

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.

Este cunoscută utilizarea țesutului osos cadaveric liofilizat pentru umplerea defectelor osului [1]. Cu toate acestea, dezavantajele materialului constituie omogenitatea implantului și durata biodistrucției lui, ceea ce după cum se știe împiedică formarea osului propriu, care va avea loc doar în procesul resorbției transplantului; absența activității fiziologice și a proprietăților antimicrobiene.

Este cunoscut de asemenea procedeul de obținere a implanturilor osoase [2]. Aceste implanturi în scopul asigurării penetrării organice în ele a țesuturilor osoase se obțineau prin flambarea fragmentului diafizei osului tubular cu umplerea ulterioară a canalelor și tracturilor cu adeziv cianacrilic resorbabil bioinert. Cu toate acestea, implanturile de acest fel 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 cianacrilatului, precum și lipsa componentelor bioactive în implant târăgănează considerabil procesele de revascularizare a lui și de substituie cu țesutul osos complet propriu.

Este cunoscută de asemenea o compoziție pentru stimularea regenerării țesuturilor osoase [3]. Aplicarea acestui material de compoziție asigură accelerarea regenerării țesutului osos datorită conținutului în matricea polimerică a țesuturilor fetale liofilizate, a substanțelor medicinale, capabile să regenereze țesuturile și a substanțelor ce conțin calciu fixat. A fost obținut un efect curativ bun la umplerea cavitațiilor osoase mici, stimularea regenerațiilor de distracțiune. 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 acțiune imunostimulatoare locală, moment care este foarte important la operațiile reparatorii în stomatologie.

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

Dezavantajul materialului cunoscut constă în aceea că în calitate de substanțe fiziologic active se aplică preparate antimicrobiene: gentamicină, dioxidină, cefamizină, care inhibă imunitatea locală. În plus, materialul nu posedă acțiuni antivirală și antimicotică, precum și acțiune anti-inflamatoare pronunțată. Aceste materiale pot servi ca bază pentru dezvoltarea complicațiilor inflamatorii în perioada postoperatorie și nu pot fi utilizate în cazurile proceselor inflamatorii latente.

Problema pe care o rezolvă invenția revendicată constă în crearea unui material ce stimulează imunitatea locală, precum și posedă activitate regeneratoare, antivirală, anti-inflamatoare și antimicrobiană înaltă.

Problema preconizată se soluționează prin aceea că materialul pentru substituie osului include în următorul raport al componentelor, % mas.: 96,0...99,0 material osteogen, 0,1...0,5 extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* și 0,5-2,5 extract uscat de *Flores Calendule*. Materialul osteogen este ales din grupa aloimplant al osului liofilizat demineralizat, aloimplant al osului liofilizat, os xenogen, alogen și autogen, hidroxilapatit, material de collagenhidroxilapatit. În calitate de tulpină a cianobacteriei *Spirulina platensis* poate fi utilizată tulpina CNM-BB-02. În plus, materialul poate conține substanțe 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/sau proteinele izolate din os, precum și combinațiile lor.

Pentru restabilirea țesutului osos în practica medicală se folosesc diferite materiale osteogene de origine artificială sau naturală. La acestea se referă cele autogene (donorul este însuși pacientul), alogene (donorul este o altă persoană), xenogene (donorul este un animal, dar nu omul), aloplastice (sintetice, inclusiv cele obținute din minerale naturale, corali). Toate materialele au indicațiile și contraindicațiile proprii pentru aplicare. Pentru sporirea indicațiilor în aplicarea lor este necesar ca ele să posede capacitatea de a îndura 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* și extract uscat de *Flores Candule*. S-a dovedit că extractul din biomasa *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 cu substituie concomitentă a lui cu osul propriu. Probabil, aceasta are legătură cu stimularea osteoblastelor și preosteoblastelor, precum și a celulelor tronculare dispersate uniform în țesutul osos. Adăugarea extractului uscat de *Flores Calendule* la materialul osos intensifică considerabil proprietățile lui antiseptice și face vădit efectul antiedematic al extractului din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*. Acțiunea bactericidă asupra microflorei cocice (stafilococ, streptococ) o asigură carotinoidele și flavonoidele extractului de calendulă.

Stimularea 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/sau proteinele izolate din os, precum și combinația lor (descrise în brevetul US2004019132). Proteina morfogenetică osoasă (PMO) constituie una 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 mitoza și diferențierea celulelor tronculare, adiacente zonei resorbției, în osteoblastele funcționabile, ce secretă matricea osoasă.

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

Interacțiunea componentelor sus-menționate în materialul revendicat pentru osteogeneză a permis obținerea în produsul finit a unui efect sinergetic, 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. Proprietățile anti-inflamatorii și anti-edematice ale materialului osos propus permit utilizarea lui în operațiile cu proces inflamator latent.

Rezultatul invenției constă în stimularea osteoblastelor, preosteoblastelor, celulelor tronculare, precum și a celulelor imunocompetente responsabile de imunitatea umorală și celulară, precum și în atribuirea materialului osos a proprietăților anti-inflamatorii și anti-edematice.

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 amplasează într-o soluție de 3% de peroxid de hidrogen. 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 collagen și proteinele inductive (în particular, proteina morfogenetică osoasă (PMO)), care îndură osteogeneza. Apoi transplantul se impregnează cu extract din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* din calculul 0,1...0,5 g de substanța uscată la 100 g de material osteogen și cu extract de *Flores Calendule* din calculul 0,5...2,5 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* și extractul uscat de *Flores Calendule* pot fi adăugate în condiții sterile la materialele deja preparate pentru substituirea osului. După amestecarea componentelor materialul obținut trebuie reamestecat minuțios. În caz de necesitate anticipat amestecării componentelor în materialul osteogen se adaugă de asemenea substanțe fiziologic active: factorul de creștere trombocitar (PDGF), factorul de creștere transformator $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$) și/sau proteinele izolate din os, precum și combinația lor.

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 și presupun mulți autori. În interiorul osului aceste celule sunt reprezentate de osteoblaste și preosteoblaste, care, după cum se știe, sunt activate de PDGF și TGF- $\beta 1$. În fine, celulele tronculare sunt uniform dispersate în măduva osoasă. Materialul pentru transplantare, de exemplu osul spongios, se amplasează în defectul osos la *Sinus-lifting* sau la defectul vast al maxilarului inferior, sau la oricare alt defect, umplut cu cheag de sânge. Regiunea defectului de plagă se caracterizează prin tensiunea joasă a oxigenului ($pO_2=5-10$ mm Hd), 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 celulă 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- β deja sunt în materialul osteogen propus, precum și se eliberează în timpul degranulării trombocitelor. PDGF stimulează mitoza 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- β activează fibroblastele, stimulează mitoza și diferențierea predecesorilor osteoblastelor. Secreția continuă a TGF- β 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 și favorizează 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- β . Al doilea, mult mai puternic – chemotaxia în regiunea intervenției macrofagilor în timpul substituirii lor cu trombocitele, ca sursă a factorilor de creștere. A treia zi anume macrofagi devin sursa principală a factorilor de creștere. Chemoattractant pentru macrofagi este PDGF. Mai mult decât atât, ei se deplasează pe gradientul de tensiune a oxigenului mai mult de 20 mm Hd. Tensiunea oxigenului în țesuturile sănătoase constituie 45-55 mm Hd, iar în regiunea intervenției – doar 5-10 mm Hd. Astfel, gradientul de tensiune a oxigenului dintre regiunea intervenției și țesuturile adiacente constituie 30-40 mm Hd. 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 sintetizează nu prin trombocite, ci prin macrofagi. Celulele tronculare sintetizează TGF- β și stimulează, astfel, activitatea sa proprie. Peste 4 săptămâni regiunea intervenției se dovedește a fi revascularizată complet, iar gradientul de tensiune a oxigenului,

necesar pentru menținerea activității macrofagilor, dispăre. Macrofagii părăsesc această regiune, deoarece osul, deși nematur încă, singur poate menține procesul continuu de regenerare. Noi am demonstrat că amestecarea extractului uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*, a extractului uscat de *Flores Calendule* și a factorilor de creștere cu materialul osos permite de a obține un rezultat mai cantitativ și mai calitativ în comparație cu lipsa lui. 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 cursul 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.

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. Mai jos sunt date exemple de realizare a soluției tehnice propuse.

Au fost efectuate experimente ale materialului revendicat la 15 iepuri, care au fost divizați în 3 grupe:

a) de control (5 iep.)

b) experimentală (5 iep.) cu material osteogen, extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* plus extract uscat de *Flores Calendule*

c) experimentală (5 iep.) cu material osteogen, extract uscat din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis*, substanțe fiziologic active plus extract uscat de *Flores Calendule*.

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), dar cu adăugarea extractului uscat din biomasa *Spirulinei platensis* 0,1-0,5% și a extractului uscat de *Flores Calendule* 0,5-2,5%.

La a doua grupă experimentală operația a fost efectuată cu utilizarea țesutului osos spongios degresat și liofilizat tratat (Bio-OSS), dar cu adăugarea extractului uscat din biomasa *Spirulinei platensis* 0,1-0,5%, a substanțelor fiziologic active și a extractului uscat de *Flores Calendule* 0,5-2,5%.

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% și cu adăugarea extractului uscat de *Flores Calendule* 0,5%. 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 0,2% și cu adăugarea extractului uscat de *Flores Calendule* 1%. La al treilea cu un conținut de extract din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* egal cu 0,3% și cu adăugarea extractului uscat de *Flores Calendule* 1,5%. 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 0,4% și cu adăugarea extractului uscat de *Flores Calendule* 2,0%, iar la al cincilea iepure cu un conținut de extract din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* egal cu 0,5% și cu adăugarea extractului uscat de *Flores Calendule* 2,5%.

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

La această 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%, extractul uscat de *Flores Calendule* 0,5% cu adăugarea 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 0,5%, extractul uscat de *Flores Calendule* 1,0% cu adăugarea substanțe fiziologic active egal cu 0,05%. La al treilea cu un conținut de extract din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* egal cu 0,7%, extractul uscat de *Flores Calendule* 1,5% cu adăugarea 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%, extractul uscat de *Flores Calendule* 2,0% cu adăugarea substanțe fiziologic active egal cu 0,3%. La al cincilea iepure cu un conținut de extract din biomasa cianobacteriei *Spirulina platensis* egal cu 1,0% extractul uscat de *Flores Calendule* 2,5% cu adăugarea substanțe fiziologic active egal cu 0,5%.

Lucrul dat a fost efectuat în scopul depistării acțiunii extractului din biomasa *Spirulinei platensis* 0,1-1,0% pentru prevenirea complicațiilor apărute în perioada postoperatorie.

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

În a doua grupă experimentală vindecarea se produce mai rapid cu 2-3 zile și fără complicații.

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