



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2021 00589**

(22) Data de depozit: **28/09/2021**

(41) Data publicării cererii:
30/03/2022 BOPI nr. **3/2022**

(71) Solicitant:

- UNIVERSITATEA POLITEHNICA DIN BUCUREȘTI, SPLAIUL INDEPENDENȚEI NR.313, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE DEZVOLTARE PENTRU FIZICA MATERIALELOR (INCDFM), STR.ATOMIȘTILOR, NR.405A, CP.MG-7, MĂGURELE, IF, RO;
- BIOTEHNOS S.A., STR. GORUNULUI NR. 3-5, OTOPENI, IF, RO;
- INSTITUTUL NAȚIONAL DE CERCETARE-DEZVOLTARE TEXTILE ȘI PIELĂRIE-SUCURSALA INSTITUTUL DE CERCETARE PIELĂRIE-ÎNCĂLȚĂMINTE, STR. ION MINULESCU NR.93, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(72) Inventatori:

- BATALU NICOLAE-DAN, ALEEA POLITEHNICII NR. 4, BL. 4, SC. B, ET. 4, AP. 30, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- DOBRE NICOLETA, STR.SPORTULUI, NR.5, BERCEI, IF, RO;

- TRANCĂU IOAN-OVIDIU, BD.DACIA, NR.14, ET.4, AP.12 BIS, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- DUMITRIU BRÎNDUȘA GEORGIANA, STR.DORNEI, NR.5, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- OLARIU LAURA, STR. LAINICI NR. 22, ET. 2, AP. 5, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- GRIGOROȘCUȚĂ MIHAI - ALEXANDRU, STR.VALEA OLTULUI, NR.24, BL.D31, SC.B, ET.1, AP.20, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- BURDUȘEL MIHAIL, BD.UNIRII, NR.64, BL.K4, SC.2, ET.2, AP.39, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;
- ALDICA GHEORGHE VIRGIL, ALEEA RÂMNICEL NR. 2, BL. M6, SC. B, AP. 66, SECTOR 6, BUCUREȘTI, B, RO;
- BĂDICĂ PETRE, BD.DINICU GOLESCU NR.37, SC.B, AP.48, SECTOR 1, BUCUREȘTI, B, RO;
- GAIDĂU CARMEN, STR.AL.PAPIU ILARIAN NR. 6, BL.42, AP.53, SC.2, SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO

(54) **STRUCTURI ORTETICE POROASE FUNCȚIONALIZATE
CU PULBERI ANTIMICROBIENE, FRAGMENTE
POLIPEPTIDICE ȘI EXTRACTE VEGETALE UTILIZATE
ÎN ORTOPEDIE ȘI TRAUMATOLOGIE**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de obținere a unor dispozitive medicale, cu rol multifuncțional, destinate imobilizării articulațiilor sau fracturilor. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de proiectare prin printare 3D a unui sistem poros funcționalizat folosind filament de acid poli(L) lactic (PLLA) biocompatibil, încărcarea cu polimer PVP și pulbere de MgB₂, la care se adaugă substanțe active de tip chitină, cheratină, extracte de trei frați pătați și albăstrele, în concentrație eficientă să asigure efect antibacterian, pe suprafața

interioară care vine în contact cu tegumentul, în care grosimea și forma inițială sunt proiectate în funcție de grosimea membrului pe care se aplică și de lungimea de încărcare cu substanțe active care să asigure atât efect antibacterian și de accelerare a vindecării unor plăgi sau arsuri, cât și o ventilație naturală a tegumentului.

Revendicări: 4
Figuri: 5

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).



Descrierea brevetului de invenție

Structuri ortetice poroase funcționalizate cu pulberi antimicrobiene, fragmente polipeptidice și extracte vegetale utilizate în ortopedie și traumatologie

elaborat de

Nicolae Dan **BATALU**, Nicoleta **DOBRE**, Ioan Ovidiu **TRANCĂU**,
Brîndușa **DUMITRIU**, Laura **OLARIU**, Mihai Alexandru **GRIGOROȘCUȚĂ**,
Mihail **BURDUȘEL**, Gheorghe Virgil **ALDICA**, Petre **BĂDICĂ**, Carmen **GAIDĂU**

1. Stadiul tehnicii

Invenția se referă la proiectarea unor dispozitive medicale, cu rol multifuncțional, care vin în contact cu tegumentul, cum ar fi ortezele, protezele, bandajele etc, destinate tratamentului în ortopedie-traumatologie, chirurgie reparatorie și reconstructivă, dermatologie. Ortezele imobilizează o articulație luxată care a fost redusă ortopedic sau imobilizează un segment anatomic după tratamentul ortopedic sau chirurgical al unei fracturi.

Designul propus asigură o interfață poroasă, funcționalizată, care conține substanțe active implicate în regenerarea cutanată și substanțe antimicrobiene, care protejează tegumentul pe perioada utilizării, permițând o respirație/ventilație a zonei fixate și accelerează procesele de vindecare dermo-epidermică. De asemenea, substanța activă poate avea acțiuni multiple, cum ar fi dacă fractura este asociată cu o arsură sau deteriorare de altă natură a țesutului epitelial.

Orteza, cu rol de imobilizare și de susținere, are o rigiditate bună, asigurată atât de material, cât și de forma ei. Este realizată din polimeri termoplastici, printabili 3D, cu o structură poroasă care se va umple cu substanțe active. Porii ortezei sunt fie proiectați geometric asistat de calculator, cu forme și distribuție controlate, fie se pot obține prin alte procedee, dar cu o distribuție aleatorie a formei și dimensiunii.

Extractele vegetale conțin principii bioactive din plante precum trei frați pătați și albăstrele, asociate cu fragmente de cheratină și/sau chitină, precum și cu agenți antimicrobieni, în vederea maximizării acțiunii terapeutice. Toate aceste adaosuri se încarcă în porii ortezei printate 3D, într-o peliculă de înglobare din polimerul biocompatibil și biodegradabil - polivinilpirolidonă (PVP). Inovarea în cadrul soluției propuse constă și în efectul combinat, sinergetic al componentelor active. Pentru asigurarea efectului antimicrobian s-a folosit compusul intermetalic, borură de magneziu, cu proprietăți antimicrobiene demonstrate.

Orteza este un dispozitiv medical folosit la imobilizarea unei articulații sau fracturi. Este recomandată de către medicii ortopezi în cazul afecțiunilor osoase și ligamentare, având rolul de a imobiliza articulația/fractura, precum și de a reduce durerea la nivelul segmentului anatomic respectiv contribuind astfel la vindecarea leziunilor [Skirven, Osterman et al, Foundations of Orthotic Intervention, 2011, 1565-1580].

Aceste orteze sunt fabricate cu ajutorul tehnologiei de printare 3D (cunoscută și ca fabricare aditivă), care permite realizarea acestora la dimensiuni adaptabile și forme personalizate, precum și a unui design ergonomic și rentabil. Astfel, se pot obține progrese foarte mari în timpul terapiei de recuperare funcțională în comparație cu folosirea altor dispozitive medicale. De asemenea, reducerea timpului de fabricare și a costurilor sunt alte avantaje ale tehnologiilor de fabricație aditivă relevante în dezvoltarea și fabricarea ulterioară a ortezelor [Toth, Schiffer et al, *Materials & Design*, pp. 8-9, 2020]. Totodată, printarea 3D oferă un grad de complexitate crescut al designului. În felul acesta, se pot crea forme complexe care prin metodele tradiționale nu sunt realizabile. În plus, printarea 3D a ortezelor pentru articulațiile mâinii și ale pumnului permite realizarea acestora în serie mică, la comandă, adaptate condițiilor fiecărui pacient. Astfel, se economisesc materiale și substanțe,

reducându-se totodată și pierderile excesive și inutile. Modelele propuse sunt fabricate din materiale biodegradabile, ușor de reciclat.

În decursul timpului au fost dezvoltate numeroase tipuri de orteze, unele rămase la nivel de concept, altele fiind folosite în mod curent.

În 1976 a fost publicat un brevet privind un dispozitiv ortetic electric destinat articulațiilor mâinii, care asigură prehensiunea degetelor. Orteza este formată dintr-o flanșă pentru a susține policele și dintr-o componentă pivotantă pentru celelalte degete ale mâinii [Patent US3967321].

O altă invenție din 1980 se referă la o orteză pentru membrul superior care se folosește pentru executarea unor mișcări pasive sau active, fără a aplica forțe directe, acest lucru fiind posibil datorită arborilor proximali și distali, care sunt uniți la un pivot [Patent US4214577].

În 1988 a fost publicată invenția privind un dispozitiv ortopedic format dintr-o folie flexibilă care înconjoară componenta corpului afectată și dintr-un buzunar pentru a primi un element de întărire termoformabil, acesta fiind atașat la folie doar parțial, pentru a permite pacientului mișcarea. Această orteză prezintă o extensie la articulația interfalangiană proximală, permițând totodată un grad ridicat de mobilitate a policelui [Patent EP0275613].

În 1991 a fost publicată o invenție a unui sistem pentru tratarea fracturilor antebrăului. Acest tip de orteză este format dintr-un element de susținere rigid și alungit semnificativ, precum și din anumite dispozitive de fixare și de susținere la nivelul antebrăului [Patent AU6618990]. Tot în 1991, apare o invenție legată de un dispozitiv ortetic adaptat antebrăului la pacienții cu boli cronice, vârstnici și persoane cu handicap, care constă într-un element de blocare, realizat dintr-un material moale, cu o curea de fixare funcțională pentru a plasa antebrăul într-o anumită poziție. Totodată, un element de susținere a mâinii este atașat în elementul de blocare, acesta putând fi ajustat pentru a permite diferite grade de mișcare [Patent US5060638].

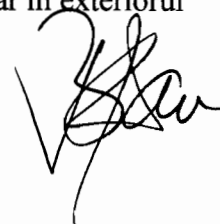
În 1994 au fost inventate ortezele dinamice cu rezistență proporțională. Acestea sunt orteze complexe, care permit mișcarea mâinii [Patent US5337737]. Tot în 1994 este publicată invenția unor dispozitive ortetice polimerice. Obiectivul acestei invenții este furnizarea ortezelor preformate, modelate pentru a se adapta mărimii și formei potrivite, fiind prevăzute cu materiale cu memoria formei pentru a-și păstra aceeași configurație chiar și într-o varietate de condiții de utilizare [Patent US5415623].

În 1995 este publicată o invenție privind o orteză prefabricată din material compozit, formată dintr-un cadru din rășină polimerică armată cu fibră de sticlă, suficient de flexibil pentru a asigura o adaptare bună, la care se adaugă un element de armare din rășină ranforsată cu carbon și fibră de sticlă, suficient de rigid pentru a asigura imobilizarea necesară [Patent WO9531950].

În 1996 este publicată invenția unui tip de orteză care poate fi utilizată pentru a produce flexie în articulația radio-carpiană. Această orteză poate fi utilizată pentru a produce o mișcare de flexie la nivelul unei articulații în același timp cu o mișcare de extensie la nivelul altei articulații [Patent US5503619].

În 1997 este inventată o orteză pentru imobilizarea mâinii în repaus, formată dintr-un element de atelă rigid cu o porțiune adaptată și dintr-o porțiune care se extinde de la articulația radiocarpiană și ajută mâna pacientului să rămână în flexie [Patent US5637078].

În 1998 este inventată o orteză pentru articulațiile mâinii cu separatoare de degete. Această orteză este formată dintr-un element de bază care susține mâna și degetele, având și un capac care se extinde peste zona de susținere a degetelor. De elementul de bază este fixată și o curea flexibilă, care se extinde lateral peste separatoarele dintre degete. Capacul și separatoarele sunt alcătuite dintr-un material lavabil care asigură absorbția transpirației [Patent US5766142]. În același an este publicată o invenție legată de o orteză a articulației radiocarpiene și a mâinii, formată dintr-un corp de susținere și dintr-o atelă rigidă în formă de lingură plasată pe peretele interior al corpului de susținere al ortezii [Patent US5772620]. Tot în 1998 apare o invenție cu privire la o orteză pentru articulațiile mâinii cu suport interschimbabil pentru police, formată dintr-un element de bază alcătuit din mai multe porțiuni pentru articulația radiocarpiană, mână și degete. Elementul cilindric este fixat cu ajutorul unui pivot de capacul adiacent. Acesta prezintă o deschidere pentru capacul cilindric detașabil, iar în exteriorul



acestui se află un alt element reprezentat de o curea care se extinde peste policele pacientului [Patent US5782784].

În 2000 este publicată o invenție legată de o orteză de pumn cu mâna în repaus dorsal, formată dintr-o atelă rigidă, care are o porțiune special creată pentru a se potrivi cu partea dorsală a articulației radiocarpene. O căptușeala rezistentă alături de niște curele se extind de-a lungul suprafeței interioare a ortezei, pentru a se fixa pe antebraț, articulația radiocarpiană și degetele pacientului [Patent US6120471]. În același an este inventată o orteză pentru articulația radiocarpiană și articulațiile mâinii. Aceasta cuprinde în combinație o componentă alungită, flexibilă, relativ subțire cu o latură adaptată regiunii hipotenare a mâinii. Această orteză este dintr-un elastomer [Patent US6142966]. Tot în 2000 este publicată invenția legată de o orteză pentru articulația pumnului și a degetelor. Orteza cuprinde o atelă flexibilă întinsă de la antebraț la vârful degetelor și de o multitudine de curele. Pentru a traversa degetele pacientului, curelele au anumite capete care se atașează în zone speciale, acestea fiind diferențiate cu ajutorul unor culori pentru ușurința în utilizare [Patent US6165148].

În 2001 este publicată o invenție privind o orteză pentru supinația și pronația a antebrațului, care cuprinde o manșetă fixată pe braț, o componentă pentru antebraț, un suport adiacent pentru cot, un conector pentru articulația pumnului care include un braț oscilant, un capăt creat pentru articulația pumnului și un capăt conectat cu un pivot plasat la nivelul antebrațului, o manșetă pentru articulația pumnului și un mecanism de oscilație [Patent US6179799B]. În același an este inventată o orteză a antebrațului și a mâinii, deformabilă. Orteza are o componentă semi-rigidă deformabilă cu două plăci unite între ele. Curelele sunt atașate de capac, iar inserția formată este închisă complet cu un fermoar [Patent US6024714].

În 2002 este publicată invenția unei orteze pentru articulațiile mâinii, formată dintr-o componentă cu formă sferoidală și o suprafață elipsoidală. Orteza este fixată în palma pacientului și asigură și separarea degetelor unul de celălalt [Patent US6482168].

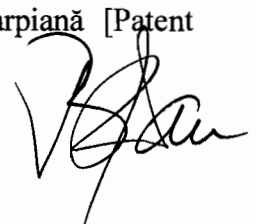
În 2003 este publicată o invenție legată despre o orteză formată din două piese pentru pumn și degete. Acest tip de orteză include o componentă rigidă pentru antebraț, respectiv pentru articulația pumnului și una pentru degete [Patent US2003078530].

În 2004 este publicată o invenție care se referă la o orteză pentru tratarea patologiilor legate de articulația trapezo-metacarpiană și regiunea acesteia. Această orteză este formată din trei dispozitive care au efecte terapeutice: primul este situat între police și index formând primul unghi, potrivit pentru a permite mișcarea; al doilea este situat la nivelul articulației trapezo-metacarpiană, ca un dispozitiv de strângere adaptat pentru a exercita o forță de reglare a bazei primului metacarpian; al treilea este situat în spatele policelui și îmbină efectul de elasticitate al materialului situat în primul unghi [Patent EP1372550]. Tot în 2004 este inventată o orteză pentru blocarea flexiei dorsale a mâinii. Acest tip de orteză este format din două elemente rigide de atelă, prima adaptată mâinii pacientului, iar a doua așezată pe partea dorsală a articulației pumnului, astfel încât flexia dorsală a mâinii să rămână blocată [Patent US2004138597].

În 2005 este inventată o orteză ambidextră pentru articulația radiocarpiană, creată pentru articulațiile artrozice. Orteza este formată dintr-o mâneacă cu două învelișuri care formează o atelă detașabilă. Învelișurile se extind longitudinal cu ajutorul unor deschideri proximale. Pentru o ușoară utilizare, orteză este prevăzută și cu o gaură pentru trecerea policelui [Patent FR2857854].

În 2006 este publicată o invenție legată tot de o orteză ambidextră pentru pumn. Diferența constă în faptul că noua orteză este prevăzută cu mijloace pentru imobilizarea policelui [Patent WO2006042865]. Tot în 2006 este publicată o invenție care descrie o orteză a antebrațului și a mâinii formată din atele care conțin inserții termoplastice modelabile înconjurată de un material căptușit. O multitudine de benzi sunt atașate la căptușeala atelei pentru a ajuta la corectarea articulațiilor interfalangiene proximale sau a articulațiilor interfalangiene distale ale degetelor [Patent US2006264792].

În 2008 se publică invenția unei orteze pentru articulația radiocarpiană și a mâinii. Invenția are o componentă de susținere adaptată pentru fixarea antebrațului, un suport pentru a intra în contact cu suprafața palmei și dispozitive de închidere pentru a acoperi zona metacarpiană [Patent US2008208093].



Tipurile de orteze folosite pentru articulația radiocarpiană și a mâinii pot fi clasificate în funcție de rolul acestora [J.D. Hsu et al, Atlas of orthoses and assistive devices, 2008]. După mobilitate ortezele pot fi: statice, statice seriale, dinamice și statice progresive. Aceste denumiri indică opțiunile de modele care se pot utiliza pentru a efectua imobilizarea, mobilizarea sau restricționarea structurilor respective [Jacob and Noelle, Orthotic intervention for the hand and upper extremity: Splinting principles and process, 2013].

Calitatea materialelor din care sunt confecționate ortezele antebrațului și ale mâinii este foarte importantă, deoarece utilizarea acestora necesită un contact îndelungat cu tegumentul. În ce privește fabricarea aditivă, există mai multe variante de printare 3D a ortezelor, însă procesul de printare, definitivarea prototipurilor, materialele folosite și costul de producție depind de mai mulți factori, în special de dimensiunea ortezelor și proprietățile materialelor utilizate [Miclaus et al, Materiale plastice, 54 (1) 98-102, 2017].

Pentru fabricarea ortezelor există o varietate de opțiuni de materiale termoplastice cu proprietăți diferite de rezistență. Este important ca materialul ales să fie potrivit pentru tipul de orteză dorit, însă printre cele mai folosite materiale biocompatibile adecvate printării 3D menționăm următoarele: PLA, PLLA, PMMA, POM și PEEK.

Problematica tratării plăgilor, arsurilor și a ulcerelor cutanate continuă să fie un domeniu de actualitate care necesită soluții inovative dezvoltate pe baza medicinei regenerative. Utilizarea plantelor medicinale / extractelor naturale constituie o rezolvare concretă în acest sens (M.R. Serafini, A.G. Guimarães, L.J. Quintans-Júnior, P.S. Nunes, I.G. Matos, S.S., A.A. de Souza Araújo. *Recent Patents on Medicinal Plants/Natural Products as a Therapeutic Approach to Wounds and Burns Healing*, Recent Patents on Biotechnology, 2014, 8(3), 231-239), preocupările științifice în dezvoltarea de noi produse fiind prezentate succint în cele ce urmează:

- brevetul US 2015/0030708A1 prezintă compoziții pentru tratamentul escarelor, plăgilor, arsurilor și a altor leziuni cutanate, bazate pe compuși naturali din *Boswellia*, *Melaleuca oil*, gel, rășină de aloe și ulei de lavandă, încorporate în dispozitive medicale de tip bandaj;
- brevetul WO 2017/122224A1 se referă la o formulare nanobiocompozit pentru vindecarea plăgilor, utilizând principii active din chimen (*Cuminum cyminum*), cu activitate antiinflamatorie, angiogenică și reepitelizantă;
- brevetul WO 2007/045931A2 propune compoziții bazate pe miere și extracte de plante pentru tratarea plăgilor, prin aplicare directă sau impregnare într-un substrat compatibil;
- brevetul US 2014/20130323337 susține aplicativitatea extractelor, uleiurilor și pudrelor vegetale din fam. *Zingiberaceae* (de ex. cardamon, ghimbir, curcuma) cu efecte în turn-over-ul colagenului.

2. Problema tehnică rezolvată de invenție

Invenția constă în realizarea unui sistem complex, funcțional, care pe lângă rolul mecanic de imobilizare, are și un rol de înglobare de substanțe active medical, care să inhibe dezvoltarea bacteriilor între orteză și tegument prin purtarea îndelungată, precum și să accelereze procesele de vindecare, în situația unei arsuri, plăgi etc. Pentru aceasta structura ortezei este creată de așa natură încât să poată fi printată 3D prin tehnologii aditive, precum FFF (FDM), DLP, SLS, SLA etc și prin structura poroasă să asigure încărcarea cu substanțe active.

Porii pot avea forme geometrice proiectate (cuboide, Fig. 1.a, sferice, giroidale etc) sau forme naturale, așa cum rezultă din procesul de fabricare sau de postprocesare (sablare, atac chimic, tratament termic în pulbere de sare, amestec de material stabil cu material solubil în apă/alcool, cum ar fi PVA). Complexele active încărcate în porii prototipului (Fig. 1.b) reunesc compuși din clase de flavone, antociani, acizi polifenol carboxilici, poliacetilene etc, precum și fracții proteice de cheratină și / sau chitină, cât și pulberi antimicrobiene, respectiv de MgB₂. Eficacitatea acestora în procesele regenerative cutanate a fost demonstrată prin studii *in vitro* la nivel de keratinocit, fibroblast și celule endoteliale vasculare:



- a. Protecție celulară față de apoptoza indusă de atacul bacterian;
- b. Stimularea regenerării epidermale prin mecanisme de accelerare a diferențierii în stratul bazal și cornos, și a turn-overului keratinocitar;
- c. Stimularea regenerării la nivel dermic în condiții de simulare a plăgilor cronice;
- d. Acțiune moderată asupra stresului oxidativ intracelular;
- e. Inhibiție specifică și diferențiată pe factori de propagare a inflamației: citokine IL6 și IL8 la nivel dermo-epidermic; ICAM - moleculă microvasculară de adeziune endoteliu-monocit, la nivel vascular, cu rezultat în reducerea activității enzimatică a metaloproteinazelor matriceale MMP2 și 9, responsabile de dezintegrarea matricei extracelulare.

Aceste acțiuni biologice sunt prezentate în brevete și publicații anterioare (RO 128802 B1/2017 - *Proodus dermatocosmetic împotriva îmbătrânirii, cu efect regenerativ, restitativ, modulator estrogenic și fotoprotector*; *The Development of phytotherapeutic products with action against cutaneous inflammatory disturbances*, Olariu L., Zglimbea L., Dumitriu B., Ene M.D., Nita R.A., Dinca G., medalie de aur Euroinvent 2013). De exemplu, extractul din trei frați pătați (*viola tricolor*) acționează ca antioxidant în amestec cu alte extracte (brevet KR20110023437), având efect de albire (brevet JP 2000159622) și contribuie la regenerarea pielii (brevet IL106288). Extractul de albăstrele (*centaurea cyanus*) prezintă acțiune anti-inflamatoare la nivel de endoteliu vascular (inhibiția expresiei moleculei de adeziune ICAM, și a eliberării citokinelor pro-inflamatorii IL6 și IL8). În plus, componentele extractului de albăstrele conferă acestuia și un efect antioxidant și antimicrobian, precum și anti-iritant față de radiația UV prin inhibiția moleculei pro-iritative IL1 α (brevet RO 2017/128710 B1, *Proodus fito-terapeutic dermatocosmetic cu acțiune cumulată în perturbări inflamatorii cutanate și procedeu de preparare a acestuia*). S-a demonstrat acțiunea specifică a chitinei și a fracțiilor de cheratina, diferențiată pe anumiți factori de propagare a inflamației, funcție de statusul funcțional celular: reducerea IL6 și IL8 la nivel keratinocitar, acțiune moderată asupra stresului oxidativ intracelular, în special asupra apei oxigenate (efect indus de cheratină), protecție celulară față de apoptoza indusă de atacul bacterian, realizată de fracțiile de cheratină și chitină (B. Dumitriu, L. Olariu, L. Tanase, S. Serbu, C. Gaidau N. Rosoiu. *Modularea în condiții pro-inflamatorii diferențiate in situ a radicalilor liberi oxigenați și a citokinelor IL6 și IL8 prin fracții polipeptidice bioactive*, CONFERINȚA ȘTIINȚIFICĂ DE PRIMĂVARĂ a AOSR 2021, BUCUREȘTI).

Porii dispozitivului medical vor îngloba principii bioactive în regenerarea cutanată, în special cele a căror activitate biologică a fost prezentată anterior. Forma și dimensiunea porilor se poate controla, astfel încât să înglobeze o cantitate prestabilită de substanță activă, cu eliberare controlată, fie printr-un gradient al compoziției, fie printr-o suprafață textilă care să absoarbă transpirația, dar și să permită activarea/reactivarea ei cu substanța activă.

De asemenea, în ansamblul dispozitivului medical vor fi integrați compuși intermetalici antimicrobieni (diborura de magneziu, MgB₂, cerere brevet: P. Badica, D. N. Batalu, M. A. Grigoroscuta, M. Burdusel, G. V. Aldica, M. Popa, M. C. Chifiriuc, Pulberi, corpuri sinterizate și acoperiri pe baza de MgB₂ rezistente la colonizarea microbiana și cu eficiență împotriva biofilmelor microbiene și metoda de folosire a acestuia, RO 2018 01129A) pentru prevenția / tratarea infecțiilor asociate. Integrarea acestora se va face fie în porii configurați prin geometrie 3D, fie prin inserție în polimerul printabil.

Forma ortezei se poate adapta ușor printr-o proiectare CAD parametrizată, în care se pot stabili câteva variabile independente, cum ar fi dimensiunea porilor și dimensiunea ortezei. Orteza se poate printa plană (Fig. 2) și apoi termoforma prin imersare în apă încălzită la 60-70 °C și modelare rapidă pe mâna pacientului (Fig. 3.a, b; dacă temperatura este prea mare, membrul se poate izola termic) sau prin modelare virtuală după o imagine 3D scanată cu mâna pacientului și printată în forma 3D finală, fără termoformare.

Conform celor arătate, invenția se încadrează conform regulamentului de aplicare a Legii 64/1991 la Art. 9 (a)-(c):

- a) folosirea neevidentă de mijloace cunoscute, într-un alt scop și cu obținerea unor efecte noi, surprinzătoare;
- b) o nouă utilizare a unui dispozitiv ori a unui material cunoscut care elimină dificultăți tehnice imposibil de depășit în mod cunoscut;
- c) o combinație de caracteristici noi sau cunoscute realizată în așa fel încât acestea să își potenteze reciproc efectele și să se obțină un rezultat tehnic nou;

3. Avantajele invenției în raport cu stadiul tehnicii

Avantajele invenției în raport cu stadiul tehnicii prezentat anterior se pot identifica astfel:

1. sistemul propus poate fi încărcat cu substanțe active care să fie eliberate progresiv, reducând sau eliminând necesitatea unui tratament alternativ, sistemul orteză-suport/rezervor medicamentos funcționând simultan;
2. sistemul este proiectat să poată fi printat 3D (fabricare aditivă), deci accesibil în cabinetele ortopedice, permițând personalizarea cu ușurință a dispozitivului în funcție de pacient;
3. adaosul antibacterian, MgB_2 , s-a dovedit eficient în inhibarea activității bacteriene (Batalu și colab., *Materials Science and Engineering C* 42, p. 350–361, 2014) și are o bună citocompatibilitate (Fig. 4);
4. substanțele active au rolul de a interveni în mecanisme celulare complementare ce reconstituie integritatea și funcționalitatea țesutului cutanat (B. Dumitriu, M.L. Tanase, L. Olariu, C. Gaidau, P. Badica, D. Batalu. *Innovative combinations of renewable sources' bioactive compounds with restoring action on dermal & epidermal homeostasis*, medalie de aur **EUROINVENT 2021**);
5. înglobarea principiilor active în porii ortezelor crează premisele unei cicatrizări eficiente (Fig. 5) simultan cu consolidarea osoasă, în cazul imobilizării unei fracturi.

Complementaritatea efectelor descrise în stadiul tehnicii pentru compușii vegetali din extractele de trei frați pătați, albăstrele și brusture, precum și pentru fracțiile de cheratină și chitină, a condus la ideea înglobării acestora în matricea polimerică poroasă, conferind stabilitate compușilor și eliberare treptată în țesutul lezat. Conform invenției, utilizarea amestecului de extracte de trei frați pătați (*Viola tricolor*), albăstrele (*Centaurea Cyanus*), fracții de cheratină și chitină în ansamblul realizat prin printare 3D este susținută de studiile de bio-compatibilitate și acțiune specifică *in vitro* pe care le vom prezenta în continuare.

a) Evidențierea biocompatibilității suporturilor obținute prin printare 3D: evaluarea statusului metabolic al keratinocitelor umane normale și evaluarea potențialului citotoxic al polimerului biocompatibil PVP, simplu sau cu borură de magneziu.

Pentru evaluarea biocompatibilității au fost realizate acoperiri din PVP+ MgB_2 pe folii de plastic. S-a optat pentru acest model de probe pentru a asigura o bună eliberare a MgB_2 , substanța activă antimicrobiană, ca punct de referință pentru realizarea în următoarea etapă a materialului printat 3D (din acid poli(L)lactic, PLLA) și încărcat cu PVP+ MgB_2 .

Diborura de magneziu (MgB_2) a fost introdusă într-o soluție de alcool etilic (120 ml) în care în prealabil s-a dizolvat polimerul PVP (2 g). Soluția s-a amestecat cu ajutorul unei instalații de ultrasonare SONICS. Parametrii de ultrasonare au fost: energie 500 kJ, amplitudine 90%, ciclul de amestecare fiind de 2 min în pulsuri de 7 sec ON și 3 sec OFF. Acoperirea foliei s-a făcut prin imersarea ei în amestec, imediat după ultrasonare. Cantitatea de MgB_2 în soluția indicată a fost: A = 0,0003 g, B = 0,0030 g, C = 0,0307 g, D = 0,3282 g și E = 0,9846 g. După amestecare, foliile acoperite au fost uscate în aer la temperatura camerei, prin evaporarea alcoolului. După uscare foliile acoperite au fost tăiate în discuri cu diametrul de 2 cm. Împreună cu MgB_2 se pot adăuga prin același procedeu alte adaosuri, precum cele exemplificate mai sus (extracte de plante ș.a.).

Discurile de mai sus au fost incubate în 2 ml mediu de cultură timp de 20 h în condiții de cultivare celulară (incubator cu CO_2 , 37 °C). După acest interval de timp, s-au prelevat câte 100 μl

(100%), respectiv 50 μ l (50%) și s-a realizat testarea citotoxicității prin două metode corelative ce evidențiază activitatea metabolică prin colorație cu MTS (<https://www.pronova.ro/-/media/files/resources/protocols/technical-bulletins/0/celltiter-96-aqueous-one-solution-cell-proliferation-assay-system-protocol.pdf?la=en>) simultan cu eliberarea lactat dehidrogenazei (LDH) din spațiul citozolic, prin permeabilizarea membranei plasmatică, ca indicator de toxicitate (CytoTox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay Technical Bulletin).

Rezultatele sunt prezentate în figura 4.

Activitatea metabolică a keratinocitelor, exprimată de marcarea MTS, se menține la un nivel superior sau cel puțin egal față de indicele de toxicitate exprimat de eliberarea LDH, demonstrând o bună compatibilitate la nivel epidermal a polimerilor PVP și PLLA. Se observă faptul că proporția de 50% mediu preincubat/mediu de cultură este optimă pentru viabilitatea celulelor epidermale, astfel încât combinațiile cu MgB₂ s-au testat în această variantă. Toate concentrațiile de MgB₂ (A, B, C, D, E) sunt compatibile la nivel epidermal, având în vedere că viabilitatea liniei celulare HaCaT (evaluată prin tehnica MTS) se menține superioară indicatorilor de toxicitate, evaluată prin eliberarea LDH în mediul extracelular.

b) Evidențierea efectelor de regenerare epidermală, stimularea turn-overului și diferențierii keratinocitare

Procesul de diferențiere este premergător regenerării la nivelul epidermului, realizată în tandem cu accelerarea diviziunii celulare. Reepitelizarea prin diferențierea keratinocitelor (evidențierea straturilor epidermei: bazal, spinos și cornos prin expresia keratinei 5/14; transglutaminazei-1 și involucrinei), corelată cu stimularea multiplicării celulare este fenomenul primordial al reechilibrării statusului funcțional epidermal. În condiții tipice de cultivare, celulele din linia imortalizată HaCaT au un fenotip parțial sau complet diferențiat datorită conținutului mare de calciu din mediul de cultură și din serul fetal bovin. În condiții de cultivare la concentrații mici de calciu, celulele suferă o transformare reversibilă la fenotipul bazal, de la care, în condiții controlate prin concentrații progresive de calciu se pot induce stadii de diferențiere bine definite, corespunzătoare stratului bazal, spinos, granulos sau corneum. Determinarea acestor stadii de diferențiere se face prin evidențierea anumitor proteine și enzime exprimate specific, după cum urmează: involucrina (stratul corneum și granulos), transglutaminaza (stratul spinos), keratina K14 (stratul bazal). Concentrația externă de calciu reglează diferențierea keratinocitelor *in vitro*. Keratinocitele cultivate în mediu cu ioni de calciu 1,2 mM sintetizează involucrina și transglutaminaza înainte de a fi confluențe, fiind capabile la confluență să formeze învelișul cornificat. Modelul experimental stabilit pentru evaluarea diferențierii epidermale a constatat în stabilirea unor serii cultivate în mediu cu concentrații diferite de calciu, după cum urmează: Seria A: mediu fără calciu (DMEM fără calciu și magneziu; Gibco 21068-028, suplimentat cu 1 mM piruvat de Na, 4 mM glutamină, 10% SFB și 1% antibiotic / antimicotic); Seria B: mediu fără calciu (DMEM fără calciu și magneziu; Gibco 21068-028, suplimentat cu 1 mM piruvat de Na, 4 mM glutamină, 10% SFB și 1% antibiotic / antimicotic) + clorură de calciu până la 12 mg Ca²⁺.

Testele au fost efectuate pe probe din PLLA printate 3D (Fig. 1.a), care au fost încărcate cu PVP/MgB₂/adaosuri (Fig. 1.b) prin metoda descrisă și aplicată în cazul foliilor de plastic (v. paragraful 3.a). Compozițiile testate sunt:

3D1= PVP+MgB₂+cheratină (alcool etilic 24 ml + PVP 0,4 g + MgB₂ 0,2 g + cheratină 0,6 g)

3D2= PVP+MgB₂+chitină (alcool etilic 24 ml + PVP 0,4 g + MgB₂ 0,2 g + chitină 1 g)

3D3= PVP+MgB₂ (alcool etilic 24 ml + PVP 0,4 g + MgB₂ 0,2 g)

3D4= PVP+MgB₂ + chitină + albăstrele + trei frați pătați (alcool etilic 24 ml + PVP 0,4 g + MgB₂ 0,2 g + chitină 1 g + albăstrele 0,08 g + trei frați pătați 0,2 g)

3D5= PVP+MgB₂+ cheratină + albăstrele + trei frați pătați (alcool etilic 24 ml + PVP 0,4 g + MgB₂ 0,2 g + cheratină 0,6 g + albăstrele 0,08 g + trei frați pătați 0,2 g)

Celulele, împreună cu mediul de cultură care a fost în contact direct cu suporturile 3D mai sus menționate, au fost incubate timp de 6 zile după declanșarea diferențierii, apoi marcate și analizate. Marcarea se realizează cu anticorpi specifici (anticorp pentru citokeratină 5/14 conjugat cu PE, anticorp primar pentru involucrină cuplat cu anticorp secundar conjugat FITC, anticorp primar pentru transglutaminaza-1 cuplat cu anticorp secundar conjugat PE), iar analiza histogramelor de fluorescență s-a făcut prin citometrie în flux. În paralel, s-a realizat și analiza dinamicii ciclului celular, ca procent de celule în faza S și G2/M de diviziune mitotică (kit DNA cell Cycle – BD Pharmingen). Rezultatele sunt prezentate în tabelele 1 și 2.

Tabelul 1. Procentul de acumulare în fazele mitotice ale diviziunii celulare (%S+%G2/M).

Diferențiere 7 zile	Secvențialitatea ciclului celular – mediu fara Ca ²⁺				Secvențialitatea ciclului celular – mediu + Ca ²⁺ (12 mg/ml)			
	% Go/G1	% S	% G2/M	%S+ %G2/M	% Go/G1	% S	% G2/M	%S+ %G2/M
Martor	91,87	1,4	6,73	8,13	79,39	10,48	10,13	20,61
3D1	61,14	34,79	4,07	38,86	61,57	29,53	8,9	38,43
3D2	38,82	35,19	25,99	61,18	39,84	31,26	28,9	60,16
3D3	57,69	36,32	5,79	42,31	55,58	37,08	7,34	44,42
3D4	58,18	33,17	8,66	41,83	57,93	35,65	6,42	42,07
3D5	53,4	38,86	7,75	46,61	55,34	37,93	6,72	44,65
Cheratina 0,25 mg/ml + extract Viola tricolor 0,033%+ extract Centaurea cyanus 0,033%	82,61	9,03	8,36	17,39	71,79	19,36	8,85	28,21
Chitina 9 μg/ml + extract Viola tricolor 0,033% + extract Centaurea cyanus 0,033%	65,07	25,68	9,25	34,93	60,47	32,13	7,4	39,53

Tabelul 2. Supraexpresia markerilor de diferențiere epidermală în condiții de creștere în medii cu și fără calciu ca factor stimulant

7 zile diferențiere	Involucrina (strat Corneum) - Alexa Fluor 647 - APC-Cy7		Transglutaminase 1 (strat spinos) - FITC		Cytokeratine 5/14 (strat bazal) - PE	
	- Ca ²⁺	+ Ca ²⁺ (12 mg/ml)	- Ca ²⁺	+ Ca ²⁺ (12 mg/ml)	- Ca ²⁺	+ Ca ²⁺ (12 mg/ml)
Martor	737	1047	1331	999	1844	1110
3D1	1182	1458	1244	1189	1597	1538
3D2	6706	2859	2266	1654	3424	2098
3D3	1242	1406	1513	1430	2388	2192
3D4	1052	1213	1279	1427	1874	2068
3D5	1977	1678	4358	3437	7181	5489
Cheratina 0,25 mg/ml + extract Viola tricolor 0,033% + extract Centaurea cyanus 0,033%	1536	1501	1301	1250	1669	1647
Chitina 9 μg/ml + extract Viola tricolor 0,033% + extract Centaurea cyanus 0,033%	1481	2186	1292	1260	1947	1839

Notă! Marcajul celulelor de tabel cu gri reprezintă efect biologic pozitiv în susținerea mecanismului de acțiune.

Extractele de albăstrele și trei frați pătași aduc un aport considerabil în stimularea proceselor de diviziune (amplificarea fazelor mitotice), atât în condiții de dezvoltare restrictive (mediu de cultură fără calciu), cât și stimulative pentru procesul de diferențiere (mediu de cultură cu supliment de calciu, 12 mg/ml). Efectele sunt remarcabile **doar în condițiile încorporării în matricea suport**, în asocieră cu chitină/cheratină, borură de magneziu și polimer stabilizant PVP. De asemenea, corelat cu turn-over-ul celular, se remarcă amplificarea diferențierii keratinocitare, în special în stratul bazal, evenimente corelative ce restabilesc regenerarea epidermală și accelerează vindecarea cutanată.

c) Evidențierea efectelor de regenerare dermică, stimularea sintezei de colagen în culturi de fibroblaști dermici normali, HS27

S-a evaluat colagenul secretat ca factor implicat în reconstrucția matricei extracelulare prin determinarea hidroxiprolinei rezultate în urma hidrolizei. Metoda constă în determinarea colorimetrică a hidroxiprolinei, după hidroliza totală a lanțurilor polipeptidice. Hidroxiprolina eliberată prin hidroliză este oxidată la pirol cu cloramina B, iar pirolul formează cu p-dimetilaminobenzaldehida un cromofor cu maxim de absorbție în domeniul 555-560 nm. Determinarea colorimetrică a hidroxiprolinei s-a făcut după metoda Woessner, modificată astfel: probele s-au hidrolizat în acid clorhidric 37%, la 120 °C, timp de 7 ore. Proba hidrolizată se supune reacției de oxidare și apoi de colorare cu o soluție de cloramină T, respectiv p-DMAB. După răcire s-a citit absorbanta probelor la 550 nm. Cantitatea de colagen s-a determinat pe baza unui coeficient de corelație: 1 mg de colagen conține, în medie, 0,122 mg hidroxiprolină, valorile acesteia fiind extrapolate din curba de calibrare față de standard.

Studiul s-a realizat în două condiții de stimulare pro-inflamatorie, în vederea simulării *in vitro* a condițiilor patologice determinate de arsuri, răni cronice sau cu vindecare dificilă:

1. **TNF α 5 ng/ml, 72 h**, doză mică/timp lung de acțiune, inflamație sistemică cronicizată;

2. **TNF α 15 ng/ml + PMA 0,1 μ M, 24 h**, inflamație acută, asociată cu stres oxidativ pronunțat (de exemplu, arsuri, plăgi severe la debut).

În cazul celulelor tratate timp de 72 h cu substanțele de testat în prezența stimulilor proinflamatori, se observă un efect marcant (creștere 71%) asupra colagenului dozat la nivel intracelular doar pentru sistemul 3D2, având în componență MgB₂ și chitină (eficient pentru aplicații în răni cronice sau cu vindecare dificilă). În cazul fibroblaștilor stimulați cu **TNF α +PMA (inflamație acută, însoțită de stres oxidativ major) și tratați cu principii active imobilizate în suporturi tip 3D3 și 3D4**, cantitatea de colagen extracelular crește cu **28%, respectiv 35%**. Astfel, s-a demonstrat efectul superior și sinergic al compușilor bioactivi înglobați în matricea polimerică prin stimularea formării colagenului în mediul extracelular, ca prim-eveniment al consolidării structurilor suport, fibrile și fibre proteice, și regenerare a dermului. Rezultatele direcționează aplicabilitatea către terapia plăgilor cronice, respectiv tratament de primă urgență în lezarea țesutului cutanat.

Prezentarea în detaliu a cel puțin unui mod de realizare a invenției cu referire la figuri

Sistemul poros (Fig. 1-3) funcționalizat este obținut prin printare 3D (fabricare aditivă), folosind filament de PLLA, material acceptat ca fiind biocompatibil. Porii au formă cuboidală și sunt obținuți prin printarea unor rețele suprapuse de linii de o anumită grosime, în funcție de rezoluția imprimantei (de exemplu, 0,2/0,3/0,4/0,5 mm). Se pot obține și grosimi de straturi mai mari de 0,5 mm, în funcție de tipul de filament (simplu sau compozit) sau de rezoluția/viteza de printare dorită (schimbând duza de extrudare, de diametre diferite). Dacă se dorește, se pot obține și rezoluții mai mari pe imprimante DLP sau SLA, dar se va ține cont că o dimensiune foarte mică a porilor poate face dificilă încărcarea cu substanță activă. În funcție de dimensiunea porilor se poate controla eliberarea în timp a substanțelor active, precum și cantitatea de substanță înglobată (aici porii au rol de rezervor). Forma finală a ortezei se obține prin termoformare în apă la temperaturi de 60-70 °C pentru PLA sau PLLA.

Substanța de bază pentru încărcare este PVP+MgB₂ (Fig. 4), la care se adaugă și alte substanțe care acționează sinergic (chitină, cheratină, extrase de trei frați pătați, albăstrele ș.a.; Fig. 5). Concentrația amestecului de încărcare se alege astfel încât să nu se depășească limita toxică, dar în același timp să fie eficientă din punct de vedere antibacterian, efect asigurat de pulberea de MgB₂.

Suprafața interioară a ortezei va fi în contact cu tegumentul, deci se urmărește ca substanța activă să fie prezentă pe această parte. Porii creează și un efect de capilaritate, înglobând cu ușurință amestecul lichid.

Grosimea ortezei se poate stabili între 3-7 mm, în funcție de rigiditatea și rezistența mecanică necesară. Orteza din figura 3 are o grosime de 5 mm. Forma ei inițială (plană) este proiectată în funcție de grosimea membrului pe care se aplică și de lungimea care se dorește acoperită. Părțile importante

ale ortezei sunt (Fig. 3.a): (1) element opțional de prindere cu curea sau bandă cu arici pentru o fixare fermă, (2) orificiul mare pentru police, (3) structura poroasă pentru încărcare cu substanță activă și (4) orificii suplimentare opționale, care permit reducerea greutateii ortezei, ventilarea naturală a tegumentului sau/și cu rol decorativ.

Modul în care invenția este susceptibilă de a fi aplicată industrial

Sistemul poros încărcat cu substanțe active poate fi utilizat în ortopedie pentru imobilizarea articulațiilor sau fracturilor, atât la nivelul membrelor inferioare, cât și la nivelul celor superioare sau în alte zone ale corpului (de exemplu, de tip corset la nivelul trunchiului).

Sistemul este gândit să fie dublat de un rol funcțional antibacterian și de accelerare a vindecării unor plăgi sau arsuri, porii permițând înglobarea de substanțe active, medicamentoase, dar permit și o bună ventilare a pielii.



Revendicări

1. **Structuri ortetice poroase caracterizate prin aceea că** porii distribuiți uniform/regulat sunt proiectați geometric în diverse forme (cuboidă, paralelipipedică, giroidă, sferică etc) și dimensiuni (micronice sau milimetrice).

2. **Structuri ortetice poroase, conform revendicării 1, caracterizate prin aceea că** pot fi printate 3D din polimeri biocompatibili (PLA, PLLA, PMMA, POM, PEEK, TPU etc) sau cu pori obținuți neuniformi, distribuiți neregulat, obținuți prin tratamente ulterioare (sablare, atac chimic, amestec de polimer insolubil cu polimer solubil, amestec cu substanțe volatile etc).

3. **Structuri ortetice poroase, conform revendicării 1, caracterizate prin aceea că sunt** formate din corpul principal cu structură poroasă, orificii pentru membre/degete, orificii pentru ventilare (care pot avea și forme decorative), orificii pentru prindere suplimentară cu benzi cu arici sau curea.

4. **Structuri ortetice poroase, conform revendicării 1, caracterizate prin aceea că** porii dispozitivului sunt încărcăți pentru funcționalizare cu amestecuri active antibacteriene, paliative sau de accelerare a vindecării. Amestecurile sunt extracte vegetale cu conținut de polifenoli, flavone, poliacetilene (de exemplu, trei frați pătați, albăstrele, brusture ș.a.), fragmente polipeptidice provenind din structuri macromoleculare de chitină și/sau cheratină, respectiv diborură de magneziu (MgB_2), în oricare raport de asociere sau doză activă stabilită experimental.



Prezentarea pe scurt a figurilor

Se prezintă mai jos exemple grafice pentru ilustrarea invenției (Figurile 1 - 5).

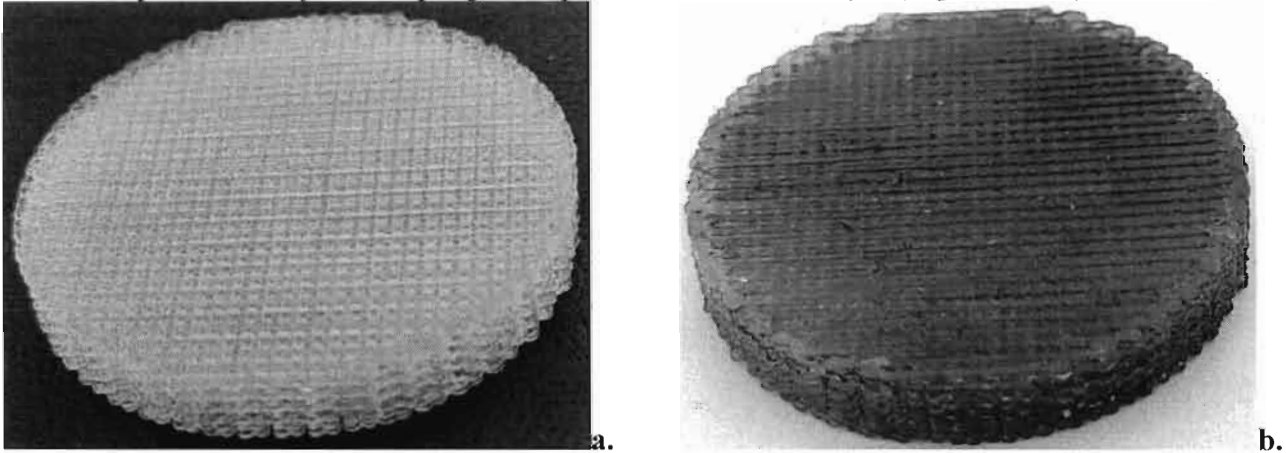


Figura 1. a. Model de material polimeric suport proiectat cu pori cuboizi și printat 3D, înainte de încărcare. **b.** Model poros încărcat cu amestecul activ.

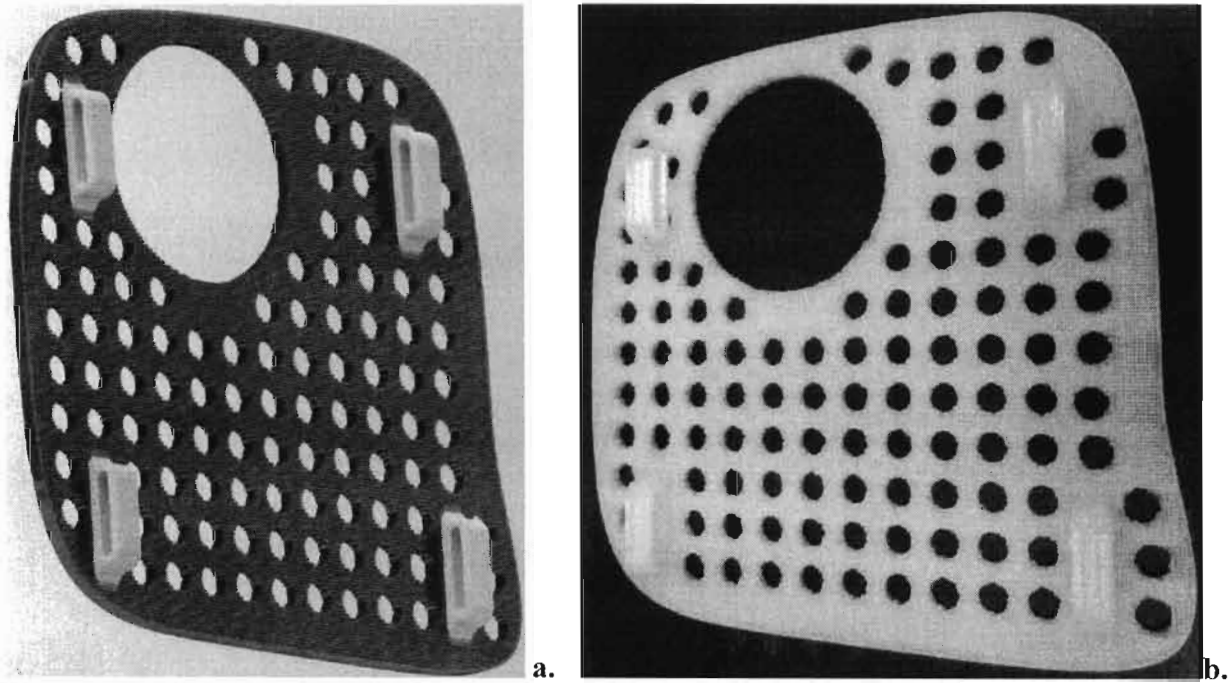


Figura 2. Orteză proiectată 3D (**a**) și printată 3D (**b**) înainte de termoformare și funcționalizare, cu pori care permit încărcarea cu substanță activă.

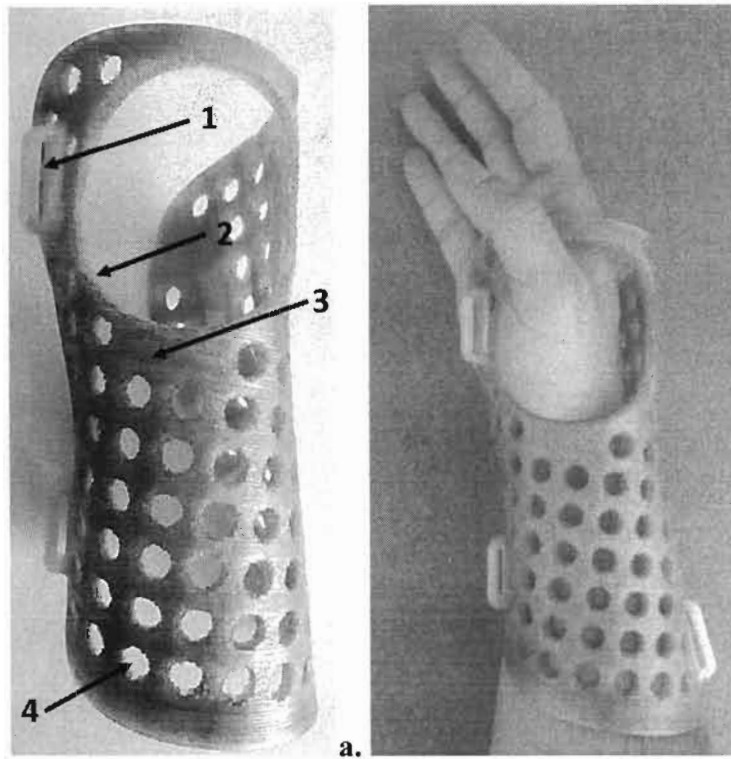


Figura 3. Orteză printată 3D, cu pori, termoformată și funcționalizată (a) și fixată pe mână (b).

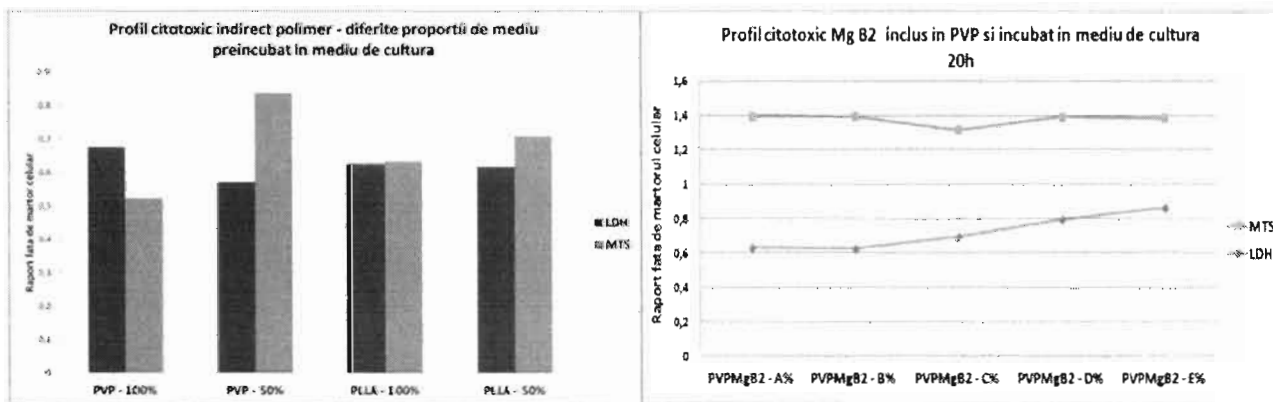


Figura 4. Profil de biocompatibilitate la nivel epidermal a suporturilor polimerice (vezi Fig. 1) încărcăți cu PVP/MgB₂.

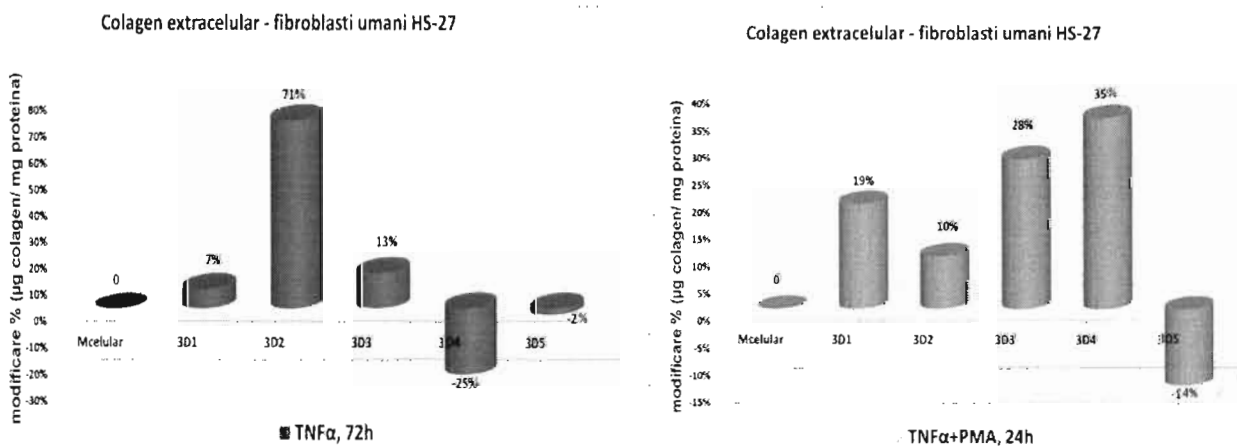


Figura 5. Efectul principiilor active integrate în matricea 3D asupra colagenului extracelular solubil sintetizat de fibroblaștii dermici umani (linia HS27).