



MD 2856 G2 2005.09.30

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **2856** ⁽¹³⁾ **G2**
(51) Int. Cl.: *A61K 35/32* (2006.01)
A61K 35/14 (2006.01)
A61K 35/16 (2006.01)
A61K 36/05 (2006.01)
A61F 2/28 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE**

| | |
|---|---|
| <p>(21) Nr. depozit: a 2005 0092 (22) Data depozit: 2005.03.29</p> | <p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2005.09.30, BOPI nr. 9/2005</p> |
| <p>(71) Solicitant: FALA Valeriu, MD (72) Inventatori: FALA Valeriu, MD; BURLACU Valeriu, MD; GLIGOR Călin, MD; FALA Valentina, MD (73) Titular: FALA Valeriu, MD</p> | |

(54) Material pentru osteoplastie (variante)

(57) Rezumat:

1
Invenția se referă la medicină, și anume la materiale pentru restabilirea oaselor și poate fi aplicată pentru chirurgia osteoreparatorie în stomatologie, precum și în traumatologie-ortopedie.

Esența invenției constă în aceea că materialul pentru restabilirea oaselor include următoarele componente, % mas.: 99,0...99,9 material osteogen și extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* 0,1...1,0. Materialul osteogen este selectat din grupa aloimplanturilor osului liofilizat demineralizat, aloimplanturilor osului liofilizat, osului xenogen, alogen și autogen, hidroxilapatit, material

2
5 de colagen-hidroxilapatit. În calitate de tulpină a cianobacteriei *Spirulina platensis* poate fi utilizată tulpina CNM-CB-02. În plus, materialul poate conține factorul de creștere selectat din grupa constituită din factorul de creștere trombocitar (PDGF), factorul de creștere transformator β1 (TGF- β1) și proteinele izolate din os, precum și combinațiile lor.

10
15 Revendicări: 7

MD 2856 G2 2005.09.30

Descriere:

Invenția se referă la medicină, și anume la materiale pentru restabilirea oaselor și poate fi aplicată pentru chirurgia osteoreparatorie în stomatologie, traumatologie și ortopedie.

5 Este cunoscută utilizarea țesutului osos cadaveric liofilizat pentru umplerea defectelor osului [1]. Dezavantajele materialului din osul cadaveric constituie omogenitatea implantului și durata biodistrucției lui, ceea ce împiedică formarea osului propriu, care va avea loc doar în procesul resorbției transplantului; absența activității fiziologice și a proprietăților antimicrobiene.

10 Este cunoscut, de asemenea, un procedeu de obținere a implanturilor osoase [2]. Aceste implanturi în scopul asigurării penetrării organice în ele a țesuturilor osoase se obțin prin flambarea fragmentului diafizei osului tubular cu umplerea ulterioară a canalelor și traiectelor cu adeziv cianoacrilic resorbabil bioinert. Însă, aceste implanturi posedă rezistență mecanică joasă. Mai mult decât atât, densitatea țesutului osos în stratul cortical cu un număr neînsemnat de perforații, durata resorbției atât a matricei osoase cât și a cianoacrilatului, precum și lipsa componentelor bioactive în implant târâgănează considerabil procesele de revascularizare a lui și de substituire cu țesutul osos complet propriu.

15 Mai este cunoscută o compoziție pentru stimularea regenerării țesuturilor osoase [3].

20 Aplicarea acestei compoziții asigură accelerarea regenerării țesutului osos datorită conținutului în matricea polimerică a țesuturilor fetale liofilizate, substanțelor medicamentoase, capabile să regenereze țesuturile, și a substanțelor ce conțin calciu fixat. A fost obținut un efect curativ bun la umplerea cavitațiilor osoase mici. Cu toate acestea, cantitatea calciului fixat în compoziție este insuficientă pentru tratamentul defectelor osoase vaste. Materialul propus practic nu posedă formă, are caracteristici rezistente joase și nu poate în caz de necesitate să fixeze poziția fragmentelor osoase la corecția operativă. Mai mult decât atât, materialul propus nu posedă acțiuni imunostimulatoare locală, moment care este foarte important la operațiile reparatorii în stomatologie.

25 Este cunoscut, de asemenea, un material pentru substituirea osului, utilizat în chirurgia osteoreparatorie în traumatologie și ortopedie [4], care constă din țesut osos spongios liofilizat, prelucrat și degresat, cu dimensiunile porilor de 0,05...5,00 mm, pe suprafața căruia se aplică o compoziție din copolimer biocompatibil și substanțe fiziologic active în următorul raport al componentelor, % mas.: copolimer biocompatibil de vinilpirolidonă cu acrilate 50...99, substanțe fiziologic active 1...50, totodată raportul dintre țesutul osos spongios și compoziția fiziologic activă polimerică constituie, % mas.: țesut osos 60,0...99,3, compoziție fiziologic activă polimerică 0,7...40,0.

30 Dezavantajul materialului cunoscut constă în aceea că în calitate de substanțe fiziologic active se aplică preparate antimicrobiene: gentamicină, dioxidină, cefamizină, care inhibă imunitatea locală și frânează procesele regenerative. În plus, materialul nu posedă acțiuni antivirală și antimicotică. Aceste materiale pot servi ca bază pentru dezvoltarea complicațiilor inflamatorii în perioada postoperatorie.

35 Problema pe care o rezolvă invenția revendicată constă în crearea unui material ce stimulează imunitatea locală, cu activitate regeneratoare, antivirală și antimicrobiană înaltă.

40 Problema preconizată se soluționează prin aceea că materialul pentru restabilirea oaselor include următoarele componente, % mas.: 99,0...99,9 de material osteogen și 0,1...1,0 de extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*. Materialul osteogen este selectat din grupa aloimplanturilor osului liofilizat demineralizat, aloimplanturilor osului liofilizat, osului xenogen, alogen și autogen, hidroxilapatit, material de colagen-hidroxilapatit. În calitate de tulpină a cianobacteriei *Spirulina platensis* poate fi utilizată tulpina CNM-CB-02. Suplimentar, materialul poate conține factorul de creștere selectat din grupa constituită din factorul de creștere trombocitar (PDGF), factorul de creștere transformator $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) și proteinele izolate din os, precum și combinațiile lor. În acest caz materialul pentru osteoplastie conține, în % mas.: material osteogen 45 98,5...99,8, extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* 0,1...1,0, factorul de creștere 0,01...0,50.

50 Pentru restabilirea țesutului osos în practica medicală se folosesc diferite materiale osteogene de origine artificială sau naturală. La acestea se referă cele autogene (donor este însuși pacientul), alogene (donor este o altă persoană), xenogene (donor este un animal, cu excepția omului), aloplastice (sintetice, inclusiv cele obținute din minerale naturale, corali). Toate materialele au indicațiile și contraindicațiile proprii pentru aplicare. Pentru a extinde indicațiile lor de aplicare este necesar ca ele să posede capacitatea de a induce pronunțat osteogeneza, de a stimula imunitatea locală și de a fi rezistente la acțiunea florei patogene și a fenomenelor inflamatorii. Pentru realizarea cerințelor date s-a propus de a adăuga la materialul osteogen de orice origine extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*. S-a dovedit că extractul din biomasa 55 *Spirulinei platensis* în compoziția materialului osteogen nu numai că favorizează ridicarea imunității nespecifice, ameliorarea imunității celulare locale, asigură activitatea antivirală și antimicrobiană a materialului, ci și accelerează considerabil procesele osteoregeneratoare, contribuie la resorbția materialului concomitent cu substituirea lui cu osul propriu. Probabil, aceasta are legătură cu stimularea osteoblastelor și preosteoblastelor, precum și a celulelor tronculare dispersate uniform în țesutul osos.

O astfel de stimulare a osteoblastelor, preosteoblastelor, precum și a celulelor tronculare se intensifică vizibil la adăugarea în materialul osteogen a substanțelor fiziologic active, cum ar fi factorul de creștere ales din grupa constituită din factorul de creștere trombocitar (PDGF), factorul de creștere transformator $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) și proteinele izolate din os, precum și combinațiile lor (descrise în cererea US 2004019132). Proteina morfogenetică osoasă (PMO) constituie unul din reprezentanții acestei grupe, totodată există 13 feluri de diverse proteine morfogenetice osoase. Datorită PMO procesele de sinteză și resorbție a țesutului osos sunt strâns legate între ele. Această proteină stimulează mitoză și diferențierea celulelor tronculare, care se învecinează cu zona resorbției, în osteoblastele funcționabile, ce secretă matricea osoasă.

5 Utilizarea extractului din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* în combinație cu substanțele fiziologic active conduce la accelerarea formării osului și la sporirea densității lui.

10 Interacțiunea componentelor sus-menționate în materialul revendicat pentru osteogenează a permis obținerea unui efect sinergic, ce asigură accelerarea considerabilă a regenerării țesutului osos în regiunea intervenției chirurgicale datorită stimulării osteoblastelor, preosteoblastelor, precum și a celulelor tronculare, intensificării imunității nespecifice, ameliorării troficii țesuturilor, intensificării efectului antiviral și antimicrobian în lipsa oricăror efecte secundare negative.

15 Rezultatul invenției constă în stimularea osteoblastelor, preosteoblastelor, celulelor tronculare, precum și a celulelor imunocompetente responsabile de imunitatea umorală și celulară.

Invenția se realizează în felul următor. Se ia materialul osteogen. De exemplu, se confecționează un alotransplant osos. Preliminar, se efectuează separarea mecanică minuțioasă a alotransplantului inițial din os spongios de țesuturile moi. Apoi în scopul eliminării elementelor sângelui, ultimul se amplacează într-o soluție de peroxid de hidrogen de 3%. Ulterior se scufundă în soluție de amestec de cloroform cu alcool etilic de 96% (1:1) pentru eliminarea componentului lipidic pentru 3...5 zile în dependență de dimensiunile modelului. Activitatea soluției va fi menținută prin schimbul zilnic al acesteia. Va urma uscarea osului la aer și congelarea lui până la -30°. În procesul demineralizării și degresării osului se eliberează matricea de colagen și proteinele inductive (în particular, proteina morfogenetică osoasă (PMO)), care induce osteogeneza. Apoi transplantul se impregnează cu extract din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* din calculul 0,1...1,0 g de substanța uscată la 100 g de material osteogen. După aceasta se efectuează liofilizarea timp de 24 de ore. Executarea materialului pentru osteoplastie se finisează cu ambalarea implanturilor în pachete din masă plastică și sterilizarea lor în fluxul de electroni rapizi cu doza de absorbție de 20+5 kGy (kiloGray). Extractul uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* poate fi adăugat în condiții sterile la materialele deja preparate pentru substituirea osului din raportul 0,1...1,0 g de extract la 100 g de material osteogen. După amestecarea componentelor materialul obținut trebuie reamestecat minuțios. În caz de necesitate înainte de amestecarea componentelor în materialul osteogen se adaugă substanțe fiziologic active: factorul de creștere trombocitar (PDGF), factorul de creștere transformator $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) și proteinele izolate din os, precum și combinația lor.

20 În timpul efectuării intervenției chirurgicale materialul obținut se transplantează în regiunea defectului. Celulele cu receptori la factorii de creștere, celulele tronculare în special, se află în spațiul perivascular, după cum presupun și alți autori. În interiorul osului aceste celule sunt reprezentate de osteoblaste. În preosteoblaste, care, după cum se știe sunt activate de PDGF și TGF- fine, celulele tronculare sunt uniform dispersate în măduva osoasă. Materialul pentru transplantare, de exemplu osul spongios, se amplacează în defectul osos la sinuslifting sau la defectul vast al maxilarului inferior, sau la oricare alt defect, umplut cu cheag de sânge. Regiunea defectului de plagă se caracterizează prin presiunea joasă a oxigenului ($pO_2=5...10$ mm Hg), acidoză (pH=4...6) și conține trombocite, leucocite, eritrocite, fibrină, precum și osteocite, osteoblaste și celule tronculare, care migrează în cheagul de sânge din țesutul osos adiacent. Celulele tronculare constituie sursa de regenerare, cu toate acestea ele sunt într-o concentrație foarte mică (la o persoană de 50 de ani aproximativ 1 celula tronculară la 400 mii de celule diferențiate). Regenerarea osoasă se începe din momentul acțiunii PDGF și TGF- $\beta 1$ asupra osteoblastelor, preosteoblastelor și celulelor tronculare. PDGF și TGF- $\beta 1$ deja sunt în materialul osteogen propus, și se eliberează în timpul degranulării trombocitelor. PDGF stimulează mitoză celulelor tronculare și a osteoblastelor, care se află în regiunea grefei osoase, sporind numărul lor cu câteva ordine. De asemenea, el stimulează angiogeneza (infiltrarea vaselor în regiunea intervenției) datorită stimulării mitozei endoteliului vaselor. TGF- $\beta 1$ activează fibroblastele, stimulează mitoză și diferențierea predecesorilor osteoblastelor. Secreția continuă a TGF- $\beta 1$ stimulează sinteza matricei osoase de către osteoblaste și a matricei colagene de către fibroblaste, grație căreia se creează suportul pentru vasele infiltrate. Substanțele biologice active, conținute în extractul biomasei cianobacteriei *Spirulina platensis*, contribuie esențial la sporirea activității celulare și stimulează toate procesele sus-menționate, favorizând resorbția rapidă a materialului osos cu substituirea lui cu osul propriu. Vasele infiltrate pot fi depistate în regiunea intervenției deja la a 3-a zi, iar vascularizarea completă se produce la 12...15 zile. Perioada influenței nemijlocite a factorilor de creștere asupra regenerării constituie 5 zile. Menținerea activității regenerării mai sus de acest termen se asigură prin două mecanisme. Primul – transformarea celulelor tronculare în osteoblaste, care singure sintetizează TGF- $\beta 1$. Al doilea, mult mai puternic – chemotaxia în regiunea intervenției macrofagilor în timpul substituiri lor cu trombocitele, ca sursă a factorilor de creștere. În a treia zi, anume microfagii devin sursa principală a factorilor de creștere. Chemoattractant pentru macrofagi este PDGF. Mai mult decât atât, ei

se deplasează pe gradientul de presiune al oxigenului mai mult de 20 mm Hg. Presiunea oxigenului în țesuturile sănătoase constituie 45...55 mm Hg, iar în regiunea intervenției doar 5...10 mm Hg. Astfel, gradientul de presiune al oxigenului dintre regiunea intervenției și țesuturile adiacente constituie 30...40 mm Hg. Pe măsură ce influența PDGF se reduce, influența factorilor de creștere macrofagici și a factorilor de creștere a vaselor sporește. Totuși, acțiunea factorilor de creștere macrofagici și a factorilor de creștere a vaselor poate fi identică cu PDGF, doar că ei se utilizează nu prin trombocite, ci prin macrofagi. Celulele tronculare sintetizează TGF- β 1 și stimulează astfel activitatea sa proprie. Peste 4 săptămâni regiunea intervenției se dovedește a fi revascularizată complet, iar gradientul de presiune al oxigenului, necesar pentru menținerea activității macrofagilor, dispare. Macrofagii părăsesc această regiune, deoarece osul, deși nematur încă, singur poate menține procesul continuu de regenerare. Astfel, a fost demonstrat că amestecarea extractului uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* și a factorilor de creștere cu materialul osos permite de a obține un rezultat cantitativ și calitativ. Formarea osului matur cu sistemul canalelor Havers include participarea grupei a treia de factori de creștere, și anume proteina morfogenetică osoasă. Pe măsură ce osteoblastele formează și mineralizează matricea osoasă, în ultima se depune proteina morfogenetică osoasă. Această proteină rezistentă la acizi se eliberează la resorbția osului de către osteoblaste în decursul procesului de remodelare normală a osului. Procesul dat se produce și în osul matur cu o viteză de 0,7% din volumul osului pe zi, dar în osul care se maturează în regiunea intervenției el se produce mai intensiv – de la 5 până la 8% pe zi. Datorită PMO procesele de sinteză și resorbție a țesutului osos sunt strâns legate între ele. Această proteină stimulează mitoză și diferențierea celulelor tronculare, adiacente cu sectorul resorbției, în osteoblastele funcționale, care secretă matricea osoasă.

15 Astfel, procesul de formare a osului în regiunea intervenției se finisează și trece într-un ciclu de resorbție și remodelare a osului matur care se menține de la sine.

Exemple de realizare a invenției.

25 A fost experimentat materialul revendicat la 15 iepuri, care au fost divizați în 3 grupe:

a) de control (5 iep.);

b) prima experimentală (5 iep.) cu material osteogen și extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*;

c) a doua experimentală (5 iep.) cu material osteogen, extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* și substanțe fiziologic active.

30 A fost efectuată operația de augmentare în regiunea corpului maxilarului inferior.

La grupa de control operația a fost efectuată cu utilizarea țesutului osos spongios degresat și liofilizat tratat (Bio-OSS) cu adăugarea masei trombocitare.

La prima grupă experimentală operația a fost efectuată cu utilizarea țesutului osos spongios degresat și liofilizat tratat (Bio-OSS) cu adăugarea extractului uscat din biomasa *Spirulinei platensis* 0,1...1,0%.

35 La a doua grupă experimentală operația a fost efectuată cu utilizarea țesutului osos spongios degresat și liofilizat tratat (Bio-OSS) cu adăugarea extractului uscat din biomasa *Spirulinei platensis* 0,1...1,0% și a substanțelor fiziologic active 0,01...0,50%.

La prima grupă experimentală defectul țesutului osos la primul iepure a fost substituit cu materialul osteogen propus cu conținut de extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* egal cu 0,1%. La al doilea iepure defectul țesutului osos a fost substituit cu materialul osteogen propus cu un conținut de extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* egal cu 0,3%, iar la al treilea – cu un conținut de extract din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* egal cu 0,6%. Defectul țesutului osos la al patrulea iepure a fost substituit cu materialul osteogen propus cu un conținut de extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* egal cu 0,8%, iar la al cincilea iepure – cu un conținut de extract din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* egal cu 1,0%.

45 La a doua grupă experimentală s-a procedat ca și la prima grupă experimentală, dar cu adăugarea substanțelor fiziologic active.

La această grupă experimentală defectul țesutului osos la primul iepure a fost substituit cu materialul osteogen propus cu un conținut de extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* egal cu 0,1% și de substanțe fiziologic active egal cu 0,01% . La al doilea iepure defectul țesutului osos a fost substituit cu materialul osteogen propus cu un conținut de extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* egal cu 0,4% și de substanțe fiziologic active egal cu 0,08%, iar la al treilea – cu un conținut de extract din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* egal cu 0,6% și de substanțe fiziologic active egal cu 0,15%. Defectul țesutului osos la al patrulea iepure a fost substituit cu materialul osteogen propus cu un conținut de extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* egal cu 0,8% și de substanțe fiziologic active egal cu 0,3%, iar la al cincilea iepure – cu un conținut de extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* egal cu 1,0 % și de substanțe fiziologic active egal cu 0,5%.

55 Experimentele au fost efectuate în scopul depistării acțiunii extractului uscat din biomasa *Spirulinei platensis* 0,1...1,0% pentru prevenirea complicațiilor apărute în perioada postoperatorie.

60 În grupa de control complicații au apărut la 2 iepuri și vindecarea plăgii postoperatorii s-a produs într-un termen mai îndelungat.

MD 2856 G2 2005.09.30

6

S-a observat că în prima grupă experimentală vindecarea plăgii postoperatorii s-a produs mai rapid cu 1...2 zile, practic, fără complicații.

În a doua grupă experimentală vindecarea s-a produs mai rapid cu 2...3 zile, fără complicații.

5

(57) Revendicări:

1. Material pentru osteoplastie pe baza materialului osteogen, **caracterizat prin aceea că** suplimentar include extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* în următorul raport al componentelor, % mas.:

| | |
|---|-------------|
| material osteogen | 99,0...99,9 |
| extract uscat din biomasa cianobacteriei <i>Spirulina platensis</i> | 0,1...1,0. |

2. Material, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** materialul osteogen este selectat din grupa aloimplanturilor osului liofilizat demineralizat, aloimplanturilor osului liofilizat, osului xenogen, alogen și autogen, hidroxilapatit, material de colagen-hidroxilapatit.

3. Material, conform revendicării 1, **caracterizat prin aceea că** în calitate de tulpină a cianobacteriei *Spirulina platensis* se folosește tulpina CNM-CB-02.

4. Material pentru osteoplastie pe baza materialului osteogen ce include un factor de creștere, **caracterizat prin aceea că** suplimentar include extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* în următorul raport al componentelor, % mas.:

| | |
|---|--------------|
| material osteogen | 98,5...99,8 |
| extract uscat din biomasa cianobacteriei <i>Spirulina platensis</i> | 0,1...1,0 |
| factor de creștere | 0,01...0,50. |

5. Material, conform revendicării 4, **caracterizat prin aceea că** materialul osteogen este selectat din grupa aloimplanturilor osului liofilizat demineralizat, aloimplanturilor osului liofilizat, osului xenogen, alogen și autogen, hidroxilapatit, material de colagen-hidroxilapatit.

6. Material, conform revendicării 4, **caracterizat prin aceea că** factorul de creștere este selectat din grupa constituită din factorul de creștere trombocitar (PDGF), factorul de creștere transformator $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) și proteinele izolate din os, precum și combinația lor.

7. Material, conform revendicării 4, **caracterizat prin aceea că** în calitate de tulpină a cianobacteriei *Spirulina platensis* se folosește tulpina CNM-CB-02.

35

(56) Referințe bibliografice:

1. Кузьменко В. А., Резван А. Ф., Гуляева С. В., Лифанова Н. В. Наш опыт пластического закрытия дефектов костей черепа лиофилизированными аллотрансплантатами. Сб. тезисов. Биоимплантология на пороге XXI века, с. 82, 83
2. SU 990193 A 1983.01.23
3. RU 2146928 C2 2000.03.27
4. RU 2227073 C2 2004.04.20

Șef Secție: GUȘAN Ala

Examinator: TIMONIN Alexandr

Redactor: LOZOVANU Maria