologice normale (PBS, pH 7.4, 37 grade), cu grade de gonflare între 300-1000 %, dependente de gradul de substituție al gelatinei, raportul GelMA:MPC și parametrilor de reticulare folosiți.

Exemplu 1. Obținerea de hidrogeluri GelMA-MPC

Peste o soluție apoasă de GelMA cu o concentrație de 10% (w/v) s-a adăugat 2-metacrililoiloxi-etil fosforilcolină în raport masic de 10 : 1, și 1-[4-(2-hidroxi-etoxi)-fenil]-2-hidroxi-2-metil-1-propan-1-one sau Irgacure 2959, agentul de fotoinițiere, 0.5 % în raport cu GelMA. Amestecul a fost lăsat sub agitare cel puțin 30 minute, la temperatura de 40 grade, până la omogenizare completă. Apoi, un volum de 5 mL din amestec a fost turnat în forme de aluminiu și supus unui tratament de UV, la lungimea de undă fixă de 365 nm, la o distanță de 10 cm, timp de 60 minute. Similar au fost obținute hidrogeluri foto-reticulate martor de GelMA, formate în absența MPC, și hidrogeluri foto-reticulate de gelatină de tip B (GelB), în prezență de MPC și Irgacure.

GelMA folosită a fost obținută anterior prin modificarea de GelB cu anhidridă metacrilică, în soluție de tampon fosfat salin (PBS), la 40 grade, folosind metoda descrisă în [60], urmată de dializă în apă distilată timp de 72 ore, la 40 grade și liofilizare. Gradul de substituție, care exprimă procentul de amine primare înlocuite cu grupări metacrilamidice, a fost determinat prin analize spectrofotometrice în domeniul UV-VIS, la 340 nm, folosind metoda OPA descrisă de Greg T. Hermanson ³² și soluții de calibrare de n-butilamină (0.1 – 10 mM). GelMA cu grade de substituție cuprinse între 6 și 99 % au fost obținute și stocate liofizate la temperatura camerei până la folosire. Pentru ușurință, tipurile de GelMA au fost împărțite în funcție de gradele de substituție în GelMA cu grade de substituție de 6%, între 30-50%, între 65-80% și peste 90%, notate cu denumirile GelMAmic, GelMAmijl, GelMAmare și respectiv GelMAmax.

Hidrogeluri transparente, de culoare ușor galbenă, au fost obținute după iradiere cu UV, excepție fiind hidrogelurile formate din GelMA cu grad de substituție peste 90%, care a dus la formarea de hidrogeluri semi-opace, de culoare albă lăptoasă. Gradele de gonflare a hidrogelurilor bicomponente au fost evaluate în PBS, 10 mM, la 37 grade, prin metoda gravimetrică, pornind de la o masă de material uscat de masă cunoscută și înregistrând masa hidrogelului gonflat umed, după îndepărtarea excesului de mediu prin ușoară tamponare.



În Tabelul 1 sunt prezentate gradele de gonflare a hidrogelurilor GelMA-MPC reticulate și incubate în PBS, pH 7.4, la 37 grade timp de 4 ore și o săptămână. Valorile redade sunt media a 3 experimente și deviațiile standard aferente.

Tabel 1. Gradele de gonflare a hidrogelurilor de GelMA-MPC, obținute gravimetric după o incubare în condiții relevant fiziologice (PBS, pH 7.4, la 37 grade) timp de 4 ore și 7 zile.

Nr.	Proba	GelMA:MPC (w/w)	Grad de substituție, GelMA (%)	Grad de gonflare (%), după	
				240 (min)	10080 (min)
1	GelMAmax	10:1	81	347 ± 11.8	477 ± 23.2
2	GelMAmax-MPC	10:1	81	386 ± 5.1	547 ± 25.9
3	GelMAmare	10:1	69	549 ± 31.8	569 ± 52.4
4	GelMAmare-MPC	10:1	69	449 ± 77.0	509 ± 45.5
5	GelMAmijl	10:1	48	877 ± 17.8	972 ± 53.6
6	GelMA 1mijl-MPC	10:1	48	776 ± 33.8	828 ± 68.7
7	GelB	10:1	0	dizolvat	dizolvat
8	GelB-MPC	10:1	0	dizolvat	dizolvat

Exemplu 2. Modificarea de suprafață a plaselor de PP cu hidrogeluri de GelMA-MPC fotoreticulate

Plasa de PP, comercializată de Sigma, a fost modificată la suprafață cu o soluție apoasă de GelMA, de concentrație 10% (w/v), împreună cu 2-metacriloloxi-etil fosforilcolină în raport masic de 10 : 1, și 1-[4-(2-hidroxietoxi)-fenil]-2-hidroxi-2-metil-1-propane-1-one (Irgacure 2959, agentul de fotoinițiere), 0.5% față de GelMA. Bucăți de plasă cu arie cunoscută au fost imersate în amestecul de GelMA:MPC:Irgacure, timp de 10 min la 40 grade, în prezența sau absența unui tratament cu plasma (gaz dispersant CO₂, 1 min). După incubare, plasa modificată a fost expusă la UV, la lungimea de undă fixă de 365 nm, timp de 20 min pe fiecare parte. La sfârșit, plasa a fost spălată prin imersare de 10 ori în 15 mL de apă distilată, la 40 grade, pentru a îndepărta excesul de proteină și fosforilcolină.

Integritatea coatingului a fost verificată folosind un transiluminator, cantitatea coatingului a fost determinată gravimetric, iar concentrația de proteină și fosforilcolină în exces a fost determinată spectrofotometric din apele de spălare.

Tabel 2. Cantitatea de coating de pe plasele modificate de PP, determinată prin metoda gravimetrică.

Nr.	Proba	GelMA:MP C (w/w)	Grad de substituție, GelMA (%)	Masa coating (mg/mm ²)	
				fără plasmă	cu plasmă
1	GelMAmax	10:1	81	21147 ± 9047.8	20088 ± 5844.0
2	GelMAmax-MPC	10:1	81	7667 ± 565.7	16367 ± 4667.2
3	GelMAmare	10:1	69	n.a.	n.a.

4	GelMAmare-MPC	10:1	69	21683 ± 1,772.2	14097 ± 2.0
5	GelMAmijl	10:1	48	7147 ± 1018.2	7147 ± 1018.2
6	GelMA mijl-MPC	10:1	48	12227 ± 783.7	8650 ± 1126.4
7	GelMAmic	10:1	6	18214	14987 ± 220.7
8	GelMA mic-MPC	10:1	6	n.a.	54076 ± 21702.2
9	GelB	10:1	0	18588 ± 7392.8	11233 ± 4111.8
10	GelB-MPC	10:1	0	1142 ± 574.5	9098 ± 6437.8

Hidrofilia suprafețelor modificate a fost evaluată prin determinarea unghiului de contact, folosind metoda picăturii, cu un volum de 2 μ L per picătura de apă distilată. Valoarea unghiului de contact (SCA) a fost înregistrată ca valoarea medie a picăturii, măsurate timp de 10 secunde pe suprafața investigată, în triplicat pe cel puțin 2 probe.

FIGURA 1

Modificarea suprafețelor cu GelMA-MPC a dus la o îmbunătățire semnificativă a hidrofiliei plasei de PP ($p=0.01$) de la 125 grade la valori sub 90 grade. Aplicarea tratamentului de plasmă a avut ca rezultat obținerea unei modificări de suprafață uniformă pe întreaga suprafață a plasei. O corelație între unghiul de contact și gradul de substituție a gelatinei modificate a fost observată, astfel cel mai mic unghi de contact fiind înregistrat în cazul derivatului de GelMA cu un grad de substituție mare, peste 80%.

Exemplu 3. Determinarea viabilității celulare și investigarea interacțiilor celulare

Celule fibroblaste murine L929 (cod 85011425 de la ECACC) au fost cultivate în mediu DMEM suplimentat cu 10% ser bovin fetal și antibiotice (penicilină 100 IU/mL și streptomycină 100 μ g/mL). Plasele modificate au fost echilibrate inițial în 100 μ L mediu Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM de la Lonza) la 37 grade. După o oră, plasele au fost transferate în plăci cu 96 godeuri (ultra low attachment plates, Costar 3474) și pe suprafața lor au fost cultivate 10 000 celule / plasă, per godeu, și lăsate la 37 grade, 5% CO₂. Celulele neaderate după 48 de ore au fost spălate cu mediu proaspăt. Viabilitatea celulară a fost determinată după o incubare de 72 ore prin metoda MTT, urmând instrucțiunile producătorului. Plasa de PP ca atare și celulele atașate direct pe placa multigodeu au fost folosite ca martori.

În paralel, au fost înregistrate poze pe plasele fixate cu 4% paraformaldehidă în PBS timp de 2 ore și spălate cu PBS. Pentru o mai bună vizualizare, plasele au fost montate în glicerol, iar celulele au fost marcate cu DAPI și faloidină-TRICT. Imaginile au fost înregistrate cu un microscop Nikon TE2000-led echipat cu o cameră Nikon-DS-QI2, la magnificări de 4x și 10x.

FIGURA 2

Toate variantele de plase, nemodificate sau modificate cu variații de GelB, GelMA și MPC, au prezentat o viabilitate de peste 80%, după 72 de ore de incubare, demonstrând non-citotoxicitatea materialelor investigate. Mai mult, după cum se poate vedea în Figura 2, celulele s-au atașat pe toate plasele modificate, prezentând o morfologie elongată, cel mai probabil datorită interacțiunilor celulare cu suprafața modificată. În comparație, pe suprafața plaselor de PP nemodificată fibroblastele s-au grupat în sferoizi, fără a coloniza suprafața, indicând disconfortul celulele în prezența suprafeței inerte și preferința acestora de a interacționa doar între ele.

Exemplu 4. Investigarea adsorpției de proteine și hemocompatibilității

Plase de PP, ca atare și modificate cu GelB, derivați de GelMA și MPC au fost folosite pentru a investiga influența coatingului de GelMA-MPC asupra adsorpției de proteine în condiții relevant fiziologice, folosind proteine model precum proteine marcate fluorescent de albumină bovină (BSA-FTIC) și imunoglobulină (IgG-FTIC). Astfel, plasele investigate au fost incubate în soluții de 1 mg/mL de proteină în PBS, timp de 24 de ore, la 37 grade, în condiții statice. După incubare, plasele au fost spălate cu apă distilată (3 x 1 min incubare) și montate pe lamele de sticlă pentru a fi vizualizate cu un microscop inversat Nikon Eclipse Ti echipat cu o cameră monocromă Nikon DS-Qi2 și un filtru de fluorescență verde (GFPHQ, Ex=455-485 nm). Au fost înregistrate 4 poze diferite la magnificare de 20x în fluorescență, expunere 25ms, folosind filtru GFPHQ, și o poză în fază de contrast la magnificare 4x, 10 ms expunere. Intensitatea fluorescenței este redată ca media a 6 măsurători diferite. Imaginile au fost înregistrate și procesate folosind MicroManager și Fiji ImageJ softwares.

În paralel, hemocompatibilitatea plaselor a fost investigată prin determinarea timpilor APTT și a procentului de PT prin coagulometrie. În acest scop, plasele de PP nemodificate și modificate au fost incubate la 37 grade în plasmă, obținută prin centrifugare de sânge la 2500 rpm timp de 5 min. După 4 ore de incubare, un coagulometru Start Max a fost folosit pentru a efectua testele APTT și PT folosind kiturile și instrucțiunile oferite de producător.

În Tabelul 3 sunt prezentate rezultatele obținute. O reducere a absorbției de proteine, atât pentru BSA, cât și IgG, a fost înregistrată în cazul plaselor de PP modificate la suprafață cu derivați de MPC, mai ales în cazul folosirii de GelMA-MPC, unde GelMA are un grad de substituție sub 50%. În paralel, toate probele investigate au prezentat o hemocompatibilitate ridicată, similară cu PP și controlul pozitiv, plasma.

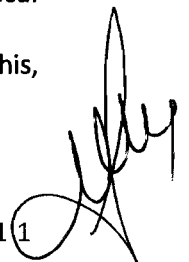
Tabel 3. Rezultatele înregistrate pentru absorbția de proteine și factorii de hemocompatibilitate investigate pe plase de PP modificate cu GelMA-MPC, post unui tratament de plasmă în CO₂, unde GelMA are grade diferite de substituție, plasa de PP nemodificată este considerat martor pozitiv, iar plasma de sânge este considerată control pentru coagulometrie

Nr	Proba	GelMA:MPC (w/w)	Grad de substituție, GelMA (%)	Adsorbție de proteină (intensitate)		APTT (s)	PT (%)
				BSA	IgG		
1	PP	-	-	1695 ±198.6	2289 ±139.6	32.8 ±2.90	108.0 ±12.02
2	Plasma simplă	-	-			32.5 ±3.54	108.0 ±15.56
3	GelMAmare- MPC	10:1	69	2300 ±272.3	1498 ±5.4	31.3 ± 2.69	105.0 ±15.56
4	GelMA mijl- MPC	10:1	48	752 ±37.7	715 ±16.6	34.4 ±3.68	112.3 ±25.46
5	GelB-MPC	10:1	0	493 ±42.4	693 ±8.3	33.7 ±3.04	116.3 ±31.82



BIBLIOGRAFIE

1. A. Serafim, S. Cecoltan, E. Olăreț, D. M. Dragusin, E. Vasile, V. Popescu, B. S. M. Mastalier, H. Iovu and I. C. Stancu, *Polymers*, 2020, **12**.
2. S. Van Vlierberghe, E. Vanderleyden, V. Boterberg and P. Dubruel, *Polymers*, 2011, **3**, 114-130130.
3. E. D. Giol, D. Schaubroeck, K. Kersemans, F. De Vos, S. Van Vlierberghe and P. Dubruel, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, **134**, 113-121.
4. E. D. Giol, S. Van Vlierberghe, R. E. Unger, D. Schaubroeck, H. Ottevaere, H. Thienpont, C. J. Kirkpatrick and P. Dubruel, *Macromolecular Bioscience*, 2018, **18**, 1800125.
5. S. Van Vlierberghe, G. J. Graulus, S. K. Samal, I. Van Nieuwenhove and P. Dubruel, in *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*, Elsevier Ltd., 2014, pp. 335-390.
6. A. B. Bello, D. Kim, D. Kim, H. Park and S. H. Lee, in *Tissue Engineering - Part B: Reviews*, Mary Ann Liebert Inc., 2020, vol. 26, pp. 164-180.
7. A. I. Van Den Bulcke, B. Bogdanov, N. De Rooze, E. H. Schacht, M. Cornelissen and H. Berghmans, *Biomacromolecules*, 2000, **1**, 31-38.
8. K. R. Stevens, N. J. Einerson, J. A. Burmania and W. J. Kao, *In vivo biocompatibility of gelatin-based hydrogels and interpenetrating networks*, 2002.
9. S. Van, V. Promotor and E. Schacht.
10. S. Van Vlierberghe, *Journal of Materials Science*, **51**.
11. G. Yang, Z. Xiao, X. Ren, H. Long, H. Qian, K. Ma and Y. Guo, *PeerJ*, 2016, **2016**.
12. W. Song, J. Ko, Y. H. Choi and N. S. Hwang, *APL Bioengineering*, 2021, **5**, 021502-021502.
13. G. Şeker, H. Kulacoglu, D. Öztuna, K. Topgöl, C. Akyol, A. Çakmak, F. Karateke, M. Özdoğan, E. Ersoy, A. Gürer, E. Zerbaliyev, D. Seker, K. Yorganci, A. Pergel, I. Aydin, C. Ensari, T. Bilecik, I. Kahraman, E. Reis, M. Kalayci, A. E. Canda, A. Demiraş, T. Kesicioğlu, Z. Malazgirt, H. Gündođdu and C. Terzi, *International Surgery*, 2014, **99**, 534-542.
14. N. Dabbas, K. Adams, K. Pearson and G. Royle, *JRSM Short Reports*, 2011, **2**, 1-6.
15. C. Wang See, T. Kim and D. Zhu, *Engineered Regeneration*, 2020, **1**, 19-33.
16. H. B. Cunningham, J. J. Weis, L. R. Taveras and S. Huerta, in *Hernia : the journal of hernias and abdominal wall surgery*, Springer-Verlag France, 2019, vol. 23, pp. 235-243.
17. K. Baylón, P. Rodríguez-Camarillo, A. Elías-Zúñiga, J. A. Díaz-Elizondo, R. Gilkerson and K. Lozano, in *Membranes*, MDPI AG, 2017, vol. 7.
18. C. R. Deeken and S. P. Lake, in *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Elsevier Ltd, 2017, vol. 74, pp. 411-427.
19. B. Stelian, M. Manolescu, V. Popescu, M. Septimiu Petrutescu, A. Serafim and I. C. Stancu, *Materiale Plastice*, 2017, **54**, 49-52.
20. P. Godara and B. Milthorpe, in *Comprehensive Biomaterials II*, Elsevier, 2017, pp. 733-745.
21. B. Hoon Lee, N. Lum, L. Yuan Seow, P. Qi Lim, L. Poh Tan, N. Zander, C. Kai Chua, W. Yee Yeong and J. An, *Materials 2016, Vol. 9, Page 797*, 2016, **9**, 797-797.
22. K. Rahali, G. Ben Messaoud, C. J. F. Kahn, L. Sanchez-Gonzalez, M. Kaci, F. Cleymand, S. Fleutot, M. Linder, S. Desobry and E. Arab-Tehrany, *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, **18**.
23. X. Fang, J. Xie, L. Zhong, J. Li, D. Rong, X. Li and J. Ouyang, *Journal of Materials Chemistry B*, 2016, **4**, 1070-1080.
24. J. J. He, C. McCarthy and G. Camci-Unal, *Advanced NanoBiomed Research*, 2021, **1**, 2100004-2100004.
25. F. Nazir, I. Ashraf, M. Iqbal, T. Ahmad and S. Anjum, *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021, **185**, 419-433.
26. R. L. Alexa, H. Iovu, J. Ghitman, A. Serafim, C. Stavarache, M. M. Marin and R. Ianchis, *Polymers*, 2021, **13**, 1-17.
27. M. Vigata, C. Meinert, S. Pahoff, N. Bock and D. W. Hutmacher.



28. K. Ishihara and Y. Iwasaki, *Journal of Biomaterials Applications*, 1998, **13**, 111-127.
29. I. Banerjee, R. C. Pangule and R. S. Kane, *Advanced materials (Deerfield Beach, Fla.)*, 2011, **23**, 690-718.
30. M. J. Tiera, X.-P. Qiu, S. Bechaouch, Q. Shi, J. C. Fernandes and F. M. Winnik, *Biomacromolecules*, 2006, **7**, 3151-3156.
31. S. I. Jeon and J. D. Andrade, *Journal of Colloid and Interface Science*, 1991, **142**, 159-166.
32. G. T. Hermanson, *Bioconjugate Techniques*, Elsevier, 1996.

Revendicări

Prin prezentul brevet solicităm dreptul de protecție asupra:

1. *Hidrogelurile bicomponente GelMA-MPC degradabile dezvoltate conform revendicării 1, caracterizate prin aceea că pot fi folosite pentru a obține materiale care stimulează interacțiile celulare și diminuează adsorpția de proteine datorită componenților biologici GelMA și MPC.*
2. *Procedeului de obținere al unor hidrogeluri foto-reticulate GelMA-MPC degradabile conform revendicării 1, caracterizate prin aceea că pot fi obținute într-un singur pas de sinteză, prin amestecarea componenților biologici cu un foto-inițiator și supus unui tratament de iradiere UV, la 365 nm, timp de 60 min; metodologia propusă este simplă și oferă versatilitate în reglarea/adaptarea proprietăților fizico-chimice a materialelor obținute și reproductibilitate în compoziția chimică a acestora. Grade diferite de substituție a componentului GelMA și raportul masic GelMA-MPC folosit duc la obținerea de hidrogeluri cu grade de gonflare diferite și stabilitate diferită.*
3. *Procedeului de obținere al unor coatinguri de GelMA-MPC conform revendicării 1 caracterizate prin aceea că sunt folosite pentru a modifica suprafața unor materiale inerte, precum plasa de PP, prin imersare în soluția amestec de GelMA:MPC:fotoinițiator timp de 10 min și reticulare la UV, lungime de undă fixă de 365 nm, 20 min pe fiecare față. O îmbunătățire a hidrofilității suprafețelor este înregistrată după aplicarea de coating GelMA-MPC, păstrând non-citotoxicitatea și hemocompatibilitatea materialului de bază, dar facilitând atașarea și proliferarea celulară și diminuarea adsorpției de proteine pe coatingul rezultat.*



DESENE

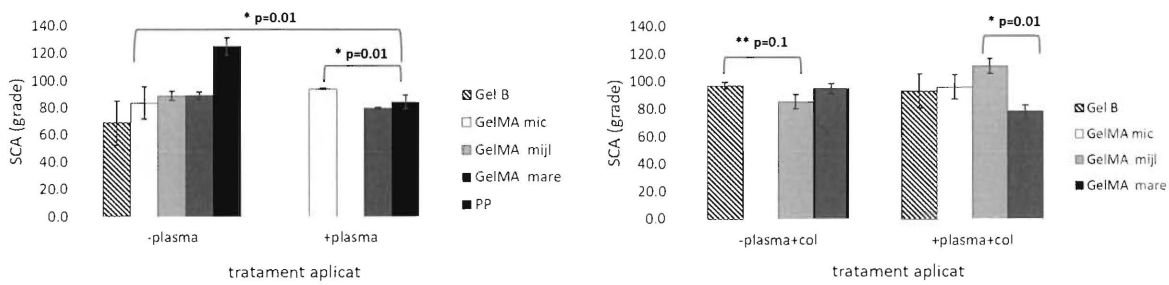


Figura 1. Unghiurile de contact determinate pe suprafața plaselor de PP modificate cu derivați de GelMA și MPC, post un tratament cu plasmă (CO₂, 1 min) sau în absența tratamentului de plasmă, unde plasa de PP nemodificată a fost folosită ca martor, împreună cu modificarea cu gelatină de tip B (GelB). Valorile redată sunt media a 3 măsurători, în duplicat.

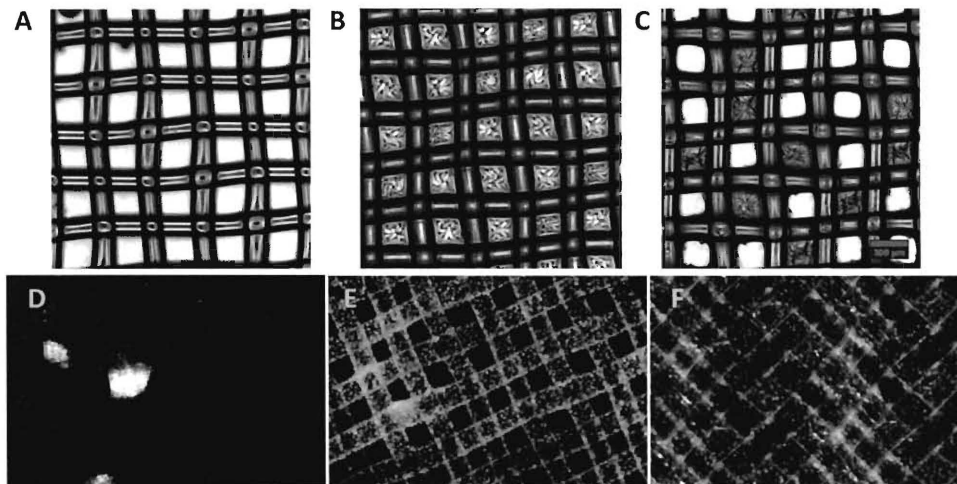


Figura 2. Imagini în faza de contrast a plasei de PP nemodificată (a), plasă de PP modificată cu GelMA mare (B) și respectiv plasă de PP modificată cu GelMA-MPC (C), și imagini în fluorescență a celulelor fibroblaste murine L929 după o incubare de 72 ore pe plasa de PP (D), plasa de PP modificată cu GelB-MPC (E) și respectiv plasa de PP modificată cu GelMA mare-MPC (F). Toate plasele modificate au fost tratate cu plasmă înainte de modificare. Pentru o mai bună vizualizare celulele L929 au fost marcate cu faloidină-TRIC, iar nucleele celulelor au fost marcate fluorescent cu DAPI. Pe proba D sunt evidențiate prin expunere în exces sferoizii celulari formați.