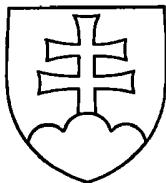


SLOVENSKÁ REPUBLIKA

(19) SK



ÚRAD
PRIEMYSELNÉHO
VLASTNÍCTVA
SLOVENSKEJ REPUBLIKY

ZVEREJNENÁ PRIHLÁŠKA VYNÁLEZU

- (22) Dátum podania prihlášky: 26.02.1999
- (31) Číslo prioritnej prihlášky: PA199800270,
60/081 551,
PA199801328
- (32) Dátum podania prioritnej prihlášky: 27.02.1998,
13.04.1998, 16.10.1998
- (33) Krajina alebo regionálna organizácia priority: DK,
US, DK
- (40) Dátum zverejnenia prihlášky: 09.04.2001
- (62) Číslo pôvodnej prihlášky v prípade
vylúčenej prihlášky:
- (86) Číslo podania medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: PCT/IB99/00337
- (87) Číslo zverejnenia medzinárodnej prihlášky
podľa PCT: WO 99/43344

(21) Číslo dokumentu:

1236-2000

(13) Druh dokumentu: A3

(51) Int. Cl.⁷:

A 61K 38/39

(71) Prihlasovateľ: BIORA BIOEX AB, Malmö, SE;

(72) Pôvodca vynálezu: Gestrelus Stina, Lund, SE;
Hammarström Lars, Djursholm, SE;
Lyngstadaas Petter, Nesoddtangen, NO;
Andersson Christer, Vellinge, SE;
Slaby Ivan, Malmö, SE;
Hammargren Tomas, Malmö, SE;

(74) Zástupca: Bušová Eva, JUDr., Bratislava, SK;

(54) Názov prihlášky vynálezu: **Prostriedky na báze proteínov matrice na hojenie rán**

(57) Anotácia:
Použitie aktívnej substancie zubnej skloviny na prípravu farmaceutických alebo kozmetických prostriedkov na hojenie rán, zlepšenie hojenia rán, reparáciu a regeneráciu mäkkých tkanív alebo na prevenciu, alebo liečbu infekcie alebo zápalu.

Prostriedky na báze proteínov matrice na hojenie rán .

Oblasť techniky

Predkladaný vynález sa týka použitia matrice zubnej skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny a/alebo proteínov matrice zubnej skloviny ako terapeutických alebo profylaktických činidiel. Substancie sú aktívne ako činidlá zlepšujúce hojenie rán, ako antibakteriálne a/alebo protizápalové činidlá.

Doterajší stav techniky

Proteíny matrice zubnej skloviny sú dobre známe ako prekurzory zubnej skloviny. V patentovej literatúre bolo opísané, že proteíny zubnej skloviny a deriváty matrice zubnej skloviny indukujú tvorbu tvrdých tkanív (tzn. tvorbu zubnej skloviny, U.S. patent č. 4672032 (Slavkin)) alebo väzbu tvrdých tkanív (EP-B-0337967 a EP-B-0263086). Predchádzajúce výskumy v tomto odbore boli teda zamerané iba na regeneráciu tvrdých tkanív, zatiaľ čo predkladaný vynález sa týka ďalších výhodných účinkov na hojenie rán v mäkkých tkanivách a antibakteriálnych a protizápalových účinkov týchto substancií, ktoré sú neočakávaným objavom.

Podstata vynálezu

Predkladaný vynález je založený na objave, že matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny (ďalej je tu pre maticu zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a proteíny zubnej skloviny používaný výraz "aktívne substancie zubnej skloviny") sú výhodné činidlá na zosilnenie alebo zlepšenie hojenia rán v mäkkých tkanivách (tzn. nemineralizovaných tkanivách), ako sú napríklad tkanivá obsahujúce kolagén alebo epitel, vrátane kože a slizníc, svalov, krvných a lymfatických ciev, nervového

tkaniva, žliaz, šliach, oka a chrupiek. Ak je tu uvedené v časti príkladov, sú matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny osobitne účinné v hojení alebo profylaxii rán v mäkkých tkanivách.

V súlade s tým sa vynález týka použitia prípravku aktívnej substancie zubnej skloviny na prípravu farmaceutických alebo kozmetických prostriedkov pre: (i) hojenie rán; (ii) zlepšenie hojenia rán; a/alebo (iii) regeneráciu a/alebo reparáciu mäkkých tkanív.

V inom aspekte sa vynález týka spôsobu zlepšenia hojenia rán alebo na podporenie regenerácie a/alebo reparácie mäkkých tkanív, kde uvedený spôsob obsahuje podanie terapeuticky alebo profylakticky účinného množstva aktívnej substancie zubnej skloviny jedincovi, ktorý potrebuje takú liečbu.

Ďalej bolo zistené, že matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a proteíny matrice zubnej skloviny majú antibakteriálne a/alebo protizápalové vlastnosti, ktoré môžu byť využité na liečbu ochorení ako mäkkých, tak tvrdých (tzn. mineralizovaných) tkanív.

V inom aspekte sa vynález týka použitia prípravkov aktívnej substancie zubnej skloviny na prípravu farmaceutického prostriedku na prevenciu a/alebo liečbu infekčných alebo zápalových stavov.

Hojenie rán

Rany a/alebo vredy sa zvyčajne nachádzajú na koži alebo na povrchu slizníc alebo vznikajú v dôsledku infarktu orgánu ("ischémie"). Rana môže byť dôsledkom defektu v mäkkých tkanivách alebo lézie alebo základného ochorenia. Regenerácia

experimentálne vyvolaných defektov periodontu bola vynález-
cami opísaná skôr a nespadá do rozsahu predkladaného vynálezu.
Termín "koža", ako je tu použitý, označuje vonkajší povrch
tela živočícha vrátane človeka a zahŕňa intaktnú alebo takmer
intaktnú kožu, takisto ako poranenú kožu. Termín "sliznica"
označuje nepoškodenú alebo poškodenú sliznicu živočícha, ako
napríklad človeka, a zahŕňa ústnu, bukálnu, ušnú, nosnú,
pľúcnu, očnú, gastrointestinálnu, vaginálnu alebo rektálnu
sliznicu.

Termín "rana", ako je tu použitý, označuje poranenia s
narušením normálnej integrity tkanivových štruktúr. Termín
tiež zahŕňa termíny "lézie", "nekrózy" a "vredy". Termín
"vred" je označenie pre takmer akúkoľvek léziu na koži alebo
na sliznici a označuje lokálny defekt alebo exkaváciu na po-
vrchu orgánu alebo tkaniva, ktorý vzniká odlučovaním nekrotic-
kého tkaniva. Lézia je všeobecne akýkoľvek tkanivový defekt.
Nekróza označuje tkanivo odumreté v dôsledku infekcie, pora-
nenia, zápalu alebo infarktu.

Termín "rana", ako je tu použitý, označuje akúkoľvek ranu
(klasifikácia rán je uvedená ďalej) v akomkoľvek štádiu hoje-
nia, vrátane stavu pred zahájením hojenia alebo aj stavu pred
vznikom špecifickej rany, ako je napríklad chirurgická incisia
(profylaktická terapia).

Príkladmi rán, ktoré môžu byť preventívne a/alebo tera-
peuticky liečené spôsobom podľa predkladaného vynálezu, sú
napríklad aseptické rany, zmliaždené rany, rezné rany, tržné
rany, nepenetrujúce rany (tzn. rany, pri ktorých nie je poru-
šená koža, ale je poranenie hlbšie uložených štruktúr), otvo-
rené rany, penetrujúce rany, perforujúce rany, bodné rany,
septické rany, podkožné rany atd. Príkladmi "vredov" sú pre-
ležieniny, herpetická gingivostomatitída, defekty vzniknuté
pôsobením chrómu, omrzliny, otlaky a podobne. Príkladmi vredov

sú ďalej napríklad peptické vredy, dvanástnikové vredy, žalúdočné vredy, vredy spojené s dnou, diabetické vredy, ischemické vredy, vredy z hypostázy, hleňové vredy (venózne vredy), sublinguálne vredy, podsliznicové vredy, symptomatické vredy, trofické vredy, tropické vredy, vredy pri pohlavných chorobách, napríklad pri kvapavke (vrátane uretritídy, endocervitídy a proctitídy). Medzi stavy súvisiace s ranami alebo vredmi, ktoré môžu byť úspešne liečené spôsobom podľa predkladaného vynálezu, patria popáleniny, antrax, tetanus, plynatá gangréna, spála, erysipel, sycosis barbae, folliculitis, impetigo contagiosa alebo impetigo bullosa apod. Často sa použitie termínov "rana" a "vred" a prekrýva a ďalej sú tieto termíny často používané náhodne. Ako bolo uvedené hore, v predkladanom vynáleze zahŕňa termín "rana" termíny "vred", "lézie" a "infarkt" a tieto termíny sú používané zameniteľne, pokiaľ to nie je výslovne uvedené inak.

Medzi rany, ktoré môžu byť liečené spôsobom podľa predkladaného vynálezu, patria tiež (i) všeobecné rany, ako sú chirurgické, traumatické, infekčné, ischemické, termálne, chemické a bulózne rany; (ii) rany špecifické pre orálnu dutinu, ako sú napríklad rany po extrakcii zubu, rany v endodonte, najmä rany súvisiace s liečbou cýst a abscesov, vredov a lézií bakteriálneho, vírusového alebo autoimunitného pôvodu, mechanické, chemické, termálne, infekčné a lichenoidné rany; konkrétnymi príkladmi sú herpetické vredy, stomatitis aphthosa, akútna nekrotizujúca ulceratívna gingivitída a syndróm pálenia v ústach; a (iii) rany na koži, ako sú napríklad nádory, popáleniny (napríklad chemické, termálne), lézie (bakteriálne, vírusové, autoimunitné), pohryznutia a chirurgické incisie. Iným spôsobom delenia rán je delenie na (I) rany s malou stratou tkaniva, ako sú rany spôsobené chirurgickou incisiou, drobnou abráziou alebo menším pohryznutím; a (ii) rany s významnou stratou tkaniva. Do druhej skupiny patria ischemické vredy, otlaky, fistuly, lacerácie, ťažšie pohryznutia, popá-

leniny a rany po odberoch orgánových štepov (v mäkkých a tvrdých tkanivách) a infarkty.

Vplyv aktívnej substancie zubnej skloviny na hojenie rán je významný pre rany prítomné v dutine ústnej. Také rany vznikajú v dôsledku poranenia alebo traumy pri chirurgických zá-
krokoch v dutine ústnej, vrátane operácií periodontu, extrak-
cií zubov, endodontickej liečbe, vkladaní zubných implantátov,
aplikácie a používání zubných protéz a podobne. V časti prí-
kladov je demonštrovaný priaznivý efekt aktívnej substancie
zubnej skloviny na hojenie takých rán. Ďalej bol pozorovaný
vplyv na hojenie mäkkých tkanív.

V dutine ústnej je hojenie rán typu aft, tráum alebo
herpetických defektov tiež zlepšené po aplikácii aktívnej
substancie zubnej skloviny. Traumatické defekty a herpetické
defekty môžu byť samozrejme lokalizované aj inde na tele.

V inom aspekte vynálezu je defekt, ktorý je liečený
a/alebo ktorému má byť zabránené, vybraný zo skupiny sklada-
júcej sa z aseptických rán, infarktov, zmliaždených rán, rez-
ných rán, tržných rán, nepenetrujúcich rán, otvorených rán,
penetrujúcich rán, perforujúcich rán, bodných rán, septických
rán a podkožných rán.

Ďalšie rany, ktoré sú významné v súvislosti s predkla-
daným vynálezom, sú rany typu ischemických vredov, otlaky,
fistuly, ťažšie pohryznutie, popáleniny a rany vznikajúce po
odberu orgánov.

Ischemické vredy a otlaky sa zvyčajne hoja veľmi pomaly
a najmä v takých prípadoch má zlepšenie a zrýchlenie hojenia
značný význam pre pacienta. Ďalej, náklady na liečbu takých
pacientov s takými defektmi sú značne znížené, pokiaľ je
hojenie zlepšené a prebieha rýchlejšie.

Rany po odbere tkaniva sú rany súvisiace s odstránením tvrdého tkaniva z jedného miesta tela a prenesením tohto tkaniva na iné miesto tela, ako je to napríklad pri transplantáciách. Rany vznikajúce pri takých operáciách sú veľmi bolestivé a zlepšenie hojenia má preto značný význam.

Termín "koža" je použitý vo veľmi všeobecnom význame a zahŕňa epidermis a - v prípadoch, keď je povrch kože viac alebo menej poškodený - tiež dermis. Okrem stratum corneum sa vonkajšia (epitelová) vrstva kože označuje epidermis a hlbšie spojivé tkanivo kože sa označuje dermis.

Pretože je koža časťou tela najviac vystavenou vonkajším vplyvom, je často miestom rôznych poranení, ako sú napríklad ruptúry, rezné rany, oderky, popáleniny a omrzliny alebo defekty vznikajúce v dôsledku rôznych ochorení. Ďalej, pri nehodách je často poranená veľká časť kože. Avšak, pretože je koža významnou bariérou a má významné fyziologické funkcie, je integrita kože významná pre dobrý stav jedinca a akékoľvek porušenie alebo ruptúra kože predstavuje ohrozenie, ktoré musí telo reparovať na zachovanie existencie.

Okrem kože môžu byť tiež poranené všetky druhy tkanív (tzn. mäkkých a tvrdých tkanív). Poranenia mäkkých tkanív vrátane sliznicových membrán a/alebo kože sú osobitne významné v súvislosti s predkladaným vynálezom.

Hojenie defektov na koži alebo na slizniciach prebieha v mnohých štádiách, ktoré vedú k reparácii alebo regenerácii kože alebo sliznice. V posledných rokoch boli regenerácie a reparácie stanovené ako dva typy hojenia, ktoré môžu prebehnúť. Regenerácia môže byť definovaná ako biologický proces, pri ktorom je celkom obnovená architektúra a funkcie stratého tkaniva. Reparácia je biologický proces, pri ktorom je

kontinuita poraneného tkaniva obnovená novým tkanivom, ktoré nereplikuje štruktúru a funkciu strateného tkaniva.

Väčšina tkanív sa hojí reparáciou, čo znamená, že vytvorené nové tkanivo je štrukturálne a chemicky odlišné od pôvodného tkaniva (jazvové tkanivo. V časnom štádiu reparácie tkaniva je jedným z procesov, ktoré sú takmer vždy prítomné, tvorba prechodného spojivového tkaniva v oblasti zranenia. Tento proces začína tvorbou novej extracelulárnej kolagénovej matrice fibroblastmi. Táto nová extracelulárna kolagénová matrika je potom nosičom pre spojivé tkanivo pri konečnom procese hojenia. Konečným zhojením je, vo väčšine tkanív, tvorba jazvy obsahujúcej spojivé tkanivo. V tkanivách s regeneratívnymi vlastnosťami, ako je napríklad koža a kosť, obsahuje konečné hojenie regeneráciu pôvodného tkaniva. Toto regenerované tkanivo má často určité charakteristiky jazvy, ako je napríklad zosilnenie zhojenej zlomeniny kosti.

Za normálnych okolností má organizmus mechanizmy na hojenie poranenej kože alebo sliznice vedúce k obnoveniu integrity sliznicovej alebo kožnej bariéry. Reparácia aj malých poranení môže trvať hodiny a dni až týždne. Avšak, pri ulceráciách môže byť hojenie veľmi pomalé a defekt môže pretrvávajúť dlhodobo, tzn. mesiace a roky.

Štádiá hojenia rán sú zvyčajne zápal (normálne 1-3 dni), migrácia (normálne 1-6 dní), proliferácia (normálne 3-24 dní) a maturácia (normálne 1-12 mesiacov). Hojenie je komplexný a dobre koordinovaný proces, ktorý zahŕňa migráciu, proliferáciu a diferenciáciu rôznych typov buniek, rovnako ako syntézu zložiek matrice. Hojenie môže byť rozdelené do troch fáz:

(i) Hemostáza a zápal

Ako náhle sa trombocyty dostanú mimo cirkuláciu a do kontaktu s trombínom a kolagénom, tak sa aktivujú a začnú agregovať. Trombocyty teda iniciujú reparačný proces agregáciou a tvorbou prechodnej zrazeniny zaistujúcou hemostázu a brániacu invázii baktérií. Aktivované trombocyty aktivujú koagulačnú kaskádu a uvoľňujú rastové faktory ako je doštičkový rastový faktor (PDGF) a epidermálne rastové faktory (EGF) a transformujúce rastové faktory (TGF).

Prvými bunkami migrujúcimi do miesta poranenia sú neutrofily, po ktorých nasledujú monocyty, ktoré sú aktivované makrofágy.

Hlavnou úlohou neutrofilov sa zdá byť obrana proti baktériám alebo vyčistenie rany od kontaminujúcich baktérií a zlepšenie hojenia odstraňovaním odumretých buniek a doštičiek. Migrácia neutrofilov ustáva počas prvých 48 hodín za podmienky, že v rane už nie je žiadna bakteriálna kontaminácia. Nadbytok neutrofilov je fagocytovaný tkanivovými makrofágmi vzniknutými z cirkulujúcej zásoby krvných monocytov. Makrofágy sa považujú za zásadné pre účinné hojenie v tom, že sú tiež zodpovedné za fagocytózu patogénnych organizmov a za odstraňovanie bunkovej drviný. Ďalej, makrofágy uvoľňujú veľa faktorov, ktoré saúčastnia ďalšieho procesu hojenia. Makrofágy priťahujú fibroblasty, ktoré začínajú produkovať kolagén.

(ii) Tvorba granulačného tkaniva a reepitelizácia

Počas 48 hodín po poranení začínajú fibroblasty proliferovať a migrovať do oblasti poranenia zo spojivového tkaniva na okrajoch rany. Fibroblasty produkujú kolagén a glykozaminyglykány a ďalej znižujú tlak kyslíka v rane, čím stimulujú

proliferáciu buniek endotelu. Endotelové bunky spôsobujú vznik novej kapilárnej siete.

Kolagenázy a aktivátory plazminogénu sú secernované z keratinocytov. Pokiaľ nie je rana narušená a tkanivo je dobre zásobené kyslíkom a živinami, tak migrujú keratinocyty do rany. Predpokladá sa, že keratinocyty migrujú iba nad živé tkanivo a do oblasti pod odumreté tkanivo a pod krustu na rane.

Plocha rany je ďalej zmenšená kontrakciou.

(iii) Remodelovanie kože

Ihneď po dokončení reepitelizácie začína remodelovanie tkaniva. Táto fáza, ktorá trvá niekoľko rokov, obnovuje pevnosť poraneného tkaniva.

Všetky hore uvedené procesy hojenia trvajú značný čas. Rýchlosť hojenia je ovplyvnená prítomnosťou infekcie, celkovým zdravotným stavom jedinca, prítomnosťou cudzích telies apod. Niektoré patologické stavy ako je infekcia, macerácia, dehydratácia, špatný celkový zdravotný stav a malnutricia môžu viesť k vzniku chronických vredov, ako sú napríklad ischemické vredy.

Kým neprebehne aspoň povrchové zhojenie, pretrváva stále riziko novej infekcie. Preto platí, že čím rýchlejšie je hojenie, tým skôr je toto riziko odstránené.

Preto má značný význam akýkoľvek postup, ktorý ovplyvní rýchlosť hojenia rany alebo zlepšenie hojenia rany.

Ďalej, pretože takmer všetky reparačné procesy obsahujú časnú tvorbu spojivového tkaniva, zlepší stimulácia tejto tvorby a následných procesov hojenie tkaniva.

Termín "klinické zhojenie", ako je tu použitý, označuje stav, keď nie je vizuálne patrné žiadne narušenie tkaniva a sú prítomné iba mierne známky zápalu, ako je zarudnutie a mierny opuch tkaniva. Ďalej, v pokojnom stave alebo uvoľnenom stave nie je prítomná bolesť.

Ako bolo uvedené hore, vynález sa týka použitia matrice zubnej skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny a/alebo proteínov zubnej skloviny ako činidiel podporujúcich hojenie rán, tzn. činidiel, ktoré zrýchľujú, stimulujú alebo podporujú hojenie kožných alebo sliznicových rán. Významné je tiež použitie týchto substancií ako činidiel podporujúcich regeneráciu tkaniva a/alebo reparáciu tkaniva. Okrem toho, z dôvodov ovplyvnenia hojenia rany majú matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny zubnej skloviny tiež vplyv na bolesť.

Tradične boli pri starostlivosti o poranenie používané suché obväzy alebo vysychajúce obväzy. Tieto boli postupne nahradzované nepriedušnými obväzmi udržiavajúcimi vlhké prostredie. Na úspešnú reparáciu alebo nahradenie poraneného tkaniva musia byť vyvážené procesy hojenia rany, fibrózy a mikrobiálnej invázie. Veľa prostriedkov určených na prevenciu infekcie ohrozuje hojenie poranení. Dlhodobé hojenie alebo zápal môžu viesť k vzniku fibrózy. Okrem toho, ako bolo uvedené skôr, sú rastové faktory, ako je epidermálny rastový faktor (EGF), transformujúci rastový faktor- α (TGF- α), doštičkový rastový faktor (PGDF), fibroblastové rastové faktory (FGF) vrátane acidického fibroblastového rastového faktoru (α -FGF) a bazického fibroblastového rastového faktoru (β -FGF), transfor-

mujúci rastový faktor- β (TGF- β), a inzulínu-podobné rastové faktory (IGF-1 a IGF-2), molekulami sprostredkujúcimi proces hojenia a sú často uvádzané ako činidlá vyvolávajúce hojenie rán; avšak, môžu tiež spôsobovať vznik fibrózy, ktorá môže narušiť úspešné hojenie. Aj napriek tomu, že zrýchlenie hojenia znižuje riziko infekcie a následný zápal, ktorý môže viesť k tvorbe jazvy, mali terapeutické pokusy o zrýchlenie normálneho hojenia rán relatívne malý úspech. Toto je spôsobené patrne tým, že reparačných procesov sa účastní veľa faktorov, ako boli uvedené hore.

Predkladatelia vynálezu pozorovali, že v rôznych bunkových kultúrach fibroblastov (embryonálnych, kožných, z periodontálnych ligamentov, rybích alebo vtáčích) je produkované v kultivačnom médiu dvakrát toľko TGF β 1 pri simulácii EMDO-GAINOM^R v porovnaní s nestimulovanými kultúrami, pri testovaní pomocou, napríklad ELISA (pozri príklad 1). Zvýšenie je patrné po 24 hodinách kultivácie, ale najvýraznejšie je po niekoľkých dňoch (deň 2 a 3). Po druhom dni je tiež zvýšená proliferácia buniek v bunkových kultúrach stimulovaných EMDOGAINOM^R. Podobné, ale menej výrazné zvýšenie produkcie TGF β 1 je pozorované pri ľudských epitelových bunkách. Pretože sa predpokladá centrálny význam TGF β 1 v epitelizácii povrchu rany, podporujú tieto pozorovania koncept predkladaného vynálezu.

V dutine ústnej je použitie obvazových prostriedkov bežné. Také obvazové prostriedky sú zvyčajne bežných typov, napríklad Surgipads na zastavenie krvácania a Coe-Pack periodontálne obvazy (Coe Laboratories, GC Group, USA) na otvorené rany. Gáza navlhčená antibiotickým roztokom je vkladaná do dutiny po extrakcii zubu a musí byť odstránená po niekoľkých dňoch, keď je zahájené hojenie. Vyplachovanie antiseptikami ako je chlórhexidín je pravidelne používané po chirurgických zákrokoch v dutine ústnej. Niekedy sú tiež predpisované celkové alebo lokálne antibiotiká.

Pri liečbe rán musí byť brané v úvahu preventívne opatrenia, ako je zachovanie sterility, predchádzanie kontaminácii, správna aplikácia obväzov/bandáží apod., ktoré zvyčajne vyžadujú, aby bola liečba vykonávaná školenými sestrami. Preto je hojenie rán zvyčajne veľmi nákladné, pokiaľ má byť činidlo podporujúce hojenie aplikované niekoľkokrát za deň. Žiadúcu redukciu nákladov na hojenie rany je preto možné dosiahnuť vtedy, keď je znížená frekvencia aplikácií alebo vtedy, keď je proces hojenia zlepšený tak, že je znížený čas nutný na hojenie rany.

Predkladatelia vynálezu teraz zistili, že matrica zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny zubnej skloviny majú vlastnosti podporujúce hojenie rán. Ďalej existujú dôkazy, že aplikácia matrice zubnej skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny a/alebo proteínov zubnej skloviny vedie k zlepšenému hojeniu rán. Konkrétne, vynálezcovia pozorovali, že po aplikácii proteínov matrice zubnej skloviny a/alebo derivátov matrice zubnej skloviny je zápalové štádium skrátené a typické príznaky ako je teplejší povrch, zarudnutie, opuch a bolesť sú menej vyznačené, a nové tkanivo je tvorené rýchlejšie. Pozorovaný čas hojenia rán (napríklad po chirurgickom zákroku) je významne skrátený v porovnaní s chirurgickým zákrokom bez použitia matrice zubnej skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny a/alebo proteínov matrice zubnej skloviny.

Terapeutická a/alebo profylaktická aktivita matrice zubnej skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny a/alebo proteínov matrice zubnej skloviny môže byť samozrejme dokázaná v in vivo testoch na pokusných zvieratách alebo na ľuďoch (pozri časť príkladov uskutočnenia vynálezu). Avšak, dôkazy účinnosti a/alebo aktivity matrice zubnej skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny a/alebo proteínov matrice zubnej sklo-

viny môžu byť získané vykonaním relatívne jednoduchých testov in vitro, napríklad testovaním na bunkových kultúrach.

Ďalej existuje niekoľko parametrov, ktoré môžu byť použité na hodnotenie efektu na hojenie rán. Medzi tieto parametry patrí:

- počítačová planimetria (hodnotenie rýchlosti hojenia otvorenej rany);
- laserové dopplerové zobrazenie (hodnotenie perfúzy rany);
- tenziometria (hodnotenie pevnosti rany);
- histopatológia/cytológia (mikroskopické hodnotenie tkanív a kvapalín z rany);
- biochemické vyšetrenia (HPLC/RIA) (hodnotenie rôznych liekov a biochemických zložiek v hojacom sa tkanive);
- elektrodiagnostika (hodnotenie vzťahov medzi hojením rany a inerváciou);
- scintigrafia (rádionuklidové zobrazenie tkanív v rane).

Pri hojení rán/vredov má značný význam odstraňovanie tkanivovej drviny a čistenie rany. Predpokladá sa, že čistenie rany a/alebo odstraňovanie tkanivovej drviny z rán/vredov sú nutnými podmienkami pre proces hojenia a ďalej, že pokiaľ sú aplikované činidlá podporujúce hojenie, tak musia byť aplikované na čerstvé a vitálne tkanivo a nie na odumreté tkanivo alebo na kontaminované tkanivo. Odstraňovanie nekrotického tkaniva môže byť vykonané aspoň štyrmi rôznymi spôsobmi: (i) odstraňovaním nekrotického tkaniva ostrým nástrojom; (ii) mechanickým odstraňovaním; (iii) enzymatickým odstraňovaním; a (iv) autolytickým odstraňovaním odumretého tkaniva.

Preto sa predkladaný vynález týka tiež použitia spôsobu odstraňovania nekrotického tkaniva v kombinácii s použitím matrice zubnej skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny a/alebo proteínov matrice zubnej skloviny na hojenie alebo prevenciu rán. Taká kombinovaná terapia obsahuje nasledujúce

dva kroky: (i) spôsob odstránenia nekrotického tkaniva; (ii) aplikáciu matrice zubnej skloviny, derivátu matrice zubnej skloviny a/alebo proteínov matrice zubnej skloviny; a tieto dva kroky môžu byť vykonávané toľkokrát, koľkokrát je to potrebné a v akomkoľvek poradí.

Ako náhle je nekrotické tkanivo odstránené z rany, môžu byť matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny aplikované buď priamo na alebo do rany, alebo môžu byť aplikované vo forme akéhokoľvek vhodného farmaceutického prostriedku, ako je napríklad suchý alebo vlhký obväz, do ktorého boli zapracované matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny. Matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny môžu byť samozrejme aplikované pri čistení rany.

Ako bude uvedené ďalej, matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny môžu byť použité samotné alebo môžu byť použité vo vhodnom prípravku alebo vo farmaceutickom prostriedku.

Zníženie rizika infekcie

V ďalšom aspekte predkladaného vynálezu sú matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny použité ako terapeutické alebo profylaktické činidlá majúce antimikrobiálny efekt. Matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny vykazujú účinok znižujúci riziko infekcie.

V týchto súvislostiach označuje termín zníženie rizika infekcie liečebný alebo preventívny účinok matrice zubnej

skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny a/alebo proteínov matrice zubnej skloviny na infekciu tkaniva u jedinca vtedy, keď je jedinec alebo tkanivo liečené matricou zubnej skloviny, derivátmi matrice zubnej skloviny a/alebo proteínmi matrice zubnej skloviny.

Termín infekcia označuje inváziu a množenie mikroorganizmov v telesných tkanivách alebo akumuláciu mikroorganizmov v tkanivách, ktoré môžu byť klinicky neznateľné alebo ktoré môže viesť k lokálnemu poškodeniu buniek v dôsledku kompetitívneho metabolizmu, pôsobeniu enzýmov, toxínov, intracelulárnej replikácie alebo reakcie antigén-protilátka.

V predkladanom vynáleze môže byť infekcia, ktorá je liečená alebo ktorej má byť zabránené, spôsobená mikroorganizmami. Medzi mikroorganizmy významné v súvislosti s predkladaným vynálezom patria baktérie, vírusy, kvasinky, plesne, protozoá a prvoky.

V tejto súvislosti znamená výraz "antibakteriálny účinok" to, že rast baktérií je potlačený alebo to, že baktérie sú deštruované. Termín nie je obmedzený na určité baktérie, ale týka sa baktérií všeobecne. Avšak, vynález je zameraný na: (i) patogénne baktérie, ktoré vyvolávajú ochorenie u cicavcov vrátane ľudí; a/alebo (ii) na baktérie, ktoré sú normálne prítomné v tele cicavcov a ktoré môžu spôsobiť ochorenie za určitých podmienok.

V súlade s tým sa predkladaný vynález týka použitia aktívnej substancie zubnej skloviny na prevenciu alebo liečbu bakteriálnej infekcie na povrchu tela ako je napríklad koža, sliznica alebo povrch nechtu alebo zubu.

Všeobecný a konkrétny opis bakteriálnych infekcií, ktoré môžu byť liečené

Matrica zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny môžu byť použité na liečbu infekcií spôsobených baktériami súčasne s alebo bez antimikrobiálnych činidiel. Medzi Gram-negatívne baktérie, ktoré môžu byť liečené aktívnou substanciou zubnej skloviny, patria koky, ako je *Neisseriae* (napríklad *N. meningitis*, *N. gonorrhoeae*) a *Acinetobacter*, alebo tyčinky, ako sú *Bacteroides* (napríklad *B. fragilis*), *Bordetella* (napríklad *B. pertussis*), *Brucella* (napríklad *B. melitensis*, *B. abortus* Bang, *B. suis*), *Campylobacter* (napríklad *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*), *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* (napríklad *E. coli*), *Haemophilus* (napríklad *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*), *Klebsiella* (napríklad *K. pneumoniae*), *Legionella* (napríklad *L. pneumophila*), *Pasteurella* (*P. yersinia*, *P. multocida*), *Proteus* (napríklad *P. mirabilis*, *P. vulgaris*), *Pseudomonas* (napríklad *P. aeruginosa*, *P. mallei*, *P. pseudomallei*), *Salmonella* (napríklad *S. enteritidis*, *S. infantis*, *S. dublin*, *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. schottmulleri*, *S. choleraesuis*, *S. typhimurium* alebo akákoľvek z 2500 ďalších sérotypov), *Serratia* (napríklad *S. marcescens*, *S. liquefaciens*), *Shigella* (napríklad *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. boydii*), *Vibrio* (napríklad *V. cholerae*, *V. el tor*) a *Yersinia* (napríklad *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*). Medzi Gram-pozitívne baktérie, ktoré môžu byť liečené aktívnou substanciou zubnej skloviny, patria koky, ako je *Streptococcus* (napríklad *S. pneumoniae*, *S. viridans*, *S. faecalis*, *S. pyogenes*), *Staphylococcus* (napríklad *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. albus*) a tyčinky, ako sú *Actinomyces* (napríklad *A. israeli*), *Bacillus* (napríklad *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. anthracis*), *Clostridium* (napríklad *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. perfringens*, *C. difficile*), *Corynebacterium* (napríklad *C. diphtheriae*), *Listeria* a *Providencia*. Medzi ďalšie

baktérie spôsobujúce infekcie patrí *Propionobacterium acne* a *Pityosporon ovale*.

Matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny môžu byť použité na liečbu infekcií spôsobených spirochétami, ako je napríklad *Borrelia*, *Leptospira*, *Treponema* alebo *Pseudomonas*.

Antimikrobiálne činidlo, ktoré môže byť použité kombinácii s matricou zubnej skloviny, derivátmi matrice zubnej skloviny a/alebo proteínmi matrice zubnej skloviny, môže byť také antimikrobiálne činidlo, ktoré pôsobí inhibíciu syntézy bunkovej steny, ako sú β -laktámové antibiotiká a vankomycín, výhodne penicilíny, ako je amdinocilín, ampicilín, amoxicilín, azlocilín, bacampicilín, benzatin-penicilín G, carbencilín, cloxacilín, cyclacilín, dicloxacilín, metecilín, mezlocilín, nafcilín, oxacilín, penicilín G, penicilín V, piperacilín a ticarcilín; cefalosporiny, ako sú cefalosporiny prvej generácie, kam patrí cefadroxil, cefazolin, cefalexin, cefalotin, cefapirin a cefradin; druhej generácie, kam patrí cefaclor, cefamandol, cefonicid, ceforanidin, cefoxitin a cefuroxim; alebo cefalosporiny tretej generácie, ako je cefoperazon, cefotaxim, cefotetan, ceftazidim, ceftizoxim, ceftriaxon a moxalaktam; karbapenemy ako je imipenem; alebo monobaktamy ako je aztreonam.

Ďalej môžu byť použité antimikrobiálne činidlá, ktorých mechanizmus účinku spočíva v inhibícii syntézy proteínov, ako je napríklad chloramfenikol; tetracyklíny, ako je napríklad demecloxyklín, doxycyklín, metacyklín, minocyklín a oxytetracyklín; aminoglykozidy, ako je napríklad amikacín, gentamicín, kanamycín, neomycín, netilmicín, paromomycín, spektinomycín, streptomycín a tobramycín; polymyxíny ako je kolistín, kolistimatát a polymyxín B, a erytromycíny a linkomycíny; a ďalej antimikrobiálne činidlá inhibujúce syntézu nukleových kyselín,

ako sú sulfónamidy, napríklad sulfacytín, sulfadiazín, sulfizoxazol, sulfametoxazol, sulfametzol a sulfapyridín; trimetoprim, chinolóny, novobiocín, pyrimetamín a rifampín.

V špecifickom rozpracovaní vynálezu je infekcia prítomná v dutine ústnej a môže ísť o bakteriálnu infekciu.

Medzi príklady baktérií v dutine ústnej, ktoré majú byť zničené, patria napríklad:

- baktérie spôsobujúce zubný kaz, napríklad *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp.;
- baktérie spôsobujúce ochorenie periodontu, ako je napríklad *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter* (*Fusobacteria*, *Staphylococci*), *B. forsythus*;
- baktérie spôsobujúce alveolitídu, ako je napríklad *Staphylococcus*, *Actinomyces* a *Bacillus*;
- baktérie spôsobujúce periapikálne lézie, ako sú napríklad spirochéty a všetky baktérie uvedené hore.

Protizápalové účinky

Preďkladaný vynález sa tiež týka použitia matrice zubnej skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny a/alebo proteínov matrice zubnej skloviny ako terapeutických alebo profylaktických činidiel majúcich protizápalové účinky.

Rôzne lieky sa používajú na potlačovanie zápalov, vrátane adrenokortikosteroidov, veľkej skupiny činidiel označovanej ako nesteroidné protizápalové lieky alebo NSAID, a liekov typu imunosupresívnych činidiel. Adrenokortikosteroidy, najmä glukokortikoidy, majú výrazné protizápalové účinky pri použití vo farmakologických dávkach. Špecificky inhibujú časnú vaskulárnu fázu zápalového procesu tým, že znižujú cievnu permeabilitu

a tak znižujú migráciu granulocytov. Glukokortikoidy tiež interferujú s neskorými zápalovými a reparačnými procesmi tým, že inhibujú proliferáciu mezenchymálnych buniek a produkciu extracelulárnych makromolekúl, vrátane proteoglykánov a kolagénu. V pokusoch bolo preukázané, že glukokortikoidy inhibujú, napríklad funkcie makrofágov, produkciu protilátok, bunkovú imunitu a snáď uvoľňovanie lyzozomálnych enzýmov.

Závažnosť tkanivového poškodenia môže závisieť od reakcie antigén/protilátka v organizmu, rovnako ako od stupňa zadržovania zápalových produktov v mieste poranenia. Lokálna akumulácia mediátorov zápalu akceleruje tento proces. Vo väčšine prípadov je tento dej pomalý, s imunoinfiltráciou tkaniva a tvorbou granulačného tkaniva, ktoré obsahuje zápalové bunky.

Termín "protizápalový účinok", ako je tu použitý, označuje pôsobenie proti zápalu alebo potlačovanie zápalu.

Všeobecný a podrobný opis typov zápalových stavov, ktoré môžu byť liečené

Zápalový stav, ktorý môže byť liečený spôsobom podľa predkladaného vynálezu, môže byť akýkoľvek zápalový stav v akejkoľvek časti tela alebo akýkoľvek zápalový stav v mäkkých alebo tvrdých tkanivách. V jednom uskutočnení predkladaného vynálezu je zápalový stav prítomný v dutine ústnej. Príkladmi ochorenia v dutine ústnej sú alveolitída, cheilitída, kostová nekróza (posttraumatická), fraktúry.

V inom uskutočnení predkladaného vynálezu je zápal prítomný v mieste odberu kostového štepu. V treťom uskutočnení predkladaného vynálezu je zápal prítomný v mieste kĺbnej dutiny. Príkladmi takých zápalových stavov sú reumatoidná artritída a príbuzné ochorenia.

Antibakteriálna verzus protizápalová aktivita

Oproti mnohým v súčasnosti používaným antibiotikám nenarušujú proteíny matrice zubnej skloviny hojenie rany a rýchlejšie hojenie rany neumožňuje vývoj chronických alebo dlhodobých zápalových procesov. Ďalej, reorganizácia správnych tkanív, ako je opísaná po aplikácii derivátov matrice zubnej skloviny na periodontálne defekty, je zreteľne zlepšená pri rýchlom hojení rany bez prítomnosti baktérií alebo zápalových reakcií.

Aplikácia matrice zubnej skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny a/alebo proteínov matrice zubnej skloviny vedie k rýchlejšiemu hojeniu rán po chirurgických incisiách, pravdepodobne v dôsledku vytvorenia povrchu, ktorý pri kontakte s baktériami inhibuje ich rast, ale ktorý súčasne zosilňuje migráciu fibroblastov a syntézu kolagénu. Keď je zápalová fáza skrátená, tak sú typické príznaky ako je zahriatie oblasti, zarudnutie, opuch a bolesť menej výrazné.

Matrica zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a proteíny matrice zubnej skloviny

Matrica zubnej skloviny je prekursor zubnej skloviny a môže byť získaná z akéhokoľvek relevantného prírodného zdroja, tzn. od cicavcov, pri ktorých prebieha vývoj zubov. Vhodným zdrojom sú vyvíjajúce sa zuby od jatočných zvierat, ako sú teľatá, prasiatka alebo jahňatá. Iným zdrojom je napríklad rybacia koža.

Matrica zubnej skloviny môže byť pripravená z vyvíjajúcich sa zubov spôsobom opísaným skôr (EP-B-0337967 a EP-B-0263086). Matrica zubnej skloviny je zoškrabaná a sú pripravené deriváty matrice zubnej skloviny, napríklad pomocou extrakcie s vodným roztokom ako tlmivým roztokom, riedenou ky-

selinou alebo zásadou alebo zmesou vody/rozpúšťadla, po ktorej nasleduje rozdelenie podľa veľkosti, odsolenie alebo iný stupeň prečistenia a voliteľne lyofilizácie. Enzýmy môžu byť inaktivované tepelným spracovaním alebo rozpúšťadlami a v tomto prípade môžu byť deriváty skladované v kvapaline bez lyofilizácie.

V predkladanom vynáleze sú deriváty matrice zubnej skloviny také deriváty matrice zubnej skloviny, ktoré obsahujú jeden alebo viac proteínov matrice zubnej skloviny alebo časti takých proteínov, ktoré sú produkované za prirodzených podmienok alternatívnym zostrihom a alebo spracovaním, alebo enzymatickým alebo chemickým štiepením prirodzených proteínov, alebo syntézou polypeptidov in vitro alebo in vivo (rekombinantnými DNA metódami alebo kultiváciou diploidných buniek). Medzi deriváty matrice zubnej skloviny patria tiež polypeptidy alebo proteíny odvodené z matrice zubnej skloviny. Polypeptidy alebo proteíny môžu byť naviazané na vhodný biologicky degradovateľný nosič, ako sú polyaminokyseliny alebo polysacharidy alebo ich kombinácie. Ďalej termín deriváty matrice zubnej skloviny tiež zahŕňa syntetické analogické zlúčeniny.

Proteíny sú biologické makromolekuly tvorené aminokyselinovými zvyškami viazanými navzájom peptidovými väzbami. Proteíny, ako lineárne polyméry aminokyselín, sú tiež označované ako polypeptidy. Typicky majú proteíny približne 50-800 aminokyselinových zvyškov a preto majú molekulovú hmotnosť v rozmedzí od približne 6000 do približne niekoľkých stoviek tisícov daltonov alebo viacej. Malé proteíny sa označujú ako peptidy alebo oligopeptidy.

Proteíny zubnej skloviny sú proteíny, ktoré sú prítomné v matrici zubnej skloviny, tzn. v prekurzore zubnej skloviny (Ten Cate: Oral Histology, 1994, Robinson: Eur. J. Oral Science, Jan. 1998, 106 Suppl. 1: 282-91), alebo proteíny, ktoré môžu

byť získané štiepením takých proteínov. Obyčajne majú také proteíny molekulovú hmotnosť nižšiu ako 120000 daltonov a patria medzi nich amelogeniny, non-amelogeniny, non-amelogeniny bohaté na prolín, ameliny (ameloblastin, sheatlin) a tufteliny.

Príklady proteínov na použitie v predkladanom vynáleze zahŕňajú amelogeniny, non-amelogeniny bohaté na prolín, tuftelin, trsové proteíny, sérové proteíny, proteíny prítomné v slinách, amelin, ameloblastin, sheatlin a ich deriváty a zmesi. Prípravok obsahujúci aktívnu substanciu zubnej skloviny podľa predkladaného vynálezu môže obsahovať aspoň dve z hore uvedených proteínových substancií. Komerčný výrobok obsahujúci amelogeniny a pravdepodobne iné proteíny matrice zubnej skloviny je predávaný pod názvom EMDOGAIN^R (Biora AB).

Všeobecne, hlavnými proteínmi matrice zubnej skloviny sú amelogeniny. Tieto proteíny tvoria približne 90% hmotn./hmotn. proteínov matrice. Zostávajúcich 10% hmotn./hmotn. tvoria non-amelogeniny bohaté na prolín, tuftelin, trsové proteíny, sérové proteíny a aspoň jeden proteín prítomný v slinách; avšak môžu byť prítomné tiež iné proteíny, ako je napríklad amelin (ameloblastin, sheatlin), ktoré boli identifikované v matrici zubnej skloviny. Rôzne proteíny môžu byť ďalej syntetizované a/alebo spracované v niekoľkých rôznych veľkostiach (tzn. s rôznymi molekulovými hmotnosťami). Tak bolo zistené, že prevládajúce proteíny matrice zubnej skloviny, amelogeniny, môžu existovať v niekoľkých rôznych veľkostiach, ktoré dohromady tvoria supramolekulové agregáty. Sú to značne hydrofóbne substancie, ktoré za fyziologických podmienok tvoria agregáty. Môžu byť nosičmi pre iné proteíny alebo peptidy.

Iné proteínové substancie sú tiež považované za vhodné na použitie podľa predkladaného vynálezu. Príkladmi takých pro-

teínov sú proteíny bohaté na prolín a polyprolín. Inými príkladmi substancíí vhodných na použitie podľa predkladaného vynálezu sú agregáty takých proteínov, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny, rovnako ako metabolity matrice zubnej skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny a proteínov matrice zubnej skloviny. Metabolity môžu byť proteíny alebo krátke peptidy akejkoľvek veľkosti.

Ako bolo uvedené hore, proteíny, polypeptidy alebo peptidy na použitie podľa predkladaného vynálezu majú zvyčajne molekulovú hmotnosť najčastejšie približne do 120 kDa, napríklad 100 kDa, 90 kDa, 80 kDa, 70 kDa alebo 60 kDa, ako je stanovené SDS-PAGE elektroforézou.

Proteíny na použitie podľa predkladaného vynálezu sú zvyčajne pripravené vo forme prostriedku, v ktorom je obsah proteínov aktívnej substancie zubnej skloviny v rozmedzí od približne 0,05% hmotn./hmotn. do 100% hmotn./hmotn., napríklad približne 5-99% hmotn./hmotn., približne 15-90% hmotn./hmotn., približne 20-90% hmotn./hmotn., približne 30-90% hmotn./hmotn., približne 40-85% hmotn./hmotn., približne 50-80% hmotn./hmotn., približne 60-70% hmotn./hmotn., približne 70-90% hmotn./hmotn. alebo približne 80-90% hmotn./hmotn..

Prípravky aktívnej substancie zubnej skloviny na použitie podľa predkladaného vynálezu môžu takisto obsahovať zmes aktívnych substancíí zubnej skloviny rôznych molekulových hmotností.

Proteíny matrice zubnej skloviny môžu byť delené na časť s vysokou molekulovou hmotnosťou a na časť s nízkou molekulovou hmotnosťou a bolo zistené, že význam pre liečbu periodontálnych defektov (tzn. periodontálnych rán) má dobre definovaná frakcia proteínov matrice zubnej skloviny. Táto frakcia obsahuje proteíny extrahovateľné kyselinou octovou, ktoré sú

súhrnne označované ako amelogeniny a ktoré tvoria časť matrice zubnej skloviny s nízkou molekulovou hmotnosťou (pozri EP-B-0337967 a EP-B-0263086).

Ako bolo uvedené hore, časť matrice zubnej skloviny s nízkou molekulovou hmotnosťou má výhodnú aktivitu pre indukciu väzby medzi tvrdým tkanivom v periodontálnych defektoch. V predkladanom vynáleze nie sú však aktívne proteíny obmedzené na časť matrice zubnej skloviny s nízkou molekulovou hmotnosťou. Medzi výhodné proteíny podľa predkladaného vynálezu patria proteíny ako je amelogenin, amelin, tuftelin apod., s molekulovou hmotnosťou (ako je meraná in vitro SDS-PAGE) nižšia ako približne 60000 daltonov, ale proteíny s molekulovou hmotnosťou vyššou ako 60000 daltonov majú tiež sľubné vlastnosti ako činidlá na hojenie rán, ako antibakteriálne činidlá a ako protizápalové činidlá.

V súlade s tým sa predpokladá, že aktívna substancia zubnej skloviny na použitie v predkladanom vynáleze má molekulovú hmotnosť do približne 40000, napríklad medzi 5000 a 25000.

Do rozsahu predkladaného vynálezu spadajú tiež peptidy opísané v WO 97/02730, tzn. peptidy, ktoré obsahujú aspoň jeden element sekvencie vybraný zo skupiny skladajúcej sa z tetrapeptidov DGEA (Asp-Gly-Glu-Ala), VTKG (Val-Thr-Lys-Gly), EKGE (Glu-Lys-Gly-Glu) a DKGE (Asp-Lys-Gly-Glu) a ktoré ďalej obsahujú aminokyselinovú sekvenciu, v ktorej je 20 susediacich aminokyselín identických aspoň z 80% so sekvenciou aminokyselín rovnakej dĺžky vybranej zo skupiny skladajúcej sa z aminokyselinovej sekvencie uvedenej v SEQ ID NO: 1 a sekvencie obsahujúcej aminokyseliny 1 až 103 SEQ ID NO: 1 a aminokyseliny 6 až 324 SEQ ID NO: 2.

Termín "identita sekvencia" označuje identitu sekvencie aminokyseliny v tom, že aminokyseliny majú v peptide rovnakú identitu a pozíciu. Medzera je považovaná za neidentické miesto pre jednu alebo viac aminokyselín.

Také peptidy môžu obsahovať od 3 do 300 aminokyselín, napríklad aspoň 20 aminokyselín, aspoň 30 aminokyselín, aspoň 60 aminokyselín, aspoň 90 aminokyselín, aspoň 120 aminokyselín, aspoň 150 aminokyselín alebo aspoň 200 aminokyselín.

Spôsob izolácie proteínov matrice zubnej skloviny obsahuje extrakciu proteínov a odstránenie vápnikových a fosfátových iónov zo solubilizovaného hydroxyapatitu pri použití vhodnej metódy, ako je napríklad gélová filtrácia, dialýza alebo ultrafiltrácia (pozri napríklad Janson, J-C. and Rydén, L. ((ed.), Protein Purification, VCH Publishers 1989, a Harris, ELV and Angal, S. Protein Purification Methods - A practical approach, IRL Press, Oxford 1990).

Typický lyofilizovaný proteínový prostriedok obsahuje hlavne alebo výlučne až 70-90% amelanogeninov s molekulovou hmotnosťou (MW) medzi 40000 a 5000 daltony a 10-30% prostriedku tvoria menšie peptidy, soli a reziduálna voda. Hlavné proteínové prúžky majú 20 kDa, 12-14 kDa a približne 5 kDa.

Pomocou separovania proteínov, napríklad zrážaním, iónomeničovou chromatografiou, preparatívnou elektroforézou, gélovou vylučovacou chromatografiou, chromatografiou s reverznou fázou alebo afinitnou chromatografiou, môžu byť prečistené amelogeniny s rôznou molekulovou hmotnosťou.

Môžu byť pripravené rôzne kombinácie amelogeninov rôznych molekulových hmotností, od prevahy 20 kDa zlúčenín na agregovanie amelogeninov s rôznymi molekulovými hmotnosťami od 40 do 5 kDa, do prevahy 5 kDa zlúčenín. Iné proteíny matrice zubnej

skloviny, ako je amelin, tuftelin alebo proteolytické enzýmy normálne prítomné v matrici zubnej skloviny, môžu byť pridané do prostriedku a môžu byť nesené amelogeninovými agregátmi.

Alternatívne môžu byť deriváty alebo proteíny matrice zubnej skloviny získané synteticky, pri použití dobre v odbore známych techník, alebo pri použití kultivovaných buniek alebo baktérií modifikovaných technikami rekombinantnej DNA (pozri napríklad Sambrook, J. et al., Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989).

Fyzikálne-chemické vlastnosti matrice zubnej skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny a proteínov matrice zubnej skloviny

Všeobecne sú matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a proteíny matrice zubnej skloviny hydrofóbné substancie, tzn. sú špatne rozpustné vo vode, osobitne pri vyšších teplotách. Všeobecne sú tieto proteíny rozpustné pri nefyziologických hodnotách pH a pri nízkych teplotách, napríklad 4-20°C, zatiaľ čo pri telesnej teplote (35-37°C) a neutrálnom pH agregujú a zrážajú sa.

Matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a proteíny matrice zubnej skloviny pre použitie podľa predkladaného vynálezu tiež zahŕňajú aktívnu substanciu zubnej skloviny, kde aspoň časť aktívnej substancie zubnej skloviny je vo forme agregátov, alebo po aplikácii in vivo vytvára agregáty. Veľkosť častíc v agregátoch je od približne 20 nm do približne 1 µm.

Predpokladá sa, že rozpustnosť matrice zubnej skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny a proteínov matrice zubnej skloviny má význam pre profylaktickú a terapeutickú aktivitu substancí. Keď je prostriedok obsahujúci maticu zubnej sklo-

viny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny (ktoré sú spoločne označované ako "aktívne substancie zubnej skloviny") podaný napríklad ľuďom, tak sa proteínové substancie vyzrážajú pôsobením fyziologického pH. Tak sa v mieste aplikácie vytvorí vrstva matrice zubnej skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny a/alebo proteínov matrice zubnej skloviny a táto vrstva (ktorá môže byť tiež molekulárnou vrstvou v tých prípadoch, keď sa vytvoria agregáty) sa obťažne odplavuje za fyziologických podmienok. Ďalej, z dôvodu bioadhezívnych vlastností substancie (pozri ďalej) sa vyzrážaná vrstva pevne naviaže na tkanivo tiež v mieste hranice medzi vyzrážanou vrstvou a tkanivom. Proteínová vrstva tak pokryje tkanivo, na ktoré bola aplikovaná matrica zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny a aktívne substancie zubnej skloviny tak zostávajú v mieste aplikácie po dlhý čas, to znamená, že nie je nutné opakovanie aplikácie aktívnej substancie zubnej skloviny v krátkych intervaloch. Ďalej, vrstva vytvorená in situ sa prakticky vyrovná nepriedušnému obväzu, to znamená, že chráni tkanivo pred pôsobením okolitých vplyvov. V prípade poraneného tkaniva, infikované tkanivá alebo zápalové tkanivá chráni taká vrstva tkaniva pred ďalšou kontamináciou mikroorganizmami prítomnými v okolí. Ďalej, proteínová vrstva môže vykazovať svoj účinok priamym kontaktom s tkanivom alebo s mikroorganizmami prítomnými v tkanive alebo na tkanive.

Na umožnenie vzniku proteínovej vrstvy v mieste aplikácie môže byť výhodné použitie vhodných tlmiacich substancií vo farmaceutických alebo kozmetických prostriedkoch obsahujúcich matricu zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny; také tlmiace substancie môžu brániť rozpúšťaniu aktívnej substancie zubnej skloviny v mieste aplikácie.

Bolo tiež zistené, že matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a proteíny matrice zubnej skloviny majú bioadhezívne vlastnosti, tzn. že majú schopnosť adherovať na koži alebo na povrchy slizníc. Tieto vlastnosti sú významné pri terapeuticknej a/alebo profylaktickej liečbe z nasledujúcich dôvodov:

- profylaktické a/alebo terapeutické substancie môžu byť udržiavané v mieste aplikácie dlhší čas, to znamená, že (i) môže byť znížená frekvencia aplikácií; (ii) je možné dosiahnuť kontrolované uvoľňovanie aktívnej substancie; a/alebo (iii) zlepšuje sa lokálna liečba v mieste aplikácie;
- substancie môžu byť samotné použiteľné ako nosiče pre iné profylakticky alebo terapeuticky aktívne substancie, pretože nosič obsahujúci matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny môže byť pripravený ako bioadhezívny nosič (tzn. nový bioadhezívny systém na podanie liečiv založený na bioadhezívnych vlastnostiach matrice zubnej skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny a/alebo proteínov matrice zubnej skloviny).

Teória mechanizmu účinku

Matrica zubnej skloviny je príkladom extracelulárnej proteínovej matrice, ktorá adheruje na minerálne povrchy, rovnako ako na proteínové povrchy. Pri fyziologickom pH a teplote tvorí proteíny nerozpustné supra-molekulárne agregáty (Fincham et al., J. Struct. Biol., 1994, March-April, 112(2): 103-9 a J. Struct. Biol. 1995, July-August, 115(1):50-9), ktoré sú postupne degradované proteolytickými enzýmami (čo prebieha ako in vivo, tak in vitro, pokiaľ neboli proteázy inaktivované).

Nedávne pozorovania týkajúce sa toho, že matrica zubnej skloviny je tvorená a prechodne prítomná počas tvorby koreňov a koreňového cementu môžu vysvetliť to, ako môže aplikácia matrice zubnej skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny

a/alebo proteínov matrice zubnej skloviny podporovať regeneráciu periodontálneho tkaniva. Avšak zistenie, ktoré je základom predkladaného vynálezu, že matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny majú tiež pozitívny efekt na hojenie defektov mäkkých tkanív, ako sú rany, je veľmi prekvapivé. To rovnaké platí pre pozorovanie antiinfekčného a protizápalového účinku.

Pri mnohých druhoch sú zisťované zvyšky matrice zubnej skloviny v novo mineralizovaných korunkách zubov pri ich pre-rezávaní do dutiny ústnej. Je možné predpokladať, že nový zub je veľmi citlivý na bakteriálnu infekciu bežnými baktériami v dutine ústnej a že preto musí mať počas tejto iniciálnej fázy prirodzenú ochranu.

Aplikácia nerozpustnej matrice zubnej skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny a/alebo proteínov matrice zubnej skloviny s vhodnými antibakteriálnymi a/alebo protizápalovými vlastnosťami na povrch rán zlepší a zrýchli hojenie.

Ako bude uvedené v príkladoch, matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny alebo proteínové agregáty inhibujú bakteriálny rast kontaktnou inhibíciou, zatiaľ čo bunky vystavené pôsobeniu týchto substancií reagujú na maticu zubnej skloviny ako na normálne prostredie, ktoré potlačuje zápalové reakcie.

Podľa predkladaného vynálezu môžu byť matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny použité na kuratívne účely, rovnako ako na preventívne účely. Ďalej, matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny môžu byť použité spolu s inými aktívnymi činidlami, ako sú napríklad antibakteriálne, protizápalové, antivírusové, antimykotické činidlá, alebo môžu byť použité spolu s rasto-

vými faktormi, ako je napríklad TGF, PDGF, IGF, FGF, keratinocytový rastový faktor alebo ich peptidové analógy (predpokladá sa, že EGF podporuje hojenie zvýšením migrácie a delenia epitelových buniek; okrem toho zvyšuje EGF počet fibroblastov v rane, čo vedie k vyššej produkcii kolagénu). Enzýmy, hlavne proteázy - buď prirodzene prítomné v matrici zubnej skloviny alebo jej prípravku alebo pridané - môžu byť tiež použité v kombinácii s matricou zubnej skloviny, derivátmi matrice zubnej skloviny a/alebo proteínmi matrice zubnej skloviny.

Aktívna substancia zubnej skloviny je zvyčajne pripravená ako farmaceutický alebo kozmetický prostriedok. Taký prostriedok sa môže skladať z proteínového prípravku alebo môže ďalej obsahovať farmaceutický alebo kozmetický prijateľné prísady. Osobitne výhodnými prísadami pre použitie vo farmaceutických alebo kozmetických prípravkoch sú propylénglykolalginát alebo kyselina hyalurónová alebo ich deriváty.

Farmaceutické a/alebo kozmetické prostriedky

V nasledujúcom texte sú opísané príklady vhodných prostriedkov obsahujúcich aktívnu substanciu zubnej skloviny. V závislosti od použitia aktívnej substancie zubnej skloviny môže byť prostriedok farmaceutický alebo kozmetický prostriedok. Termín "farmaceutický prostriedok" v ďalšom opise zahŕňa kozmetické prostriedky, rovnako ako prostriedky spadajúce do takzvanej šedej zóny medzi farmaceutickými prostriedkami a kozmetickými prostriedkami.

Na podanie jedincom (zvieratám alebo ľuďom) sú matrice zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny (tiež označované súhrnne ako "aktívne substancie zubnej skloviny") a/alebo ich prípravky výhodne pripravené ako farmaceutické prostriedky obsahujúce

aktívnu substanciu zubnej skloviny a voliteľne jednu alebo viac farmaceuticky prijateľných prísad.

Prostriedky môžu byť vo forme pevných, polopevných alebo kvapalných prostriedkov, ako sú napríklad:

- bioabsorbovateľné náplasti, drenáže, obvazy, hydrogélové obvazy, hydrokoloidné obvazy, filmy, peny, poťahy, bandáže, prostriedky na podanie liečiv, implantáty;
- prášky, granuly, granuláty, kapsuly, agarózové alebo chitosánové korálky, tablety, pilulky, mikrokapsuly, mikrosféry, nanočastice;
- spreje, aerosoly, inhalačné prostriedky;
- gély, hydrogély, pasty, masti, krémy, mydlá, čapíky, vaginálne prostriedky, zubné pasty;
- roztoky, disperzie, suspenzie, emulzie, zmesi, pleťové vody, ústne vody, šampóny, nálevy;
- kity obsahujúce napríklad dva samostatné zásobníky, kde prvý zásobník obsahuje aktívnu substanciu zubnej skloviny, voliteľne v zmesi s iným aktívnym liekom a/alebo farmaceuticky prijateľnými prísadami a druhý zásobník obsahuje vhodné médium určené na pridanie do prvého zásobníku pred použitím za zisku prostriedku určeného na okamžité použitie;
- iné vhodné formy, ako sú implantáty alebo poťahy implantátov alebo formy vhodné na použitie pri implantáciách alebo transplantáciách.

V predkladanom vynáleze sú najdôležitejšie prostriedky pre aplikáciu na kožu alebo na sliznicu. Prostriedok obsahujúci aktívnu substanciu zubnej skloviny môže byť podaný akýmkoľvek vhodným spôsobom, napríklad lokálne (dermálne), bukálne, orálne, nazálne, intraaurikulárne, rektálne alebo vaginálne, alebo môže byť podaný do teľnej dutiny, ako je napríklad koreň zubu alebo koreňový kanálik zubu. Ďalej môže byť prostriedok pripravený na použitie pri chirurgických výkonoch,

napríklad pri incisiiách, keď uľahčí hojenie vnútorných rán a poranených mäkkých tkanív.

Ako bolo uvedené hore, prostriedky obsahujúce aktívnu substanciu zubnej skloviny môžu byť vhodné na použitie počas chirurgických výkonoch, napríklad na lokálnu aplikáciu (napríklad do dutiny ústnej, vo forme gélov, filmov alebo suchých peliet, alebo môžu byť použité vo forme roztokov na preplachovanie alebo môžu byť pripravené ako pasty alebo krémy na aplikáciu na tkanivá alebo povrchy, kde bránia bakteriálnej infekcii. Pre operačné výkony alebo implantácie v oblasti kořenového kanálku zubu môže byť na uzatvorenie dutiny použitá pasta.

Prostriedky môžu byť pripravené bežnými farmaceutickými technikami, pozri napríklad "Remington's Pharmaceutical Sciences" a "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology", Swarbrick, J. and J.C. Boylan, Marcel Dekker, Inc., New York, 1988.

Ako bolo uvedené hore, prostriedky obsahujúce aktívnu substanciu zubnej skloviny sú určené na aplikáciu na kožu alebo na sliznicu. Ďalšie aplikácie sú takisto možné, napríklad aplikácie na umelý chrup, protézy, implantáty a aplikácie do teľných dutín, ako je dutina ústna, nosná a poševná. Sliznicou je výhodne sliznica dutiny ústnej, nosnej, sliznica tváři, ucha, rekta a vagíny. Ďalej môžu byť prostriedky aplikované priamo na rany alebo na poranenia mäkkých tkanív.

Ďalšou významnou aplikáciou je aplikácia v dentálnych/odontologických oblastiach. Príkladom je aplikácia do periondontálnych (dentálnych) chobotov, na ďasná alebo na poranenia ďasien alebo na iné rany v dutine ústnej, alebo pri chirurgických výkonoch v dutine ústnej.

Ďalej sa predpokladá, že vďaka antibakteriálnym vlastnostiam aktívnej substancie zubnej skloviny môže byť výhodná jej aplikácia na zuby alebo na zubné korene na prevenciu kazu a/alebo povlaku. Toto použitie podporuje zistenie (Weinmann, J.P. et al., Hereditary disturbances of enamel formation and calcification, J. Amer. Dent. Ass. 32: 397-418, 1945; Sundell, S. Hereditary amelogenesis imperfecta. An epidemiologic, genetic and clinical study in Swedish child population, Swed. Dent. J. Suppl. 1986, 31: 1-38), že nedokonale vyvinuté zuby (amelogenesis imperfecta), ktoré v dôsledku toho obsahujú značné množstvo amelogenínov, sú značne rezistentné voči zubnému kazu.

Farmaceutické prostriedky obsahujúce aktívnu substanciu zubnej skloviny slúžia ako systém na podanie liečiv. Termín "systém na podanie liečiv", ako je tu použitý, označuje farmaceutický prostriedok alebo dávkovú formu, ktorý po podaní uvoľňuje aktívne substancie do tela človeka alebo zvierata. Termín "systém na podanie liečiv" preto zahŕňa jednoduché farmaceutické prostriedky, ako sú napríklad krémy, masti, kvapalné prostriedky, prášky, tablety apod., rovnako ako zložitejšie prostriedky, ako sú spreje, náplasti, obväzy, bandáže a iné prostriedky.

Okrem aktívnej substancie zubnej skloviny môže farmaceutický prostriedok podľa predkladaného vynálezu obsahovať farmaceuticky alebo kozmeticky prijateľné prísady.

Farmaceuticky alebo kozmeticky prijateľná prísada je substancia, ktorá je v podstate neškodná pre jedinca, ktorému je prostriedok podaný. Také prísady zvyčajne spĺňajú požiadavky dané národnými zdravotníckymi úradmi. Oficiálne liekopisy, ako je napríklad British Pharmacopoeia, United States of America Pharmacopoeia a The European Pharmacopoeia, uvádzajú štandardy pre farmaceuticky prijateľné prísady.

To, aká farmaceuticky prijateľná prísada je vhodná na použitie vo farmaceutickom prostriedku, všeobecne závisí od vybranej dávkovej formy pre použitie na určitý typ rán. Ďalej sú uvedené príklady vhodných farmaceuticky prijateľných prísad pre rôzne prostriedky podľa predkladaného vynálezu.

Ďalej je uvedený prehľad farmaceutických prostriedkov podľa predkladaného vynálezu. Prehľad je založený na spôsobe podania prostriedku. Avšak je potrebné si uvedomiť, že pokiaľ môže byť farmaceuticky prijateľná prísada použitá v rôznych dávkových formách alebo prostriedkoch, tak nie je použitie farmaceuticky prijateľnej prísady obmedzené na určitú dávkovú formu alebo na určitú funkciu prísady.

Voľba farmaceuticky prijateľnej prísady v prostriedkoch podľa predkladaného vynálezu a jej optimálna koncentrácia nemôže byť zvyčajne stanovená vopred a musí byť určená podľa experimentálneho testovania konečného prostriedku. Avšak odborníci v odbore sa môžu orientovať napríklad podľa "Remington's Pharmaceutical Sciences", 18.vydanie, Mack Publishing Company, Easton, 1990.

Prostriedky na lokálne podanie

Pre aplikáciu na kožu alebo na sliznicu môžu obsahovať prostriedky podľa predkladaného vynálezu bežné netoxické farmaceuticky prijateľné nosiče a prísady, vrátane mikrosfér a lipozómov.

Prostriedky podľa predkladaného vynálezu zahŕňajú všetky typy pevných, polopevných a kvapalných prostriedkov. Osobitne významnými prostriedkami sú napríklad pasty, masti, hydrofilné masti, krémy, gély, hydrogély, roztoky, emulzie, suspenzie, pletkové vody, masti, šampóny, želé, mydlá, tyčinky, spreje,

prášky, filmy, peny, tampóny, tampóny (napríklad kolagénové tampóny), obvazy (napríklad absorpčné obvazy), drenáže, bandáže, náplasti a systémy pre transdermálne podanie.

Farmaceuticky prijateľnými prísadami môžu byť rozpúšťadlá, tlmiace činidlá, konzervačné činidlá, zvlhčovacie činidlá, chelatačné činidlá, antioxidačné činidlá, stabilizačné činidlá, emulgačné činidlá, suspendačné činidlá, gélotvorné činidlá, masťové základy, činidlá zosilňujúce prienik do tkanív, parfumovacie činidlá a činidlá chrániace pokožku.

Príkladmi rozpúšťadiel sú napríklad voda, alkoholy, rastlinné alebo rybie oleje (napríklad jedlé oleje ako je mandľový olej, ricínový olej, kakaové maslo, kokosový olej, kukuričný olej, bavlníkový olej, ľanový olej, olivový olej, palmový olej, podzemnicový olej, makový olej, repkový olej, sezamový olej, sójový olej, slnečnicový olej, čajovníkový olej), anorganické oleje, mastné oleje, kvapalný parafín, polyetylén-glykoly, glycerol, kvapalné polyalkylsiloxány a ich zmesi.

Príkladmi tlmiacich činidiel sú kyselina citrónová, kyselina octová, kyselina vínna, kyselina mliečna, kyselina hydrogenfosforečná, dietylamín apod.

Príkladmi konzervačných činidiel pre použitie v prostriedkoch sú parabény, ako je metyl-, etyl-, propyl-p-hydroxybenzoát, butylparabén, izobutylparabén, izopropylparabén, sorbát draselný, kyselina sorbová, kyselina benzoová, metylbenzoát, fenoxietanol, bronopol, bronidox, MDM hydantoin, jodopropynylbutylkarbamát, EDTA, benzalkóniumchlorid a benzylalkohol, alebo zmesi konzervačných činidiel.

Príkladmi zvlhčovacích činidiel sú glycerín, propylén-glykol, sorbitol, kyselina mliečna, močovina a ich zmesi.

Príkladmi chelatačných činidiel sú sodná soľ EDTA a kyselina citrónová.

Príkladmi antioxidačných činidiel sú butylovaný hydroxyanizol (BHA), kyselina askorbová a jej deriváty, tokoferol a jeho deriváty, cysteín a ich zmesi.

Príkladmi emulgačných činidiel sú prirodzené živice, napríklad arabská guma alebo tragant; prirodzené fosfatidy, napríklad sójový lecitín; deriváty sorbitánmonooleátu; lanolín; alkoholy z dreva; sorbitánové estery; monoglyceridy; mastné alkoholy; estery mastných kyselín (napríklad triglyceridy mastných kyselín); a ich zmesi.

Príkladmi suspendačných činidiel sú napríklad celulózy a deriváty celulózy ako je napríklad karboxymetylcelulóza, hydroxyetylcelulóza, hydroxypropylcelulóza, hydroxypropylmetylcelulóza, karagén, arabská guma, tragant, a ich zmesi.

Príkladmi gélových základov, činidiel zvyšujúcich viskozitu alebo zložiek vychytávajúcich exsudát z rany sú: kvapalný parafín, polyetylén, mastné oleje, koloidný oxid kremičitý alebo hliník, zinkové mydlá, glycerol, propylénglykol, tragant, karboxyvinylpolyméry, silikáty horečnato-hlinité, Carbo-pol^R, hydrofilné polyméry ako je napríklad škrob alebo deriváty celulózy, napríklad karboxymetylcelulóza, hydroxyetylcelulóza a iné deriváty celulózy, hydrokoloidy napúčajúce vo vode, karagény, hyaluronáty (napríklad hyaluronátový gél voliteľne obsahujúci chlorid sodný) a algináty vrátane propylénglykol alginátu.

Príkladmi masťových základov sú včelí vosk, parafín, cetanol, cetylpalmitát, rastlinné oleje, sorbitánové estery mastných kyselín (Span), polyetylénglykoly a produkty kondenzácie medzi sorbitánovými esterami mastných kyselín a ety-

lénoxidom, ako je napríklad polyoxyetylénsorbitán-monooleát (Tween).

Príkladmi hydrofóbných alebo vo vode emulzifikujúcich masťových základov sú parafíny, rastlinné oleje, živočíšne tuky, vosky, lanolín a kvapalné polyalkylsiloxány.

Príkladmi hydrofilných masťových báz sú pevné makrogoly (polyetylénglykoly).

Príkladmi masťových báz sú trietanolamínové mydlá, sulfátované masťné alkoholy a polysorbáty.

Príkladmi práškových zložiek sú: alginát, laktóza, prášok, ktorý tvorí gél po aplikácii na ranu (absorbuje kvapalinu/exsudát z rany). Prášok určený na aplikáciu na rozsiahle otvorené rany musí byť sterilný a prítomné častice musia byť mikronizované.

Príkladmi ďalších zložiek sú polyméry, ako je karmelóza, karmelóza sodná, hydroxypropylmetylcelulóza, hydroxyetylcelulóza, hydroxypropylcelulóza, pektín, xantánová živica, chlebovníková živica, arabská guma, želatína, karbomér, emulzifikátory ako je vitamín E, glycerylstearáty, cetanylglukozid, kolagén, karagén, hyaluronáty a algináty a kitosány.

Obväzy a/alebo bandáže sú tiež významným systémom pre podanie aktívnej substancie zubnej skloviny. Pokiaľ sú obväzy použité ako dávkové formy, tak môže byť aktívna substancia zubnej skloviny zmiešaná s inými materiálmi/zložkami pred alebo počas výroby obväzu, alebo môže byť aktívna substancia zubnej skloviny dajakým spôsobom nanesená na obväz, napríklad ponorením obväzu do roztoku alebo disperzie aktívnej substancie zubnej skloviny alebo nastriekaním roztoku aktívnej substancie zubnej skloviny na obväz. Alternatívne môže byť

aktívna substancia zubnej skloviny aplikovaná na obväz vo forme prášku. Obväzy môžu byť absorpčné obväzy na aplikáciu na exudujúcie rany. Obväzy môžu byť takisto vo forme hydrogélových obväzov (napríklad vo forme zosítených polymérov, ako je Intrasil^R, ktorý obsahuje karboxymetylcelulózu, propylén-glykol alebo polysacharid, disacharid a proteíny) alebo vo forme okluzívneho obväzu, ako sú napríklad alginátové, chitosánové, hydrofilné polyuretánové filmy, kolagénové obväzy, prášky, peny, porózne obväzy, peny (napríklad polyuretánové alebo silikónové), hydrokoloidné obväzy (napríklad karboxymetylcelulózo-²vé, CMC), obväzy na báze kolagénu alebo kyseliny hyalurónovej, alebo ich kombinácie.

Alginátové, chitosánové a hydrokoloidné obväzy absorbujú po umiestnení na ranu exsudát. Pri tejto absorpcii vytvárajú vodný gél na povrchu rany a predpokladá sa, že tento gél je výhodný pre hojenie rany, pretože udržiava vlhké prostredie v oblasti rany.

Tiež sa predpokladá, že aktívna substancia zubnej skloviny môže byť obsiahnutá v prostriedku adherujúcom k tkanivu, ktorý ďalej obsahuje napríklad fibrinogén a voliteľne faktor XIII alebo iný plazmatický koagulačný faktor na zabránenie krvácania. Tkanivový adhezívny prostriedok môže byť pripravený buď ako vopred pripravená zmes aktívnej substancie zubnej skloviny, fibrinogénu a voliteľne faktoru XIII, a trombín je pridaný k tejto zmesi bezprostredne pred aplikáciou tohto prostriedku na ranu. Alternatívne môže byť vopred pripravená zmes aktívnej substancie zubnej skloviny, fibrinogénu a voliteľne faktoru XIII aplikovaná na ranu pred aplikáciou trombínu. In situ mení trombín fibrinogén na fibrín, čo napodobuje prirodzený proces koagulácie, ktorý prebieha pri hojení rany. Prítomnosť aktívnej substancie zubnej skloviny v tkanivovom adhezívnom prostriedku môže urýchliť hojenie rany, ako bolo opísané hore. Komerčný výrobok vhodný na obsiahnutie aktívnej

substancie zubnej skloviny je Tisseel^R, dvojzložkový fibrínový tesniaci materiál vyrábaný Immuno, AG, Viedeň, Rakúsko.

V zubnej paste alebo v ústnej vode alebo v inom prostriedku na aplikáciu na chrup alebo na korene zubov môže byť aktívna substancia zubnej skloviny prítomná buď v rozpustenom stave vo vehikulu s mierne kyslým pH, alebo vo forme disperzie vo vehikule s neutrálnym pH. Predpokladá sa, že použitie aktívnej substancie zubnej skloviny môže vytvoriť ochrannú vrstvu na povrchu zubu, čo bráni väzbe baktérií spôsobujúcich zubný kaz (pozri príklad 4). V takých prostriedkoch starostlivosti o chrup môže byť aktívna substancia zubnej skloviny prítomná spolu s jednou alebo viacerými zlúčeninami, ktoré majú preventívny účinok na zubný kaz, zvyčajne s fluórom alebo iný stopovým prvkom ako je vanád alebo molybdén. Pri neutrálnom pH sa predpokladá väzba stopového prvku (napríklad iónová väzba) na aktívnu substanciu zubnej skloviny, z ktorej je tento prvok majúci účinnosť proti zubnému kazu uvoľňovaný pri rozpustení aktívnej substancie zubnej skloviny pri pH približne 5,5 alebo nižšom, ktoré je spôsobené napríklad produkciou kyselín baktériami spôsobujúcimi zubný kaz.

Prostriedky na lokálne podanie uvedené hore sú najvhodnejšie na aplikáciu priamo na ranu a sú takisto vhodné na aplikáciu alebo zavedenie do rôznych teľných otvorov, napríklad do uretry, rekta, pošvy, ucha, nosu alebo úst. Prostriedok môže byť aplikovaný priamo na liečenú oblasť, napríklad na sliznicu, alebo môže byť aplikovaný akýmkoľvek vhodným spôsobom podania.

Pre lokálne podanie sú významné tie prostriedky, ktoré majú tixotropné vlastnosti, tzn. ich viskozita je ovplyvnená napríklad pretrepaním alebo premiesením tak, že v čase podania môže byť viskozita znížená a po aplikácii sa viskozita zvyšuje, takže prostriedok zostáva v mieste aplikácie.

Prostriedky na orálne použitie alebo na aplikáciu na sliznicu alebo na kožu

Prostriedky podľa predkladaného vynálezu môžu byť pripravené takisto vo forme suspenzií, emulzií alebo disperzií. Také prostriedky obsahujú aktívnu substanciu zubnej skloviny v zmesi s disperzným alebo namáčivým činidlom, suspenlačným činidlom a/alebo s jedným alebo viacerými konzervačnými činidlami a inými farmaceuticky prijateľnými prísadami. Také prostriedky môžu byť vhodné na dopravenie aktívnej substancie zubnej skloviny na napríklad intaktnú alebo poranenú sliznicu, ako je orálna, bukálna, nazálna, rektálna alebo vaginálna sliznica, alebo na dodanie aktívnej substancie na intaktnú alebo poranenú kožu alebo na rany.

Vhodnými disperznými alebo namáčivými činidlami sú napríklad prirodzené fosfatidy, ako je lecitín alebo sójový lecitín; produkty kondenzácie medzi etylénoxidom a napríklad mastnými kyselinami, alifatické alkoholy s dlhým reťazcom, alebo čiastočné estery mastných kyselín a anhydrid hexitolu, ako je napríklad polyoxyetylénstearát, polyoxyetylénsorbitolmonooleát, polyoxyetylénsorbitánmonooleát apod.

Vhodnými suspenlačnými činidlami sú napríklad, prirodzené živice, ako je napríklad arabská guma, xantánová živica, tragant; celulózy, ako je napríklad karboxymetylcelulóza sodná, mikrokryštalická celulóza (napríklad Avicel^R RC 591, metylcelulóza); algináty a chitosány, ako je napríklad alginát sodný apod.

Príklady konzervačných činidiel vhodných na použitie v prostriedkoch podľa predkladaného vynálezu sú rovnaké, ako boli konzervačné činidlá uvedené hore.

Prostriedky na použitie podľa predkladaného vynálezu môžu byť takisto podané orálne. Orálne prostriedky môžu byť vo forme časticových prostriedkov alebo vo forme pevných, polopevných alebo kvapalných dávkových foriem.

Medzi prostriedky na orálne podanie patria napríklad prášky, granuly, granuláty, parfumový prášok, tablety, kapsuly, šumivé tablety, žuvacie prostriedky, medicínske obličky, tablety s okamžitým uvoľňovaním a tablety s modifikovaným uvoľňovaním, rovnako ako kvapalné alebo tekuté prostriedky ako sú roztoky, suspenzie, emulzie, disperzie a zmesi. Ďalej môžu byť prostriedky vo forme práškov, dispergovateľných práškov alebo granúl vhodných na prípravu vodnej suspenzie po pridaní kvapalného média, ako je napríklad vodné médium.

Pevné dávkové formy na orálne (alebo na lokálne) použitie podľa predkladaného vynálezu zvyčajne obsahujú aktívnu substanciu zubnej skloviny a akékoľvek ďalšie aktívne substancie, voliteľne v zmesi s jednou alebo viacerými farmaceuticky prijateľnými prísadami. Týmito prísadami môžu byť napríklad:

- inertné riedidlá alebo plnivá, ako je sacharóza, sorbitol, cukor, manitol, mikrokryštalická celulóza, škroby vrátane zemiakového škrobu, uhličitan vápenatý, chlorid sodný, laktóza, fosforečnan vápenatý, síran vápenatý alebo fosforečnan sodný;
- činidlá uľahčujúce granulovanie a činidlá podporujúce rozpadavosť, ako sú napríklad deriváty celulózy, vrátane mikrokryštalickej celulózy, škroby, vrátane zemiakového škrobu, kroskarmelóza sodná, algináty alebo kyselina alginová a chitosány;
- spojivá, ako je napríklad sacharóza, glukóza, sorbitol, arabská guma, kyselina alginová, alginat sodný, želatína, škrob, vopred želatinizovaný škrob, mikrokryštalická celulózasilikát horečnato-hlinitý, karboxymetylcelulóza sodná,

metylcelulóza, hydroxypropylmetylcelulóza, etylcelulóza, polyvinylpyrolidón, polyvinylacetát alebo polyetylén glykol; a chitosány;

- klzné činidlá, ako sú klzné činidlá a antiadhezívne činidlá, napríklad stearan horečnatý, stearan zinočnatý, kyselina stearová, kremičitany, hydrogenované rastlinné oleje alebo talk.

Ďalšími farmaceuticky prijateľnými prísadami môžu byť farbivá, chuťová prísady, zmäkčovacie činidlá, zvlhčovacie činidlá, tlmiace činidlá apod.

V prípadoch, že je farmaceutický prostriedok vo forme pevnej dávkovej formy v jednotkových dávkach (napríklad tabletách alebo kapsulách), tak môže byť jednotková dávka opatrená poťahom, ako sú napríklad opísané ďalej.

V prípade, že je prostriedok vo forme tablety, kapsuly alebo prostriedku tvoreného viacerými jednotkami, tak môžu byť prostriedok alebo jednotlivé jednotky alebo tablety alebo kapsuly obsahujúce jednotlivé jednotky potiahnuté napríklad cukrovým povlakom, filmom (napríklad na báze hydroxypropylmetylcelulózy, metylcelulózy, metylhydroxyetylcelulózy, hydroxypropylcelulózy, karboxymetylcelulózy, akrylátových kopolymérov (Eudragit), polyetylén glykolov a/alebo polyvinylpyrolidónu) alebo enterálnym poťahom (napríklad na báze kopolymérov kyseliny metakrylovej (Eudragit), celulózaacetátftalátu, hydroxypropylmetylcelulóza-acetátsukcinátu, polyvinylacetátftalátu, šelaku a/alebo etylcelulózy). Ďalej môžu byť použité materiály predlžujúce uvoľňovanie, ako je napríklad glycerylmonostearát alebo glyceryldistearát.

Rektálne a/alebo vaginálne prostriedky

Na aplikáciu na rektálnu alebo vaginálnu sliznicu patria medzi vhodné prostriedky podľa predkladaného vynálezu čapíky (typu emulzia alebo suspenzia), nálevy a rektálne želatínové kapsuly (roztoky alebo suspenzie). Vhodnými farmaceuticky prijateľnými čapíkovými bázami sú kakaové maslo, esterifikované mastné kyseliny, glycerínovaná želatína a rôzne bázy rozpustné alebo dispergovateľné vo vode, ako sú polyetylénglykoly a polyoxyetylén-sorbitánové estery mastných kyselín. Môžu byť použité rôzne pomocné činidlá, ako sú napríklad činidlá zvyšujúce vstrebávanie alebo surfaktanty.

Nazálne prostriedky

Na aplikáciu na nosnú sliznicu (rovnako ako na sliznicu dutiny ústnej) sú vhodnými prostriedkami podľa predkladaného vynálezu spreje a aerosoly na inhaláciu. V typickom nazálnom prostriedku je aktívna substancia zubnej skloviny prítomná vo forme častíc voliteľne dispergovaných vo vhodnom vehikule. Farmaceuticky prijateľné vehikulá a prísady a voliteľne ďalšie farmaceuticky prijateľné materiály, ako sú riedidlá, činidlá zvyšujúce absorpciu, chuťové prísady, konzervačné činidlá apod., sú vybrané podľa bežných pravidiel prípravy farmaceutických prostriedkov.

Dávkovanie matrice zubnej skloviny, derivátov matrice zubnej skloviny a proteínov matrice zubnej skloviny

Vo farmaceutických prostriedkoch podľa predkladaného vynálezu na aplikáciu na kožu alebo na sliznicu je aktívna substancia zubnej skloviny zvyčajne prítomná v koncentrácii v rozmedzí od približne 0,01% do približne 99,9% hmotn./hmotn. Množstvo aplikovaného prostriedku zodpovedá množstvu celkového

proteínu na cm^2 poranenie/koža/tkanivo, ktoré je v rozmedzí od približne $0,01 \text{ mg/cm}^2$ do približne 20 mg/cm^2 , napríklad od približne $0,1 \text{ mg/cm}^2$ do približne 15 mg/cm^2 .

Množstvo aplikovaného prostriedku závisí od koncentrácie aktívnej substancie zubnej skloviny v prostriedku a od rýchlosti uvoľňovania aktívnej substancie zubnej skloviny z prostriedku, ale zvyčajne je v rozmedzí približne $15\text{-}20 \text{ mg/cm}^2$.

V prípadoch, keď je aktívna substancia zubnej skloviny podaná vo forme kvapalného prostriedku, je koncentrácia aktívnej substancie zubnej skloviny v prostriedku v rozmedzí od približne $0,1$ do približne 50 mg/ml . V niektorých prípadoch sú žiadúce vyššie koncentrácie a môžu byť získané koncentrácie až 100 mg/ml .

Pri aplikácii prostriedku do dutiny ústnej sú použiteľné nasledujúce dávky:

Experimentálne defekty (u opíc) v dutine ústnej majú veľkosť zvyčajne približne $4 \times 2 \times 5\text{-}6 \text{ mm}$, čo vyžaduje aplikáciu $50 \mu\text{l}$ alebo približne $0,025$ až $0,15 \text{ mg}$ celkového proteínu/ mm^2 alebo približne $2,5\text{-}15 \text{ mg/cm}^2$. Obyčajne sa aplikuje do $0,5$, napríklad $0,4$, $0,3$, $0,2$ alebo $0,1 \text{ ml}$ prostriedku majúceho koncentráciu približne $1\text{-}40 \text{ mg/ml}$, napríklad $5\text{-}30 \text{ mg/ml}$.

Defekty v dutine ústnej u ľudí spôsobené ochorením periodontu majú zvyčajne veľkosť $5\text{-}10 \times 2\text{-}4 \times 5\text{-}10 \text{ mm}$, čo zodpovedá približne $200 \mu\text{l}$ a zvyčajne je na jeden zub aplikované približne $0,5\text{-}1 \text{ ml}$, napríklad $0,2\text{-}0,3 \text{ ml}$, prostriedku majúceho koncentráciu približne $1\text{-}40 \text{ mg}$ celkového proteínu/ ml , napríklad $5\text{-}30 \text{ mg/ml}$. $0,2\text{-}0,3 \text{ mg/ml}$ zodpovedá približne 6 mg proteínu na $25\text{-}100 \text{ mm}^2$ alebo približne $0,1 \text{ mg/mm}^2$, pokiaľ sa

výpočet vykonáva iba pre povrch koreňa. Zvyčajne sa aplikuje väčší objem, aby sa dosiahlo pokrytie všetkých povrchov. I aplikácia vo viacerých vrstvách vyžaduje len malú frakciu hore uvedených množstiev.

Zvyčajne sa do defektu v extrakčnej dutine (otvore po extrakcii zubu) aplikuje približne 0,1-0,5 ml, napríklad približne 0,15-0,3 ml alebo približne 0,25-0,35 ml prostriedku obsahujúceho aktívnu substanciu zubnej skloviny. Koncentrácia aktívnej substancie zubnej skloviny v prostriedku je zvyčajne 1-40 mg celkového proteínu/ml, ako napríklad 5-30 mg/ml. Keď sa 0,3-0,4 ml takého prostriedku aplikuje pri extrakcii zubu múdrosti, tak tento objem zodpovedá približne 0,1 mg/cm² (dutina sa berie ako valec s priemerom 5 mm a hĺbkou 20 mm).

Koncentrácia aktívnej substancie zubnej skloviny vo farmaceutickom prostriedku závisí od typu substancie zubnej skloviny, jej účinnosti, závažnosti liečeného ochorenia a od veku a celkového stavu pacienta. Spôsoby na stanovenie vhodných koncentrácií aktívnej substancie zubnej skloviny vo farmaceutických prostriedkoch sú v odbore dobre známe a môžu byť vykonané podľa pravidiel "Guidelines for good clinical practice" (GCP) alebo Investigational New Drug Exemption ("IND"), ako sú opísané napríklad v International Standard ISO/DIS 14155 Clinical Investigation of Medical Devices, 1994, a v ICH (International Committee for Harmonisation): harmonised tripartite guideline for good clinical practice, Brookwood Medical Publications, Ltd., Surrey, UK, 1996. Odborník v odbore bude schopný pri použití spôsobov opísaných v štandardných učebniciach, návodoch a pravidlách opísaných hore, a všeobecných znalostí odboru, vyberať presné dávkovanie pre akúkoľvek aktívnu substanciu zubnej skloviny a/alebo vybrané ďalšie substancie a dávkové formy, pri realizácii iba bežných pokusných postupov.

V ďalších aspektoch sa predkladaný vynález týka spôsobov (i) prevencie a/alebo liečby rán; (ii) zníženia infekcií; a (iii) prevencie a/alebo liečby zápalov, kde uvedený spôsob obsahuje podanie účinného množstva aktívnej substancie zubnej skloviny takému cicavcovi.

Je potrebné si uvedomiť, že podrobnosti týkajúce sa použitia aktívnej substancie zubnej skloviny na prevenciu a/alebo terapiu rán sú rovnaké alebo analogické ako podrobnosti týkajúce sa iných aspektov použitia (antibakteriálneho a protizápalového použitia), čo znamená, že opis týkajúci sa aktívnej substancie zubnej skloviny, prípravkov obsahujúcich aktívnu substanciu zubnej skloviny, farmaceutických prostriedkov obsahujúcich aktívnu substanciu zubnej skloviny, prípravy (i) aktívnej substancie zubnej skloviny, (ii) prípravkov obsahujúcich aktívnu substanciu zubnej skloviny a (iii) farmaceutických prostriedkov obsahujúcich aktívnu substanciu zubnej skloviny, rovnako ako ich zlepšených vlastností a použitia, je možné aplikovať na všetky aspekty predkladaného vynálezu.

Opis obrázkov na pripojených výkresoch

Obr. 1 je graf ukazujúci syntézu DNA v ľudských PLD bunkách stimulovaných EMD alebo nestimulovaných EMD;

Obr. 2 je graf ukazujúci produkciu TGF- β 1 v ľudských PLD bunkách stimulovaných EMD alebo nestimulovaných EMD;

Obr. 3 je schematické znázornenie prietokovej komôrky a počítačového systému, ktoré boli použité v prietokových pokusoch opísaných v príkladoch 3 a 4;

Obr. 4, 5 a 6 sú grafy ukazujúce výsledky troch samostatných pokusov ukazujúcich väzbu *Actinomyces viscosus* na sklenené

platne spracované EMD a kyselinou octovou, v príslušnom poradí;

Obr. 7, 8 a 9 sú grafy ukazujúce výsledky troch samostatných pokusov ukazujúcich väzbu *Streptococcus mutans* na sklenené platne spracované EMD a kyselinou octovou, v príslušnom poradí;

Obr. 10A je röntgenová snímka ukazujúca pooperačný defekt po odstránení zubu múdrosti; a

Obr. 10B je röntgenová snímka ukazujúca regeneráciu periodontálneho ligamentu po liečbe EMD, ako je opísaná v príklade 12.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Materiály a metódy

Derivát matrice zubnej skloviny, EMDOGAIN^R, od BIORA AB, S-205, Malmö, Švédsko, obsahuje 30 mg lyofilizovaného proteínu matrice zubnej skloviny (skratka EMD) a 1 ml roztoku ako nosiča (propylénglykol-alginát), ktoré sú zmiešané pred aplikáciou, pokiaľ nie sú proteín a nosič testované samostatne. Hmotnostný pomer medzi hlavnými proteínovými pikmi v 20, 14 a 5 kDa je 85:5:10, v príslušnom poradí. Tepelne spracovaný EMD je EMD, ktorý bol zahrievaný počas 3 hodín pri približne 80°C na inaktiváciu zvyškových proteáz.

Amelogenínový proteín (20 kDa) a amelogenínový peptid bohatý na tyrozín (TRAP) (5 kDa) boli izolované z EMD pri použití HPLC gélovej vylučovacej chromatografie (TSK G-2000 SW uvedená do rovnováhy pri použití 30% acetonitrilu v 0,9% NaCl) a boli prečistené pomocou chromatografie s reverznou fázou (Pro-RPC, HR 5/10, Pharmacia Upjohn, Švédsko), pri po-

užití gradientu acetonitrilu. Separované proteíny/peptidy boli potom pridávané v rôznych množstvách do roztoku nosiča (EMDO-GAIN^R), pokiaľ neboli testované samostatne.

Kyselina hyalurónová bola HMT-0028 (MW 990000) od Seikagaku Corporation, Tokyo, Japonsko.

Baktérie a kvasinky boli všetky primárne izolované od pacientov a boli klasifikované podľa metabolických a anti-génnych vlastností pri použití štandardných postupov. Druhy použitých baktérií a kvasiniek sú uvedené v tabuľke uvedenej ďalej.

Sérový albumín (hovädzí) a kolagén 1 typu (hovädzí) boli obidva získané od Sigma, S.Louis, USA.

Agarové platne boli všetky "Brain Hart Infusion agar" od Difco doplnený ľudskými erytrocytmi (100 ml/liter agaru).

Príklad 1: Proliferácia buniek a produkcia TGF- β 1 v PDL bunkách ošetrovaných EMDOGAINOM^R

Rezervný roztok EMD bol pripravený rozpustením skúmavky (obsahujúcej 30 mg EMD) v 3 ml 0,1% Hac sterilizovanej filtrácie. 60 μ l EMD rezervného roztoku bolo pridaných k 6000 μ l Dulbeccovho modifikovaného Eaglovho média obsahujúceho 10% fetálne telacie sérum a 1% roztoku penicilínu-streptomycínu. 300 μ g zmesi bolo pridaných do každej jamky 96-jamkových mikrotitračných platní (NUNC A/S, Dánsko, katal. č. 167008). 1000 buniek z ľudského periodontálneho ligamentu (PDL) (získaných zo zdravého ľudského periodontálneho tkaniva od jedincov po extrakcii premolárov z ortodontických dôvodov a kultivovaných spôsobom opísaným v Somerman et al., J. Dental Res. 67: 66-70, 1988), sa pridalo do každej jamky a vykonala sa inkubácia pri 37°C, 5% CO₂ počas 5 dní.

PDL bunky použité ako kontroly boli kultivované v Dulbeccovom modifikovanom Eaglovom médiu spôsobom opísaným hore, ale za neprítomnosti EMD.

Po inkubácii boli bunky testované imunotestom na proliferáciu buniek, ktorý merí inkorporáciu 5-bróm-2'-deoxyuridínu (BrdU), podľa návodu výrobcu (Boehringer Mannheim, katal. č. 1647 229) V tomto teste je BrdU inkorporovaný miesto tymidínu do DNA rastúcich buniek. Inkorporácia BrdU je detekovaná ELISA testom a množstvo BrdU merané v teste ukazuje na rýchlosť syntézy DNA a tým na rýchlosť proliferácie PDL buniek.

Výsledky uvedené na obr. 1 ukazujú, že PDL bunky kultivované v prítomnosti EMD majú významne vyššiu rýchlosť proliferácie ako PDL bunky kultivované v neprítomnosti EMD.

100 μ l bunkového supernatantu z mikrotitračnej platne bolo pridaných k 20 μ l 1N HCl a bola vykonaná 10-minútová inkubácia pri teplote okolia. Inkubačná zmes bola neutralizovaná 20 μ l 1N NaOH/0,5 M HEPES. 100 μ l tejto zmesi bolo pridaných k 400 μ l riediaceho tlmivého roztoku. 200 μ l tohto roztoku bolo analyzovaných ELISA pri použití QuantikinesTM kitu (katalógové č. DB100) od R D Systems, UK, podľa návodu výrobcu.

Výsledky sú uvedené na obr. 2 a ukazujú výrazné zvýšenie produkcie TGF- β 1 v PDL bunkách inkubovaných s EMD v porovnaní s PDL bunkami neinkubovanými s EMD.

Príklad 2: Testovanie rastu mikroorganizmov v prítomnosti derivátov matrice zubnej skloviny a proteínov matrice zubnej skloviny

Cieľom tohto príkladu je preukázanie inhibičných účinkov derivátov matrice zubnej skloviny a proteínov matrice zubnej skloviny na rast mikróbov in vitro.

Proteíny použité v tomto príklade boli rozpustené vo fosfátom tlmenom salinickom roztoku (PBS) s pH upraveným na 5,5 pomocou kyseliny octovej. Použité baktérie boli suspendované v PBS, pH 6,8, v konečnej koncentrácii majúcej $OD_{600} = 0,4$.

50 μ l EMDOGAINU^R (30 mg EMD v 1 ml PGA) a 50 μ l EMD, tepelne spracovaného EMD, EMD frakciou A, B, C a H (všetky obsahujúce 10 mg proteínu na ml PBS tlmivého roztoku) bolo nanesených na agarovú platňu a nechalo sa uschnúť na vrchu platne (priemer 9 cm, štandardný agar na stanovenie rezistencie s pridanými činidlami podľa potrieb jednotlivých baktérií). Potom bola pridaná homogénna suspenzia baktérií (1 ml, $OD_{280} = 0,5$) rozotrením suspenzie na hornej ploche agarových platní a platne boli inkubované pri 35°C počas 3 dní (aeróbne kultúry) alebo 14 dní (anaeróbne kultúry) v atmosfére obohatenej CO₂ alebo za aeróbnych podmienok, podľa požiadaviek jednotlivých mikroorganizmov. Všetky kultúry boli kontrolované denne. Kolagén typu 1 a sérový albumín (obidva hovädzieho pôvodu) boli testované za rovnakých podmienok ako kontroly. Neriedený propylénglykolalginát (PGA-EMD nosič), PBS tlmivý roztok a kyselina hyalurónová (HA - alternatívny nosič pre EMD) boli aplikované ako negatívne kontroly.

Výsledky sú uvedené v tabuľke 1. Iba deriváty matrice zubnej skloviny alebo proteíny alebo deriváty matrice zubnej skloviny inhibovali rast niektorých mikroorganizmov. Neboli prítomné žiadne známky difúzných zón okolo proteínu, čo ukazuje na to, že aplikované EMD proteíny agregovali na povrchu agaru a že bol inhibovaný rast len tých mikroorganizmov, ktoré boli v priamom kontakte s proteínmi. Keď boli odobrané vzorky zo zón inhibície a tieto vzorky boli kultivované v kvapalnom

médie (LB médium s doplnkovými zložkami), tak boli získané monokultúry pôvodných mikroorganizmov, čo ukazuje, že aktívne proteíny nie sú baktericidné. Všetky kontroly boli v teste negatívne, čo ukazuje na to, že žiadny nešpecifický mechanizmus neovplyvnil výsledky.

Tabuľka 1: Rast (+/-) na hornej ploche testovanej substancie

kmeň	Sérový albumín	Kolagén I. typu	Propylénglykolalginát	EMDOGAIN®	EMD	tepelne spracovaný EMD	EMD frakcia A	EMD frakcia B	EMD frakcia C	EMD frakcia H	Hyalurónová kyselina	kontrola - tlmivý roztok
<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus mutans</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

EMD frakcia A: hlavne amelogenin s približne 26-20 kDa;

EMD frakcia B: proteíny s približne 17-13 kDa;

EMD frakcia C: peptidy s približne 10-5 kDa;

EMD frakcia H: všetky proteíny v EMD s vyššou molekulovou hmotnosťou ako 27 kDa;

+ - normálny rast mikroorganizmov;

- - úplná inhibícia rastu mikroorganizmov;

+/- - určitá inhibícia rastu v porovnaní s negatívnymi kontrolami.

Všetky výsledky uvedené v tabuľke boli zaznamenané druhý deň (pre aeróbne kultúry) alebo po piatich dňoch (pre anaeróbne kultúry) inkubácie.

Tieto výsledky ukazujú, že EMD obsahuje proteíny alebo peptidy, ktoré môžu po agregácii na povrchu inhibovať rast niektorých gram-negatívnych tyčíniek a niektorých gram-pozitívnych kokov. Vzhľadom na základné charakteristiky EMD proteínov (ref. jpc) a preto, že účinok nie je mikrobicídny, je možným vysvetlením pozorovaného účinku to, že proteínové agregáty vytvárajú nerozpustnú bariéru, ktorá separuje mikroorganizmy od rastových substrátov.

Príklad 3: Vplyv EMD na rýchlosť väzby *Actinomyces viscosus* in vitro

Úvod

Bol testovaný vplyv EMD na počiatočnú väzbu *Actinomyces viscosus*, orálneho organizmu, ktorý sa hojne vyskytuje v zubnom povlaku, ale ktorý nie je uvádzaný do súvislostí so závažnou periodontitídou. Hoci tento organizmus môže tvoriť agregáty s *Porphyromonas gingivalis* a tak môže ovplyvňovať kolonizáciu povrchu koreňov potenciálnymi periodontálnymi patogénmi, sú *Actinomyces* spp. nachádzané v relatívne hojnom počte v zdravých subgingiválnych lokalitách (tieto zistenia zodpovedajú zistením uvedeným v Liljemark et al., Microb. Immunol. 8: 1993, str 5-15, ktorí zistili, že po liečbe periodontu sa počty *Actinomyces* spp. značne zvýšili). Haffajee et al., J. Clin. Periodont. 24, 1997,, str. 767-776, zistili z počtu mikroorganizmov v subgingiválnych povlakoch, že pri jedincoch s dobrou odpoveďou na počiatočnú periodontálnu liečbu boli relatívne hojne prítomné *A. viscosus* a *T. denticola*.

Materiály

Actinomyces viscosus bol získaný od Dr. A.J. van Winkelhoff (Dept. of Oral Microbiology, ACTA). EMDOGAIN^R bol získaný od BIORA (Malmö, Švédsko). RBS detergenčné činidlo bolo získané od Fluka (Fluka Chemie AG, Buchs, Švajčiarsko).

Kultivácia a odber baktérií

A. viscosus bol naočkovaný z platní s krvným agarom do vsádzkovej kultúry v Schadlerovom kvapalnom médiu a bola vykonaná kultivácia počas 24 hodín pri 37°C. Táto kultúra bola použitá na naočkovanie druhej kultúry v Schadlerovom bujóne, v ktorom sa bola kultivácia realizovala počas 16 hodín. Bunky boli získané centrifugovaním (5 min. pri 6500 x g) a boli premyté dvakrát destilovanou vodou. Potom boli mikroorganizmy spracované sonikáciou počas 20 sekúnd pri 30 W (Vibra Cell model 375, Sonics and Materials Inc., Danbury, CT, USA) na rozrušenie bakteriálnych reťazcov a agregátov. Sonikácia bola prerušovaná za ochladzovania kúpeľom ľadu a vodou. Bunky boli počítané pri použití Burker-Turkerovho počítacza buniek. Nakoniec bol *A. viscosus* suspendovaný v adhéznom tlmivom roztoku (2 mM fosforečnan draselný, 50 mM chlorid draselný a 1 mM chlorid vápenatý, pH 6,8).

Potiahnutie sklenených platní

Sklenené platne boli dôkladne očistené sonikáciou v 5% RBS detergenčnom činidle, boli dôkladne vymyté vodou, boli prepláchnuté metanolom a nakoniec boli prepláchnuté destilovanou vodou. Týmto postupom sa získal vodný kontaktný uhol nula stupňov. EMD bol rozpustený v 0,01 M kyseline octovej v koncentrácii 7,5 mg/ml. Sklenené platne boli rozdelené na dve poloviny pomocou teflónovej značky (DAKO A/S, Glostrup,

Dánsko). Kyselina octová (0,01 M) bola aplikovaná na jednu stranu a 250 µg EMD na druhú stranu. Sklenené platne boli sušené vzduchom v komôrke počas 4-6 hodín.

Prietokový pokus

Prietoková komôrka a počítačový systém použité v tomto pokuse sú schematicky znázornené na obr. 3. Pred každým pokusom boli všetky trubice a prietoková komôrka naplnené adhéznym tlmivým roztokom tak, aby systém neobsahoval žiadne vzduchové bubliny. Potiahnuté sklenené platne tvorili dno prietokovej komôrky. Prietok bol nastavený na 2,5 ml/min (čo je porovnateľné s rýchlosťou toku slín u človeka). Bakteriálna suspenzia sa nechala cirkulovať systémom približne 3-4 hodín a bol stanovený počet baktérií adherujúcich k substrátu. Boli uskutočnené tri nezávislé pokusy. Všetky pokusy boli vykonané s 3×10^8 bunkami na 250 ml adhézneho tlmivého roztoku. Počas pokusu boli každých 10-15 minút zhotovené snímky v 6 vopred vybraných miestach platne potiahnutej EMD a kontrolou. Výška kanálu paralelnej prietokovej komôrky bola 0,6 mm.

Analýza údajov

Po spočítaní adherujúcich baktérií vo všetkých snímkoch boli údaje transformované na baktérie na štvorcový centimeter. Pre každý pokus bol konečný počet mikroorganizmov na cm^2 použitý pre štatistickú analýzu (Student t-test pre párové merania pri použití n ako počtu pokusov).

Výsledky

Pokus 1 (obr. 4) ukázal postupné zvyšovanie počtu naviazaných mikroorganizmov, najmä počas prvých 150 minút prietoku. Po tomto čase dosiahol počet mikroorganizmov naviazaných na EMD plató $2,0 \times 10^6$ baktérií na cm^2 , čo je približne 4-krát

viac, ako na časti sklenenej platne spracovanej kyselinou octovou.

Tiež v pokuse 2 (obr. 5) stimuloval EMD výrazne väzbu *A. viscosus* na substrát. Avšak, na počiatku pokusu bol tento efekt menej výrazný. Pravdepodobne to bolo spôsobené nižšou hustotou mikroorganizmov v prietokovom systéme. Počas 90 minút sa počet baktérií naviazaných na EMD postupne zvyšoval vzhľadom na kontrolu a po 3 hodinách dosiahol maximum $1,4 \times 10^6$ na cm^2 , čo je 3-násobné zvýšenie.

Tretí pokus (obr. 6) ukázal stimuláciu adherencie *A. viscosus* na EMD poťah už po 5 minútach toku. EMD indukoval rýchle zvýšenie počtu naviazaných mikroorganizmov počas prvých 45 minútach. Potom pokračovala adherencia mikroorganizmov progresívne. Väzba na stranu spracovanú kyselinou octovou mala podobný charakter, s menším počtom adherujúcich mikroorganizmov. Po 200 minútach bola väzba na EMD poťah dvakrát vyššia ako na povrch spracovaný kyselinou octovou.

V 3 pokusoch dohromady bol rozdiel štatisticky významný ($p < 0,05$).

Z výsledkov sa zdá, že EMD, použitý ako poťah na sklenenom povrchu, má významný stimulačný efekt in vitro pre väzbu *A. viscosus*. Hoci dosiaľ nie je jasné, ktoré mechanizmy sú zodpovedné za túto vyššiu iniciálnu väzbu, predpokladá sa, že organizmy interagujú s prolínovými zvyškami, ktoré sú hojne prítomné v amelogeninovej zložke komerčne dostupnej proteínovej zmesi. Bakteriálna adhézia je často určená špecifickými interakciami proteín-peptid a lektín-uhľovodan. Je známe, že *A. viscosus* sa môže pomocou svojich fimbrií 1. typu viazať na proteíny bohaté na prolín, ako sú slinné proteíny bohaté na prolín (PRP) a kolagén I. a III. typu.

Špecifické interakcie medzi EMD a niektorými mikroorganizmami môžu mať významné následky pre zloženie biologického poťahu v dutine ústnej, pretože môžu meniť ekológiu povlakov. Keď môže prebehnúť ekologický posun v prospech organizmov, ktoré nie sú asociované s ochorením periodontu, tak môže EMD zlepšiť ochorenie periodontu iba týmto mechanizmom. Ten je samozrejme odlišný od iných výhodných účinkov EMD.

Príklad 4: Vplyv EMD na rýchlosť naviazania *Streptococcus mutans* in vitro

Úvod

Existuje veľa dôkazov pre kauzálnu úlohu organizmov v povlakoch pre patogenézu ochorenia dutiny ústnej, ako je periodontitída a zubný kaz. Súčasný model tvorby supragingiválneho povlaku predpokladá, že *Streptococcus* spp. sú prevládajúce organizmy kolonizujúce povrch zubu. Tak sa povlaky vyvíjajú v dôsledku rastu baktérií a ďalšej kolonizácie inými druhmi baktérií. Táto kolonizácia môže prebiehať väzbou baktéria-baktéria, alebo môže byť umožnená molekulami slín. Rast povlaku je tiež podporený produkciou extracelulárnych makromolekúl. *S. mutans* sa teraz považuje za jeden z najdôležitejších kmeňov v biologickom poťahu, pretože je asociovaný so zubným kazom. Hoci bolo preukázané, že niekoľko gram-pozitívnych baktérií (tzn. *S. mutans*) spôsobujú stratu alveolárnej kosti pri gnotobiotických zvieratách, nie sú tieto mikroorganizmy pravdepodobne hlavnou príčinou vzniku periodontálnych chobotov. Avšak, potenciálne patogénne mikroorganizmy musia byť schopné ako prekonaní obranných mechanizmov hostiteľa a imunitných mechanizmov, tak zahájenia deštrukcie tkaniva hostiteľa.

Materiály

Streptococcus mutans NS bol získaný od Dr. H. van der Mei (Materia Technica, University of Groningen). Emdogain bol získaný od BIORA (Malmö, Švédsko). RBS detergentné činidlo bolo získané od Fluka (Fluka Chemie AG, Buchs, Švajčiarsko).

Kultivácia a odber baktérií

S. mutans bol naočkovaný z platní s krvným agarom do vsádzkovej kultúry v Todd Hewittovom bujóne a bola vykonaná kultivácia počas 24 hodín pri 37°C. Táto kultúra bola použitá na naočkovanie druhej kultúry v Todd Hewittovom bujóne, v ktorom bola kultivácia realizovaná počas 16 hodín. Bunky boli získané centrifugovaním (5 min. pri 6500 x g) a boli premyté dvakrát destilovanou vodou. Potom boli mikroorganizmy spracované sonikáciou počas 20 sekúnd pri 30 W (Vibra Cell model 375, Sonics and Materials Inc., Danbury, CT, USA) na rozrušenie bakteriálnych reťazcov a agregátov. Sonikácia bola prerušovaná za ochladzovania kúpeľa ľadom a vodou. Bunky boli rátané pri použití Burker-Turkerovho počítacza buniek. Nakoniec bol *S. mutans* suspendovaný v adhezívnom tlmivom roztoku (2 mM fosforečnan draselný, 50 mM chlorid draselný a 1 mM chlorid vápenatý, pH 6,8).

Potiahnutie sklenených platní

Sklenené platne boli dôkladne očistené sonikáciou v 5% RBS detergentnom činidle, boli dôkladne vymyté vodou, boli prepláchnuté metanolom a nakoniec boli prepláchnuté destilovanou vodou. Týmto postupom sa získal vodný kontaktný uhol nula stupňov. EMD bol rozpustený v 0,01 M kyseline octovej v koncentrácii 7,5 mg/ml. Sklenené platne boli rozdelené na dve poloviny pomocou teflónovej značky (DAKO A/S, Glostrup, Dánsko). Kyselina octová (0,01 M) bola aplikovaná na jednu

stranu a 250 μ g EDM na druhú stranu. Sklenené platne boli sušené vzduchom v komôrke počas 4-6 hodín.

Prietokový pokus

Prietoková komôrka a počítačový systém použité v tomto pokuse sú schematicky znázornené na obr. 3. Pred každým pokusom boli všetky trubice a prietoková komôrka naplnené adhéznym tlmivým roztokom tak, aby systém neobsahoval žiadne vzduchové bubliny. Potiahnuté sklenené platne tvorili dno prietokovej komôrky. Prietok bol nastavený na 2,5 ml/min (čo je porovnateľné s rýchlosťou toku slín u človeka). Bakteriálna suspenzia sa nechala cirkulovať systémom približne 3-4 hodín a bol stanovený počet baktérií adherujúcich k substrátu. Boli uskutočnené tri nezávislé pokusy. Všetky pokusy boli vykonané s 3×10^8 bunkami na 250 ml adhézneho tlmivého roztoku. Počas pokusu boli každých 10-15 minút zhotovené snímky v 6 vopred vybraných miestach platne potiahnutej EDM a kontrolou. Výška kanálu paralelnej prietokovej komôrky bola 0,6 mm.

Analýza údajov

Po spočítaní adherujúcich baktérií vo všetkých snímkoch boli údaje transformované na baktérie na štvorcový centimeter. Pre každý pokus bol konečný počet mikroorganizmov na cm^2 použitý pre štatistickú analýzu (Student t-test pre párové merania pri použití n ako počtu pokusov).

Výsledky

V každom z troch pokusov vykazoval EDM inhibičný účinok na rýchlosť väzby *S. mutans* (obr. 7, 8, 9; $p < 0,05$). Inhibícia mala hodnotu približne 40-70% v porovnaní s kontrolami spracovanými kyselinou octovou.

V prvom pokuse (obr. 7) bola preukázaná inhibícia počtu *S. mutans* naviazaných na sklenený povrch potiahnutý EMD už po 10 minútach toku. Po 3 hodinách bola väzba inhibovaná na asi 60% v porovnaní s kontrolou.

V druhom pokuse (obr. 8) začal EMP inhibovať väzbu *S. mutans* po 1,5 hodine toku. Počet *S. mutans* adherujúcich na EMD dosiahol plató 0,5 miliónu na cm² približne po 40 minútach toku. Po 3,5 hodinách boli počty na úrovni 25% v porovnaní s kontrolou.

V treťom pokuse (obr. 9) bola preukázaná inhibícia väzby *S. mutans* EMD už od zahájení toku. Rovnako ako v príklade 1 dosiahla inhibícia 60% kontrolných hodnôt po 3 hodinách toku.

Tento pokus preukázal, že EMD má významný inhibičný účinok na adhérenciu *S. mutans* na sklenené povrchy. Možným vysvetlením tejto inhibície môže byť prítomnosť hydrofóbných zlúčenín v zmesi EMD. Jedným z proteínov hojne prítomných v zmesi je amelogenin; proteín, ktorý obsahuje okrem kyslej hydrofilnej C-koncovkej sekvencie tiež hydrofóbne jadro obsahujúce 100-300 zvyškov bohatých na prolín, leucín, metionín a glutamín. Saito et al., Arch. Oral Biol. 42, 1997, str. 539-545, zistili, že adhérenca rôznych kmeňov *S. mutans* na imobilizované hydrofóbne proteíny (OAI) bola inhibovaná. Autori pripisujú tento účinok negatívnemu náboju na povrchu mikroorganizmu (ako je to v prípade *S. mutans*). Iné charakteristiky povrchu môžu takisto ovplyvňovať adhérenciu na substrát. *S. mutans* obsahuje povrchový antigén I/II, ktorý má N-koncovú časť bohatú na alanín a obsahuje tandémové repetitívne sekvencie. Predpokladá sa, že tento región má štruktúru α -skrutkovice, ktorá nadobúda konformáciu závitú a ktorá môže zodpovedať za hydrofóbny charakter bunkového povrchu spojený s expresiou antigénu I/II.

Príklad 5: Vplyv EMD na rast niektorých periopatogénov

Prevotella intermedia a *Porphyromonas gingivalis* boli vopred kultivované počas 10-16 hodín pri 37°C v tioglykolátovom médiu doplnenom 0,5 mg/l vitamínu K a 5 mg/l hemínu v aeróbnej atmosfére vytváratej GasPakPlus zariadením vo vhodných nádobách. Ako náhle dosiahli kultúry $OD_{600} = 0,1-0,2$, čo zodpovedá hustote buniek 10^6-10^7 cfu (jednotiek vytvárajúcich kolónie) na ml, boli odobrané 100 µl alikvoty a baktérie boli vyzrážané odstredením. Baktérie boli resuspendované v 100 µl čerstvo pripravenej zmesi ľudského séra a sterilného salinického roztoku a suspenzie obsahujúce 10^5-10^6 buniek boli prenesené do sterilných 1,5 ml Eppendorf skúmaviek a boli zmiešané s (i) 100 µl prípravku EMD (3 mg EMD v 0,1 PGA), (ii) 100 µl PGA nosiča alebo (iii) 100 µl zmesi séra/NaCl ako kontroly rastu. 10 µl alikvoty na testovanie rastu boli odoberané po 0, 3, 6 a 24 hodinách. Alikvoty boli sériovo riedené v sterilnom 0,9% roztoku NaCl a 10 µl jednotlivých riedení bolo naočkovanych na Schaedlerov agar. Kultivačné podmienky boli rovnaké ako pre predbežnú kultiváciu. Agarové platne boli inkubované počas 3-4 dní a potom boli vyrátané cfu a bunkové hustoty (cfu/ml). Všetky pokusy boli opakované 6 raz.

Výsledky (uvedené ako percentá cfu/ml vzhľadom ku koncentrácii v čase 0)

1) Kontrolné kultúry v rôznych časoch

	0	3 h	6 h	24 h
<i>P. intermedia</i>	100	160	25	10
<i>P. gingivalis</i>	100	100	125	150

2) Kultúry v prítomnosti PGA nosiča v rôznych časoch

	0	3 h	6 h	24 h
<i>P. intermedia</i>	100	140	25	10
<i>P. gingivalis</i>	100	75	50	5

3) Kultúry v prítomnosti EMD v rôznych časoch

	0	3 h	6 h	24 h
<i>P. intermedia</i>	100	40	0	0
<i>P. gingivalis</i>	100	30	0	0

Kultúry boli výrazne inhibované prítomnosťou EMD v porovnaní s kontrolami so samotným nosičom alebo bez pridania EMD.

Príklad 6: Testovanie vplyvu EMDOGAINU^R na zlepšené hojenia rany v mäkkých tkanivách po chirurgickom zákroku na periodonte

Cieľom tohto príkladu je ukázať vplyv derivátov matrice zubnej skloviny a/alebo proteínov matrice zubnej skloviny na zlepšené hojenie rany v mäkkých tkanivách po chirurgickom zákroku na periodonte.

Pokusné defekty v marginálnom periodonte viac ako 50 zubov opíc druhu makak boli vytvorené odstránením zubného cementu, periodontálnej membrány a marginálnej alveolárnej kosti na cerviko-apikálnu vzdialenosť približne 5 mm pomocou zubného vrtáku. Do týchto pokusných defektov potom nebolo aplikované

buď nič, alebo bola vykonaná aplikácia derivátu matrice zubnej skloviny (získaného z EMDOGAINU^R buď vo forme nerekonštituovaného lyofilizovaného prášku, alebo vo forme rekonštituovaného prostriedku). Koncentrácia proteínu v rekonštituovanom prostriedku bola približne 5-30 mg/ml a aplikovaný objem bol od približne 0,1 do približne 0,2 ml na defekt.

Hojenie rany bolo hodnotené vizuálne počas nasledujúcich 8 týždňov. V defektoch, do ktorých bol aplikovaný EMDOGAIN^R, bolo pozorované dobré hojenie (bez zarudnutia alebo opuchu) a zanedbateľná tvorba povlaku po 2 týždňoch, keď boli odstránené stehy, dobré hojenie a malá gingivitída po 5 týždňoch a zhojenie bez komplikácií po 8 týždňoch, keď bol pokus ukončený. Naopak, v kontrolných defektoch bol po 2 týždňoch pozorovaný zápal s retrakciou a hojná tvorba povlaku, a po 5 a 8 týždňoch bola pozorovaná závažná retrakcia a gingivitída.

Príklad 7: Testovanie vplyvu derivátov matrice zubnej skloviny a proteínov matrice zubnej skloviny na hojenie rany po chirurgickom zákroku na periodonte

Cieľom tohto príkladu je ukázať vplyv derivátov matrice zubnej skloviny a proteínov matrice zubnej skloviny na zlepšené hojenie rany u pacientov po chirurgickom zákroku na periodonte.

Päťdesiat päť (55) pacientov vyžadujúcich chirurgický zákrok na periodonte bolo rozdelených do dvoch skupín, kde pri jednej skupine bol vykonaný bežný chirurgický výkon s modifikovanou Widmanovou "flap" technikou (20 pacientov) a pri druhej skupine bola vykonaná rovnaká operácia s aplikáciou EMDOGAINU^R (35 pacientov) (použitá koncentrácia bola 30 mg proteínu na ml a bolo aplikovaných približne 0,3 ml na zub. Žiadnemu z pacientov neboli v čase zákroku podané antibiotiká, ale všetci

boli inštruovaní k dennému používaniu aseptických (chlórhexidínových) roztokov na vyplachovanie úst.

Aktívne dotazovanie pacientov bolo uskutočnené v čase odstraňovania stehov (1-3 týždne po chirurgickom zákroku). Zatiaľ čo 3 (15%) kontrolní pacienti udávali komplikácie vyžadujúce antibiotickú liečbu, iba 1 (3%) pacient ošetrovaný EMDOGAINOM^R vyžadoval takú terapiu.

Príklad 8: Testovanie vplyvu derivátov matrice zubnej skloviny a proteínov matrice zubnej skloviny na hojenie rany po extrakcii zubu

Cieľom tohto príkladu je ukázať vplyv derivátov matrice zubnej skloviny a proteínov matrice zubnej skloviny na hojenie rany po extrakcii 3. moláru.

Pacientom vo veku 30 rokov alebo viac so symetricky zarazenými alebo čiastočne zarazenými tretími molármi vyžadujúcimi odstránenie bola vykonaná extrakcia tretej stoličky klasickou metódou obsahujúcou vytvorenie vertikálneho vrečka na vykonanie nutnej osteotómie a rezu. Zatiaľ čo druhá stolička bola extrahovaná a dutina bola vyplnená EMDOGAINOM^R pred urobením stehov. Všetkým pacientom boli podané antibiotiká (3 g amoxicilínu alebo 1 g erytromycínu) 1-2 hodiny pred chirurgickým výkonom a po výkone im bol podaný Ibuprofen (600 mg x 3). Boli inštruovaní k vyplachovaniu chlórhexidínom (0-1%, 10 ml x 2) počas 4 týždňov.

Stehy boli odstránené po 2 týždňoch. Hojenie miest s aplikáciou EMDOGAINU^R a kontrolných miest bolo hodnotené ako pacientom, tak dentistom. V jednom centre boli pri 9 pacientoch vykonané kontralaterálne extrakcie s/bez aplikácie EMDOGAINU^R. Pri jednom pacientovi bola pozorovaná mierna iritácia od stehov na oboch stranách, zatiaľ čo iný pacient mal výz-

namné bolesti len na kontrolnej strane, ale nie na strane ošetrenej EMDOGAINOM^R. V druhom centre udávali 3 pacienti z 6 bolesti iba na kontrolnej strane. V treťom centre bola pri jednom pacientovi diagnostikovaná závažná komplikácia, alveolitída, ktorá prebiehala na kontrolnej strane. Strana ošetrená EMDOGAINOM^R sa zhojila bez problémov. Iný pacient mal miernu iritáciu od stehov na oboch stranách, ale iba na kontrolnej strane bol zápal a bolesť, ktoré vyžadovali opakované výplachy salinickým roztokom a užívanie analgetik.

Tieto klinické výsledky ukazujú, že aplikácia EMDOGAINU^R do dutiny po extrakcii zubu múdrosti môže zlepšiť hojenie a znížiť inak častý bolestivý opuch.

Príklad 9: Testovanie vplyvu derivátov matrice zubnej skloviny a proteínov matrice zubnej skloviny na hojenie alveolitis sicca

Cieľom tohto príkladu je ukázať vplyv derivátov matrice zubnej skloviny a proteínov matrice zubnej skloviny na hojenie alveolitis sicca (suchej dutiny).

Po odstránení 35 radix relictá mal pacient mužského pohlavia vo veku 70 rokov významnú bolesť a opuch súvisiaci s extrakčnou dutinou. Po vyšetrení jeho dentistom bolo jasné, že sa u nej vyvinula alveolitis sicca, pri ktorej sa počiatkové koagulum rozpadá a kosťová stena dutiny nekrotizuje. Príľahlá kosť a mäkké tkanivá boli zápalovo zmenené.

Pacient mal anamnézu srdcového zlyhania a bol liečený antikoagulačným liekom Marevanom. V dôsledku tohto ochorenia mal zníženú cirkuláciu periférnej krvi. Tiež fajčil pravidelne niekoľko cigariet denne.

Alveolitída bola liečená tradičným spôsobom spočívajúcim v odstránení nekrotickej kosti a indukcii nového krvácania. Ďalej bolo mobilizované ďasno a dutina bola uzatvorená stehom. Pacient bol potom liečený penicilínom (apocilín 660 mg, 2 tablety ráno a večer počas 7 dní) na liečbu infekcie a takisto si vyplachoval ústa dvakrát denne roztokom chlórhexidínu. Po piatich dňoch, po ukončení podávania antibiotík, sa pacient dostavil na zubársku kliniku s trvajúcou výraznou bolesťou. Bola vykonaná vizuálna prehliadka operovanej oblasti a palpácia a vyšetrenie sondou a bolo preukázané, že alveolitída pretrváva a že je prítomná nekrotická kosť. Röntgenové vyšetrenie ukázalo deštrukciu a nekrózu kosti pod apikálnou oblasťou alveolu. Operovaná oblasť bola opäť vyčistená a vzniknutý defekt v kosti bol vyplnený EMDOGAINOM^R (30 mg/ml, maximálne 0,5 ml) a bola uskutočnená nová sutúra ďasna na uzavrenie alveolu. Nebola zahájená žiadne ďalšia liečba, ale pacient pokračoval vo vyplachovaní roztokom chlórhexidínu. O dva dni neskôršie udával pacient vymiznutie bolesti a opuchu. Klinické vyšetrenie a odstránenie stehov jeden týždeň po liečbe EMDOGAINOM^R ukázalo dobré hojenie bez prítomnosti nekrotické tkaniva alebo zápalu a intaktné ďasno bez zarudnutia alebo opuchu prekrývajúcej ranu. Pri sondovaní a palpácii nebolo krvácanie ani bolesť. Nebol prítomný zápach z úst ani exsudát. Pacient neopisoval žiadnu bolesť alebo iné príznaky.

Príklad 10: Testovanie profylaktického vplyvu derivátov matrice
zubnej skloviny a proteínov matrice zubnej skloviny
na alveolitis sicca

Cieľom tohto príkladu je ukázať profylaktický vplyv
derivátov matrice zubnej skloviny a proteínov matrice zubnej
skloviny na alveolitis sicca.

82-ročná pacientka ženského pohlavia mala longitudinálnu
fraktúru koreňu zubu 44. Tento zub bol nosným zubom v mostíku

v rozsahu zubov 35 až 46 a bol endodonticky liečený pred niekoľkými rokmi. Klinicky bolo ďasno obklopujúce zub zápalovo zmenené a bola prítomná gingiválna kapsa v rozsahu celého apexu pri zube na linguálnej strane. Röntgenový snímok ukázal lokálnu periodontitídu zubu 44.

Pacientka mala dobrú orálnu hygienu, ale mala ochorenie srdca liečené Marevanom (antikoagulačným činidlom) a krvácanie z ďasna bolo ľahko provokované sondovaním. Pred 6 mesiacmi bol pacientke chirurgicky odstránený zub 35 z dôvodov závažnej periodontitídy. Po tejto operácii mala dlhodobu alveolitis sicca. Veľmi sa obávala toho, aby odstránenie zubu 44 nespôsobilo rovnaké postchirurgické komplikácie. Bola informovaná, že kombinácia jej vysokého veku, liečby Marevanom a infikovaného koreňa a gingiválneho vrečka výrazne zvyšuje riziko pooperačných komplikácií ako je alveolitída, ale že nie je iná alternatíva ako chirurgické odstránenie koreňových fragmentov.

Pacientka súhlasila s odstránením zubu 44 a s pokusnou profylaktickou liečbou EMDOGAINOM^R na prevenciu vzniku alveolitis sicca. Pacientke bola pod anestézou vykonaná incisia a odstránenie bukálnej kosti za účelom odstránenia koreňového fragmentu bez straty mostíka. Po odstránení bol prázdny alveolus mechanicky vyčistený a vyplnený EMDOGAINOM^R (30 mg/ml, max. aplikácia 0,5 ml) a lalok bol reponovaný s jedným stehom. Rovnaký deň večer pacientka udávala (telefonicky) dlhodobé krvácanie z operovanej oblasti (liečba Marevanom nebola ukončená pred operáciou), ale nie iné príznaky. Pri odstránení stehu päť dní po výkonu bola operačná rana v mäkkých tkanivách celkovo zhojená. Pacientka neudávala žiadne príznaky ako bolesť alebo opuch po chirurgickom výkonu a bola celkom veľmi spokojená s liečbou.

Príklad 11: Testovanie vplyvu derivátov matrice zubnej skloviny a proteínov matrice zubnej skloviny na hojenie post-traumatických komplikácií

Cieľom tohto príkladu je ukázať vplyv derivátov matrice zubnej skloviny a proteínov matrice zubnej skloviny na hojenie post-traumatických komplikácií u pacienta.

Po nehode mal pacient postihnutý horný predný zub, ktorý bol ligovaný na pohotovostnej klinike. Dentista zistil, že zuby 11 a 21 sú avitálne a zuby 12 a 22 majú mezio-incizálne fraktúry triedy I alebo II. Marginálne ďasno bola významne zápalovo zmenené a špatne priliehало k povrchu zubov. Pacient udával bolesti a znecitlivenie, opuch a divnú chuť a zápach. Boli prítomné tiež príznaky poranenia periodontálneho ligamenta v apikálnych regiónoch zubov 11 a 21. Obidva centrálné rezáky boli vyčistené a korene boli vyplnené čerstve namiešaným Ca(OH)_2 .

Po 4 týždňoch bolo hojenie stále neuspokojivé. Stav prešiel do chronického zápalu a zuby boli považované za stratené. Štandardnou terapiou tohto stavu by bola extrakcia všetkých štyroch rezákov a ich náhrada mostíkom alebo implantátom. Avšak pacient odmietol túto liečbu a ako posledný pokus o záchranu zubov bol vykonaný prenos gingiválneho laloku na všetkých štyroch postihnutých zuboch (11, 12, 21, 22). Boli použité dve ampuly EMDOGAINU^R (60 mg v 3 ml). Maximálne 0,2 ml EMDOGAINU^R (30 mg/ml) na zub bolo aplikovaných injekčnou striekačkou pred tým, ako boli laloky zošité 7 stehmi. 4 stehy boli odstránené 5 dní po výkonu. Potom došlo k výraznému zlepšeniu subjektívnych aj klinických príznakov. Pacient už neudával bolesti a nebol prítomný zápach alebo pachuť z postihnutej oblasti. Po 2 týždňoch boli odstránené zostávajúce stehy. Ďasno nevykazovalo žiadne známky zápalu a pacient nemal obťaženie. Ďasno bolo zdravé a bez príznakov zápalu; pevne

priliehalo k zubu a/alebo alveolárnej kosti, malo ružovú farbu (nebolo zarudnuté, ako je to pri zápale) a malo normálnu (nie opuchnutú) intradentálnu papilu. Ďalej, značné zlepšenie bolo pozorované v podobe obnovenia periodontálneho ligamentu v postihnutej časti zubu a ukladanie novej alveolárnej kosti bolo vizualizované röntgenovým vyšetrením.

Príklad 12: Hojenie traumatických rán na susedných zuboch a nervoch

Kasuistika

Pacientka ženského pohlavia vo veku 39 let mala závažnú pericoronitídu v okoli ľavého dolného zubu múdrosti. Na verejnej zubnej klinike bol zub čiastočne odstránený pri ponechaní apikálnej poloviny zubu v čelisti po iatrogénnej fraktúre koreňa. Deň po chirurgickom odstránení koreňového fragmentu bola pacientka s bolesťami konzultovaná so špecialistom na orálnu chirurgiu.

Dva dni po výkone bola pacientka u svojho dentistu na kontrole. Mala opuch na ľavej strane a mala pretrvávajúcu a kompletnú blokádu ľavého mandibulárneho nervu. Klinické a röntgenové vyšetrenie ukázalo, že počas chirurgického výkonu bola pri vŕtaní vážne poškodená kosť čelisti, apikálna tretina distálneho koreňa zubu 37 a kanál mandibulárneho nervu (pozri röntgenovú snímku, obr. 1A). Pri sondovaní bola hĺbka distálneho vrečka na zubu 37 25 mm od vrcholu korunky zubu, čo bola hĺbka zadného vrcholu distálneho koreňa.

V snahe o indukciu hojenia kosti a nervu a regeneráciu strateného periodontálneho ligamentu na zubu 37 bola operačná rana otvorená a starostlivo vyčistená. Po vypláchnutí obnaženej kosti salinickým roztokom bol povrch distálneho koreňa 37 a mandibulárneho nervu pokrytý EMDOGAINOM^R (30 mg/ml, apliko-

vané v nadbytku; približne 1 ml) a rana bola uzatvorená tromi stehmi. Pacientka bola poučená, aby si vyplachovala ústa chlórhexidínovým roztokom (Cordosyl^R) dvakrát denne počas ďalších piatich dní a bola jej naordinovaná päťdenná profylaktická liečba penicilínom (Ampicilín 660 mg x 4).

Po desiatich dňoch prišla pacientka na kontrolu a na odstránenie stehov. V tomto čase opuch zmizol a hojenie mäkkých tkanív bolo veľmi dobré. Napriek tomu kompletná anestéza mandibulárneho nervu pretrvávala a pacientka bola informovaná, že prognóza pri natrhnutom nerve je prinajlepšom neistá. V tento čas bolo z dôvodov anestézy nemožné zistiť vitalitu zubu 37. Zvyčajne vedie také poranenie koreňu zubu k nekróze drene a k ankylóze zubu. Na prevenciu týchto komplikácií je indikovaná endodontická liečba. Avšak na zistenie toho, či môže pokusná terapia navodiť hojenie periodontálneho ligamentu, pacientka súhlasila s tým, že zub zostane dajaký čas bez ošetrovania. Pacientka bola zvaná na kontroly raz za mesiac.

O dva mesiace neskôršie udávala pacientka lokálnu hyperestézu v ľavej polovine dolného rtu, čo je príznakom hojenia nervu. Mäkké tkanivá v oblasti 37-38 boli dokonale zhojené bez jazvy. Röntgenová snímka ukázala tvorbu novej kosti v extračnom alveole. Zub 37 a okolité tkanivá boli stále necitlivé.

Štyri mesiace po liečbe anestéza odznela a zub 37 bol pri testovaní vitálny, ale hypersenzitívny, ako na teplotu, tak pri elektrickom teste. Röntgenová snímka ukázala, že kostová výplň extrakčného alveolu bola významná a boli prítomné známky periodontálnej regenerácie na distálnom koreni zubu 37.

Päť mesiacov po zahájení liečby EMDIGAINOM^R bola vitalita zubu 37 normálna. V tomto čase bola na röntgenovej snímke patrná úplná regenerácia funkčného periodontálneho ligamentu

(obr. 1B) a novo vytvorená alveolárna kosť normálneho vzhľadu vyplnila kosťové defekty a extrakčný alveolus. Neboli prítomné známky ankylózy.

Hĺbky vrečka distálne na zubu 37 bola pri sondovaní teraz iba 10 mm, čo je približne 1 mm pod cementoenamelovým spojením. Po tejto kontrole bola pacientka prepustená zo sledovaní ako celkom zhojená a bola odoslaná na pravidelné 1-ročné kontroly.

Komentár

Kompletné a rýchle hojenie traumatických rán na susedných zuboch a nervoch po chirurgickom odstránení zubu múdrosti je vzácné. Obvyklé komplikácie, ako bola hore opísaná komplikácia, zvyčajne končia kompletným odstránením poraneného zubu, alebo minimálne endodontickým odstránením zubnej drene a vyplnením koreňových kanálikov kosťou s ankylózou. Ruptúra nervu sa zvyčajne hojí 8-12 mesiacov, pokiaľ vôbec, a niektoré oblasti s parestéziami pretrvávajú niekoľko rokov. Rýchlosť a dobrá kvalita hore opísaného hojenia sú veľmi neobvyklé a mali by byť považované za známku prínosu EMDOGAINU^R pre hojenie rán.

Röntgenové vyšetrenia:

A: Pacient dva dni po odstránení zubu 38. Je prítomný veľký defekt distálne na zubu 37 a postihnutie mandibulárneho kanálu. Tiež alveolárna kosť disto-bukálne na zubu 37 bola odstránená počas chirurgického zákroku.

B: Pacient päť mesiacov po chirurgickom zákroku. Sú prítomné známky kompletného funkčného periodontálneho ligamentu (lamina dura) v defekte na distálnej časti koreňa zubu 37. Nie sú príznaky ankylózy. Sú zreteľné hranice mandibulárneho kanálu a extrakčný alveolus je celkom vyplnený kosťou. Tiež sú

prítomné známky tvorby novej disto-bukálnej alveolárnej kosti okolo zubu 37.

Príklad 13: Testovanie vplyvu derivátov matrice zubnej skloviny a proteínov matrice zubnej skloviny na hojenie ulcus cruris (venózneho vredu)

Pacient 1

Pacientom bol muž narodený v roku 1926 a mal anamnézu opakovaných trombóz s posttrombotickým syndrómom a recidivujúcimi holeňovými vredmi. Bol liečený systémovo antikoagulačnými kumarínovými derivátmi a vrede boli liečené lokálne pri použití prípravku Crupodex (monomér dextránu) BIOGAL a 3% roztoku kyseliny boritej.

V čase zahájenia terapie prípravkom EMDOGAIN^R mal oválny holeňový vred veľkosti 5 x 4 cm a hĺbky 0,5 mm, ktorý bol v štádiu granulácie s veľmi špatnou epitelizáciou.

Defekt bol dezinfikovaný 3% H₂O₂ a 500 µl prípravku EMDOGAIN^R bolo aplikovaných po kvapkách a tieto kvapky boli rovnomerne rozotrené sterilnou tyčinkou. EMDOGAIN^R bol ponechaný počas 10 minút na vzduchu a potom bola rana zakrytá Inadine (Johnson and Johnson Rayon) obväzom impregnovaným 10% jódpovidónovou masťou.

Po 5 dňoch prebehla epitelizácia proximálnej časti vredu a vred sa zmenšil na 1,8 x 2,2 cm a nebolí známky vedľajších reakcií (zápalu). Nebol aplikovaný žiadny EMDOGAIN^R. Po 12 dňoch prebehla ďalšia epitelizácia v proximálnej časti a nová epitelizácia v laterálnej časti v oblasti približne 2 x 2 cm. Takmer polovina vredu bola zhojená. Bolo aplikovaných 400 µl prípravku EMDOGAIN^R.

Po 19 dňoch prebehla ďalšia epitelizácia v proximálnej a laterálnej časti vredu, ale nie v distálnej časti, kde bol vred dosť hlboký (približne 1 mm). Viac ako polovina vredu bola zhojená. Bolo aplikovaných 300 μ l prípravku EMDOGAIN^R. Od zahájenia liečby prípravkom EMDOGAIN^R pacient neudával žiadnu bolesť vo vrede, na rozdiel od stavu pred liečbou. EMDOGAIN^R bol potom aplikovaný raz týždne do dňa 40 (v dávke 200 μ l) a vred bol považovaný za úplne zhojený po 47 dňoch.

Pacient 2

Pacientkou bola žena narodená v roku 1949 a mala varixy, chronickú žilnú insuficienciu a recidivujúce holeňové vredy. Mala polyvalentnú alergiu na farmaceutické činidlá (lieky), rovnako ako varikózný ekzém. Bola v predchádzajúcom čase liečená lokálne Otosporínovými kvapkami (polymyxín B sulfát + neomycín sulfát + hydrokortizón) a hydrokortizonovými obväzmi.

V čase zahájenia liečby prípravkom EMDOGAIN^R mala holeňový vred s veľkosťou 1 cm v priemere a hĺbkou 2 mm. Bolo aplikovaných 300 μ l prípravku EMDOGAIN^R.

Po 5 dňoch bola patrná epitelizácia 2 mm okolo defektu (po obvode) a neboli známky vedľajších reakcií (zápalu). Nebol aplikovaný prípravok EMDOGAIN^R. Po 12 dňoch sa veľkosť defektu zmenšila na priemer 2 mm a bolo aplikovaných 100 μ l prípravku EMDOGAIN^R.

Po 19 dňoch mal vred stále ešte priemer 2 mm, ale jeho spodina granulovala a vred už nebol tak hlboký (približne 0,2 mm). Bylo aplikovaných 100 μ l prípravku EMDOGAIN^R.

Rovnaká pacientka mala iný vred na druhej nohe, ktorý mal veľkosť približne 0,3 x 1 cm. Bolo aplikovaných 200 μ l prípravku EMDOGAIN^R.

Po 7 dňoch bola prítomná nová epitelizácia, na spodine bolo granulačné tkanivo a veľkosť sa zmenšila na približne 0,2 x 0,5 cm.

Potom bolo na každý vred aplikovaných 100 µl prípravku EMDOGAIN^R raz týžдне do dňa 40 a vtedy boli považované za úplne zhojené po 47 dňoch. Neboli pozorované žiadne alergické reakcie na EMDOGAIN^R.

Na rovnakej nohe vznikol nový vred majúci veľkosť približne 0,5 x 0,3 cm a na tento vred bolo aplikovaných 100 µl prípravku EMDOGAIN^R.

Pacient 3

Pacientkou bola žena narodená v roku 1929 a mala hlbokú žilnú trombózu po erysipelu a v čase zahájenia terapie prípravkom EMDOGAIN^R mala veľmi rozsiahly holeňový vred s veľkosťou približne 15 x 19 cm v štádiu progresie, kde tento vred bol po rôznej liečbe považovaný za takmer beznádejný. 700 µl prípravku EMDOGAIN^R bolo aplikovaných na plochu približne 3 cm od horného okraja.

Po 7 dňoch nebola prítomná žiadna epitelizácia, ale liečená plocha bola transparentnejšia (lepšie štruktúrovaná) s malými rozptýlenými oblasťami granulácie a v tejto oblasti nebola bolesť ani známky progresie. Na rovnakú oblasť bolo aplikovaných 700 µl prípravku EMDOGAIN^R.

Po 4 týždňoch sa u pacientky rozvinula infekcia, pravdepodobne spôsobená *Pseudomonas*, v distálnej časti vredu neliečenej prípravkom EMDOGAIN^R. Bolo aplikovaných 700 µl prípravku EMDOGAIN^R. Infekcia vymizla po 7 dňoch.

Pacient 4

Pacientkou bola žena narodená v roku 1947 a mala varixy so superficiálnou tromboflebitídou po erysipelu a v čase zahájenia terapie prípravkom EMDOGAIN^R mala holeňový vred s veľkosťou približne 2 x 0,8 cm s čistou, ale negranulujúcou spodinou. Bolo aplikovaných 300 µl prípravku EMDOGAIN^R.

Po 7 dňoch sa veľkosť vredu zmenšila na približne 0,7 x 0,3 cm a po obvode bola prítomná epitelizácia a na spodine granulácia. Bolo aplikovaných 200 µl prípravku EMDOGAIN^R a potom bolo počas 5 týždňov aplikovaných 100 µl prípravku EMDOGAIN^R za týždeň. Vred bol považovaný za úplne zhojený po piatich týždňoch.

Príklad 14: EMDOGAIN^R ako doplnok pri nechirurgickej periodontálnej liečbe v mieste povrchu lalokov

Cieľom výskumu bolo zhodnotenie toho, či môže aplikácia prípravku EMDOGAIN^R zlepšiť výsledky hojenia po nechirurgickej periodontálnej liečbe. Špecifickým cieľom tejto štúdie bolo hodnotenie účinku v mieste povrchu lalokov.

Návrh štúdie

Štúdia bola vykonaná ako intra-individuálne longitudinálne testovanie s trvaním 6 mesiacov. Štúdia bola dvojito zaslepená, rozštiepená, placebom kontrolovaná a randomizovaná.

Jedincovia

14 pacientov liečených na Clinic of Periodontics, Department of Periodontology, Göteborg University, pre stredne pokročilú chorobu periodontu.

Zaraďovacie kritériá

- aspoň 3 miesta povrchu laloku v každom z 2 kontralaterálnych kvadrantov s hĺbkou vrecka pri sondovaní 5 mm a s aspoň jedným párom miest s hĺbkou pri sondovaní 6 mm;
- vybraný zub musí mať vitálnu dreň, ako je stanovené termálnou alebo elektrickou stimuláciou, alebo - pokiaľ bol liečený koreňový kanálok - musí byť asymptomatický a bez technických obťaží.

Liečba

Pri vstupnom vyšetrení boli všetci pacienti zoznámení so stavom a boli nim podané informácie o správnych meraniach supragingiválneho povlaku. Bolo vykonané hodnotenie rozsahu a polohy koreňa.

Potom, čo prestalo krvácanie z vreciek, bol do vreciek aplikovaný na 2 minúty 24% EDTA gél (získaný od Biora AB, Švédsko). Potom boli vrecká opatrne vypláchnuté salinickým roztokom a potom bola aplikovaná buď testovaná (EMDOGAIN^R), alebo kontrolná substancia (PGA gél).

Hodnotenie

Základné vyšetrenie, vyšetrenie v 1-, 2-, 3-, 8- a 24-mesiaci obsahovalo nasledujúce zložky:

1. stav orálnej hygieny - prítomnosť/neprítomnosť povlakov
2. stav ďasien - (Gingival Index; Loe 1967)
3. sondovanie hĺbky vrecka
4. sondovanie adherencie
5. krvácanie pri sondovaní - prítomnosť/neprítomnosť (15 sekúnd)
6. hypersenzitivita zubu - po vzduchovom stimule (áno/nie)

7. stupeň diskomfortu - zaznamenávaný 1-, 2- a 3-týždne po vyšetrení pri použití 10 cm << vizuálnej analógovej stupnice (VAS).

Povlaky; priemer (sd)

	kontrola	EMDOGAIN ^R
Vstupné vyšetrenie	0,10 (0,30)	0,19 (0,40)
1 týždeň	0,08 (0,27)	0,05 (0,22)
2 týždne	0,05 (0,22)	0,02 (0,15)
3 týždne	0,05 (0,22)	0,10 (0,30)
6 týždňov	0,14 (0,35)	0,19 (0,40)
26 týždňov	0,12 (0,33)	0,07 (0,34)

Gingiválny index; priemer (sd)

	kontrola	EMDOGAIN ^R
Vstupné vyšetrenie	1,40 (0,50)	1,40 (0,50)
1 týždeň	1,00 (0,32)	0,87 (0,52)
2 týždne	0,83 (0,44)	0,74 (0,45)
3 týždne	0,69 (0,60)	0,60 (0,50)
6 týždňov	0,67 (0,53)	0,64 (0,58)
26 týždňov	0,62 (0,54)	0,62 (0,49)

Krvácanie pri sondovaní; %

	kontrola	EMDOGAIN ^R
Vstupné vyšetrenie	100	100
1 týždeň	67	44
2 týždne	43	33
3 týždne	29	26
6 týždňov	33	31
26 týždňov	19	24

Subjektívne hodnotenie pacienta; VAS skóre

Týždeň 1

	kontrola	EMDOGAIN ^R
VAS skóre		
0-20	8%	0%
21-40	15%	8%
41-60	31%	30%
61-80	8%	0%
81-100	38%	62%

Týždeň 3

	kontrola	EMDOGAIN ^R
VAS skóre		
0-20	14%	7%
21-40	0%	7%
41-60	3%	0%
61-80	21%	22%
81-100	57%	64%

Záver

Pacienti mali menej pooperačných problémov, menšie krvácanie a lepší gingiválny index. Tieto výsledky podporujú priaznivý efekt EMDOGAINU^R na hojenie rán.

Príklad 15: Pilotná štúdia hojenia rán na ošípaných

Úvod

Predmet štúdie

Predmetom štúdie je hodnotenie hojenia rezných rán u ošípaných a hodnotenie vplyvu EMD na tieto rany.

Dôvody pre voľbu zvieracieho druhu

Ošípané sú vybrané ako testovací model preto, že bolo overené, že tento druh je dobrým modelom na hodnotenie hojenia rán u človeka.

Materiály a metódy

Zvieratá

Pokus bol vykonaný na 4 samiciach SPF ošípaných (krížencov "Danish country", Yorkshire a Duroc). V čase zahájenia aklimatizačného obdobia mali zvieratá telesnú hmotnosť približne 35 kg.

Zvieratá sa nechali aklimatizovať počas 1 týždňa, počas ktorého boli zvieratá sledované na vylúčenie zvierat v špatnom zdravotnom stave. Všetky pozorovania boli zaznamenávané.

Chov

Štúdia bola uskutočnená v zvieracom boxe opatrenom filtráciou vzduchu pri teplote $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, relatívnej vlhkosti $55\% \pm 15\%$ a výmene vzduchu 10-krát za hodinu. Box bol osvetľovaný v cykle 12 hodín svetla a 12 hodín šera. Svetlo bolo od 06 do 18 h.

Zvieratá boli v boxoch umiestnené samostatne.

Podstielka

Ako podstielka boli použité piliny "LIGNOCEL H 3/4" od Hahn and Co., D-24796, Bredenbek-Kronsborg. Bola vykonaná pravidelná analýza na možné kontaminujúce zložky.

Potrava

Bola podávaná komerčne dostupná potrava pre ošípaných Altromin 9033 od Chr. Petersen A/S, DK-4100 Ringsted (približne 800 g dvakrát denne). Pravidelne bola vykonávaná analýza hlavných nutričných zložiek a možných kontaminujúcich zložiek.

Pitie

Dvakrát denne bola zvieratám podávaná pitná voda. Bola vykonaná pravidelná analýza na možné kontaminujúce zložky.

Poranenia

Poranenia boli vytvorené v deň 1. Zvieratá boli uvedené do anestézy prípravkami Stresnil^R Vet. Janssen, Belgia (40 mg azaperonu/ml, 1 ml/kg) a Atropinom DAK Dánsko (1 mg atropínu/ml, 0,5 ml/10 kg), ktoré boli podané ako jedna intramuskulárna injekcia, po ktorej nasledovala i.v. injekcia prípravku Hypnodil^R Janssen, Belgia (50 mg metomidátu/ml, približne 2 ml).

V dorzolaterálnej oblasti na jednej strane boli zvieratá vyholené, omyté mydlom a vodou, dezinfikované 70% etanolom, ktorý bol opláchnutý sterilným salinickým roztokom, a nakoniec boli osušené sterilnou gázou.

8 poranení (25 x 25 x 0,4 mm) bolo urobených na pripravených plochách, 4 na každej strane chrbta, pri použití ACCU-Dermatom (GA 630, Aesculap^R). Rany boli očíslované 1 (najviac kraniálna) až 4 (najviac kaudálna) na ľavej strane chrbta a 5 (najviac kraniálna) až 8 (najviac kaudálna) na pravej strane chrbta.

Zrazená krv bola odstránená sterilnou gázou.

Bezprostredne pred chirurgickým zákrokom, približne 8 hodín po zákroku a kedykoľvek to bolo nutné bola zvieratám podaná intramuskulárna injekcia prípravku Anorfin^R, A/S GEA, Dánsko (0,3 mg buprenorfinu/ml, 0,04 ml/kg).

Dávkovanie

Poranenia boli liečené nasledovne:

	Zviera č.			
	1		2	
Lokalizácia	naľavo	napravo	naľavo	napravo
Kraniálne	A			B
	B	A		
		B	A	
Kaudálne			B	A

	Zviera č.			
	3		4	
Lokalizácia	naľavo	napravo	naľavo	napravo
Kraniálne	A			B
	B	A		
		B	A	
Kaudálne			B	A

A = kontrola

B = EMD

Približne 15 minút pred podaním bol EMD prostriedok pripravený podľa návodu výrobcu. EMD prostriedok bol použitý počas 2 hodín po príprave. Na poranenia liečené spôsobom B bol EMD aplikovaný vo forme tenkej vrstvy na povrch poranenia. Jedna ampula EMD bola použitá na 4 rany.

Obväzy

Rany boli obviazané pri použití Tegaderm^R. Obväzy boli prekryté gázovou bandážou fixovanou prípravkom Fixomul^R. Obväzy, gáza a Fixomul^R boli fixované prubánovým obvazom, Bend-a-rete^R (Tesval, Itália). Obväzy boli kontrolované denne.

Obväzy boli menené v deň 2 (všetky zvieratá) a 3 (zvieratá č. 3 a 4).

Pred každou výmenou obväzu boli zvieratá uvedené do anestézy intramuskulárnou injekciou do krku (1,0 ml/10 kg telesnej hmotnosti) zmesi Zoletil 50^RVet., Virbac, Francie (125 mg tiletaminu a 125 mg zolazepámu v 5 ml rozpúšťadla, 5 ml) Rompun^RVet., Bayer, Nemecko (20 mg xylazínu/ml, 6,5 ml) a Methadonu^RDAK, Nycomed DAK, Dánsko (10 mg metadónu/ml, 2,5 ml).

Kontrola rán

Každá rana bola skontrolovaná a fotografovaná v deň 2 (všetky zvieratá), 3 (všetky zvieratá) a 4 (zvieratá č. 3 a 4). Bol hodnotený stupeň exsudácie a zápalu. Zistenie novotvorenej epidermis bolo opísané podrobne.

Klinické príznaky

Všetky viditeľné známky ochorenia a akékoľvek zmeny správania boli zaznamenávané denne. Akákoľvek odchýlka od normálu bola opísaná s ohľadom na čas vzniku, trvania a intenzitu.

Telesná hmotnosť

Zvieratá boli zvážené pri dodaní, v deň vytvorenia poranenia a pri ukončení testu.

Konečné vyšetrenie

V deň 3 (približne 56 hodín po poranení) boli zvieratá č. 1 a 2 usmrtené incisiou v oblasti véna a artéria subclavia, ktorá bola vykonaná po omráčení pištoľou.

V deň 4 (približne 72 hodín po poranení) boli zvieratá č. 3 a 4 usmrtené incisiou v oblasti véna a artéria subclavia, ktorá bola vykonaná po omráčení pištoľou.

Odber tkanivových vzoriek

Každá rana bola vyrezaná ako blok separovaný od kostrového svalu. Pokiaľ bola prítomná akákoľvek adherencia na prítomný kostrový sval, tak bola časť svalu obsiahnutá v materiáli na fixáciu. Každý blok bol fixovaný vo fosfátom tlmenom neutrálnom 4% formaldehyde.

Histologické vzorky

Po fixácii boli 4 reprezentatívne vzorky z všetkých rán ponorené do parafínu, narezané na nominálnu hrúbku 5 μm a farbené hematoxylínom a eozínom. Po farbení boli rezy prezreté v svetelnom mikroskope pri použití mriežky. To umožnilo meranie celkovej dĺžky rany a dĺžky epitelizovaného povrchu. Tento pomer bol vyjadrený ako percento rany pokrytej epitelom na sklíčko. Boli určené priemerné hodnoty pre každú ranu a potom boli vyrátané priemery pre skupinu.

Štatistická analýza

Údaje boli spracované na dosiahnutie priemerných hodnôt pre skupinu a štandardných odchýlok. Tiež boli identifikované hodnoty ležiace pomimo rozsah. Potom bola každá premenná testovaná na homogenitu variancie pri použití Barlettovho testu. Pokiaľ bola variancia homogénna, tak bola pre premennú vykonaná analýza variancie. Pokiaľ boli detekované štatisticky významné odlišnosti, tak mohli byť možné rozdiely medzi skupinami testované Dunnettovým testom. Pokiaľ bola variancia heterogénna, tak bola každá premenná testovaná Shapiro-Wilkovou metódou. V prípade normálnej distribúcie mohli byť možné rozdiely medzi skupinami identifikované Student-t testom. Inak boli rozdiely medzi skupinami hodnotené Kruskal-Wallisovým testom. Pokiaľ boli detekované akékoľvek štatisticky významné rozdiely medzi skupinami, tak bola následná identifikácia skupín vykonaná pri použití Wilcoxon Rank-Sum testu.

Štatistická analýza bola vykonaná pri použití SAS^R procedúr (verzia 6.12) opísaných v SAS/STAT^R User's Guide, verzia 6, 4. vydanie, zväzok 1+2", 1989, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina 27513, USA.

Zoznam sekvencií

<110> Biora AB

<120> Prostriedky na báze proteínov matrice na hojenie rán

<130> 20542PC1

<160> 2

<170> FastSEQ pre Windows Verzia 3.0

<210> 1

<211> 407

<212> PRT

<213> neznámy

Met	Ser	Ala	Ser	Lys	Ile	Pro	Leu	Phe	Lys	Met	Lys	Gly	Leu	Leu	Leu	
1				5					10				15			
Phe	Leu	Ser	Leu	Val	Lys	Met	Ser	Leu	Ala	Val	Pro	Ala	Phe	Pro	Gln	
			20					25					30			
Arg	Pro	Gly	Gly	Gln	Gly	Met	Ala	Pro	Pro	Gly	Met	Ala	Ser	Leu	Ser	
		35					40					45				
Leu	Glu	Thr	Met	Arg	Gln	Leu	Gly	Ser	Leu	Gln	Gly	Leu	Asn	Ala	Leu	
	50					55					60					
Ser	Gln	Tyr	Ser	Arg	Leu	Gly	Phe	Gly	Lys	Ala	Leu	Asn	Ser	Leu	Trp	
65					70				75						80	
Leu	His	Gly	Leu	Leu	Pro	Pro	His	Asn	Ser	Phe	Pro	Trp	Ile	Gly	Pro	
				85					90					95		
Arg	Glu	His	Glu	Thr	Gln	Gln	Pro	Ser	Leu	Gln	Pro	His	Gln	Pro	Gly	
			100					105					110			
Leu	Lys	Pro	Phe	Leu	Gln	Pro	Thr	Ala	Ala	Thr	Gly	Val	Gln	Val	Thr	
		115					120					125				
Pro	Gln	Lys	Pro	Gly	Pro	His	Pro	Pro	Met	His	Pro	Gly	Gln	Leu	Pro	
		130				135					140					
Leu	Gln	Glu	Gly	Glu	Leu	Ile	Ala	Pro	Asp	Glu	Pro	Gln	Val	Ala	Pro	
145					150				155						160	
Ser	Glu	Asn	Pro	Pro	Thr	Pro	Glu	Val	Pro	Ile	Met	Asp	Phe	Gly	Asp	
				165					170					175		
Pro	Gln	Phe	Pro	Thr	Val	Phe	Gln	Ile	Ala	His	Ser	Leu	Ser	Arg	Gly	
			180					185					190			
Pro	Met	Ala	His	Asn	Lys	Val	Pro	Thr	Phe	Tyr	Pro	Gly	Met	Phe	Tyr	
		195					200					205				
Met	Ser	Tyr	Gly	Ala	Asn	Gln	Leu	Asn	Ala	Pro	Gly	Arg	Ile	Gly	Phe	
		210				215					220					
Met	Ser	Ser	Glu	Glu	Met	Pro	Gly	Glu	Arg	Gly	Ser	Pro	Met	Gly	Tyr	
225					230					235					240	
Gly	Thr	Leu	Phe	Pro	Gly	Tyr	Gly	Gly	Phe	Arg	Gln	Thr	Leu	Arg	Gly	
				245					250					255		
Leu	Asn	Gln	Asn	Ser	Pro	Lys	Gly	Gly	Asp	Phe	Thr	Val	Glu	Val	Asp	
			260					265					270			
Ser	Pro	Val	Ser	Val	Thr	Lys	Gly	Pro	Glu	Lys	Gly	Glu	Gly	Pro	Glu	
		275					280					285				
Gly	Ser	Pro	Leu	Gln	Glu	Pro	Ser	Pro	Asp	Lys	Gly	Glu	Asn	Pro	Ala	
		290				295					300					
Leu	Leu	Ser	Gln	Ile	Ala	Pro	Gly	Ala	His	Ala	Gly	Leu	Leu	Ala	Phe	
305					310					315					320	
Pro	Asn	Asp	His	Ile	Pro	Asn	Met	Ala	Arg	Gly	Pro	Ala	Gly	Gln	Arg	

325 330 335
 Leu Leu Gly Val Thr Pro Ala Ala Ala Asp Pro Leu Ile Thr Pro Glu
 340 345 350
 Leu Ala Glu Val Tyr Glu Thr Tyr Gly Ala Asp Val Thr Thr Pro Leu
 355 360 365
 Gly Asp Gly Glu Ala Thr Met Asp Ile Thr Met Ser Pro Asp Thr Gln
 370 375 380
 Gln Pro Pro Met Pro Gly Asn Lys Val His Gln Pro Gln Val His Asn
 385 390 395 400
 Ala Trp Arg Phe Gln Glu Pro
 405

<210> 2

<211> 324

<212> PRT

<213> neznámy

Met Lys Pro Asn Ser Met Glu Asn Ser Leu Pro Val His Pro Pro Pro
 1 5 10 15
 Leu Pro Ser Gln Pro Ser Leu Gln Pro His Gln Pro Gly Leu Lys Pro
 20 25 30
 Phe Leu Gln Pro Thr Ala Ala Thr Gly Val Gln Val Thr Pro Gln Lys
 35 40 45
 Pro Gly Pro His Pro Pro Met His Pro Gly Gln Leu Pro Leu Gln Glu
 50 55 60
 Gly Glu Leu Ile Ala Pro Asp Glu Pro Gln Val Ala Pro Ser Glu Asn
 65 70 75 80
 Pro Pro Thr Pro Glu Val Pro Ile Met Asp Phe Gly Asp Pro Gln Phe
 85 90 95
 Pro Thr Val Phe Gln Ile Ala His Ser Leu Ser Arg Gly Pro Met Ala
 100 105 110
 His Asn Lys Val Pro Thr Phe Tyr Pro Gly Met Phe Tyr Met Ser Tyr
 115 120 125
 Gly Ala Asn Gln Leu Asn Ala Pro Gly Arg Ile Gly Phe Met Ser Ser
 130 135 140
 Glu Glu Met Pro Gly Glu Arg Gly Ser Pro Met Gly Tyr Gly Thr Leu
 145 150 155 160
 Phe Pro Gly Tyr Gly Gly Phe Arg Gln Thr Leu Arg Gly Leu Asn Gln
 165 170 175
 Asn Ser Pro Lys Gly Gly Asp Phe Thr Val Glu Val Asp Ser Pro Val
 180 185 190
 Ser Val Thr Lys Gly Pro Glu Lys Gly Glu Gly Pro Glu Gly Ser Pro
 195 200 205
 Leu Gln Glu Pro Ser Pro Asp Lys Gly Glu Asn Pro Ala Leu Leu Ser
 210 215 220
 Gln Ile Ala Pro Gly Ala His Ala Gly Leu Leu Ala Phe Pro Asn Asp
 225 230 235 240
 His Ile Pro Asn Met Ala Arg Gly Pro Ala Gly Gln Arg Leu Leu Gly
 245 250 255
 Val Thr Pro Ala Ala Ala Asp Pro Leu Ile Thr Pro Glu Leu Ala Glu
 260 265 270

Val Tyr Glu Thr Tyr Gly Ala Asp Val Thr Thr Pro Leu Gly Asp Gly .
275 280 285
Glu Ala Thr Met Asp Ile Thr Met Ser Pro Asp Thr Gln Gln Pro Pro
290 295 300
Met Pro Gly Asn Lys Val His Gln Pro Gln Val His Asn Ala Trp Arg
305 310 315 320
Phe Gln Glu Pro

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použitie prípravku aktívnej substancie zubnej skloviny na prípravu farmaceutického alebo kozmetického prostriedku na hojenie rán na koži alebo na sliznici.

2. Použitie prípravku aktívnej substancie zubnej skloviny na prípravu farmaceutického alebo kozmetického prostriedku na zlepšenie hojenia rán na koži alebo na sliznici.

3. Použitie prípravku aktívnej substancie zubnej skloviny na prípravu farmaceutického alebo kozmetického prostriedku na regeneráciu alebo reparáciu kože alebo sliznice.

4. Použitie podľa akéhokoľvek z nárokov 1-3, v ktorom je rana prítomná na sliznici v dutine ústnej.

5. Použitie podľa akéhokoľvek z nárokov 1-3, v ktorom je rana poranenia alebo traumy spojené s orálnym chirurgickým výkonom vrátane periodontálnej chirurgie, extrakcie zubu, endodontickej terapie, vkladania zubných implantátov, aplikácie a používania zubných protéz.

6. Použitie podľa akéhokoľvek z nárokov 1-3, v ktorom je rana vybraná zo skupiny zahrňajúcej aseptické rany, zmliaždené rany, rezné rany, tržné rany, nepenetrujúce rany, otvorené rany, penetrujúce rany, perforujúce rany, bodné rany, septické rany, infarkty a podkožné rany.

7. Použitie podľa akéhokoľvek z nárokov 1-3, v ktorom je rana vybraná zo skupiny zahrňajúcej ischemické vredy, preležaniny, fistuly, ťažšie pohryznutia, popáleniny a defekty po odberu orgánu.

8. Použitie podľa akéhokoľvek z nárokov 1-4, v ktorom je rana vybraná zo skupiny zahŕňajúcej aftózne rany, traumatické rany a rany asociované s herpes.

9. Použitie prípravku aktívnej substancie zubnej skloviny na prípravu farmaceutického prostriedku na prevenciu a/alebo liečbu infekcie.

10. Použitie podľa nároku 9, kde infekcia je spôsobená mikroorganizmom.

11. Použitie podľa nároku 9 alebo 10 na prevenciu alebo liečbu rastu baktérií na sliznicovom povrchu.

12. Použitie podľa nároku 9 alebo 10 na prevenciu alebo liečbu rastu baktérií na nechtu alebo na povrchu zubu.

13. Použitie podľa nároku 9 alebo 10, kde infekcia je prítomná v dutine ústnej.

14. Použitie podľa nároku 13 na profylaxiu a/alebo liečbu bakteriálnej infekcie v dutine ústnej.

15. Použitie podľa akéhokoľvek z nárokov 9-14, v ktorom je infekcia spôsobená baktériou spôsobujúcou zubný kaz, ako je napríklad *Streptococcus mutans*; baktériou spôsobujúcou ochorenie periodontu, ako je napríklad *Actinobacillus actinomyces*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter Fusobacterie*, *Staphylococci*), *B. forsythus*; baktériou spôsobujúcou alveolitídu, ako je napríklad *Staphylococcus*, *Actinomyces* a *Bacillus*; a baktériou spôsobujúcou periapikálne lézie, ako sú napríklad *Spirochetes*.

16. Použitie podľa akéhokoľvek z nárokov 9-11, kde baktéria je prítomná na koži.

17. Použitie prípravku aktívnej substancie zubnej skloviny na prípravu farmaceutického prostriedku na prevenciu a/alebo liečbu zápalu kože alebo sliznice.

18. Použitie podľa nároku 17, v ktorom je zápal prítomný v dutine ústnej.

19. Použitie podľa nároku 17, v ktorom je zápal prítomný v mieste odberu kostového štepu.

20. Použitie podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom je aktívnou substanciou zubnej skloviny matrica zubnej skloviny, deriváty matrice zubnej skloviny a/alebo proteíny matrice zubnej skloviny.

21. Použitie podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom je aktívna substancia zubnej skloviny vybraná zo skupiny skladajúcej sa z enamelinov, amelogeninov, non-amelogeninov, non-amelogeninov bohatých na prolín, amelinov (ameloblastinu, sheatlinu), tuftelinov a ich derivátov a zmesí.

22. Použitie podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom má aktívna substancia zubnej skloviny molekulovú hmotnosť najviacej 120 kDa, napríklad najviacej 100 kDa, 90 kDa, 80 kDa, 70 kDa alebo 60 kDa, ako je určené SDS PAGE elektroforézou.

23. Použitie podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom obsahuje prípravok aktívnej substancie zubnej skloviny zmes aktívnych substancií zubnej skloviny s rôznymi molekulovými hmotnosťami.

24. Použitie podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom obsahuje prípravok aktívnej substancie zubnej skloviny aspoň dve substancie vybrané zo skupiny zahŕňajúcej amelogeniny, non-amelogeniny bohaté na prolín, tuftelin, trsové proteíny, sérové proteíny, slinové proteíny, amelin, ameloblastin, sheatlin a ich deriváty.

25. Použitie podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom má aktívna substancia zubnej skloviny molekulovú hmotnosť najviacej 40000.

26. Použitie podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom má aktívna substancia zubnej skloviny molekulovú hmotnosť v rozmedzí od približne 5000 do približne 25000.

27. Použitie podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom má hlavná časť aktívnej substancie zubnej skloviny molekulovú hmotnosť približne 20 kDa.

28. Použitie podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom je aspoň časť aktívnej substancie zubnej skloviny vo forme agregátov alebo môže po aplikácii tvoriť agregáty.

29. Použitie podľa nároku 26, v ktorom majú agregáty veľkosť častíc od približne 20 nm do približne 1 μ m.

30. Použitie podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich nárokov, v ktorom je obsah proteínu v prípravku aktívnej substancie zubnej skloviny v rozmedzí od približne 0,05% hmotn./hmotn. do 100% hmotn./hmotn., napríklad od približne 5-99% hmotn./hmotn.; približne od 10-95% hmotn./hmotn.; približne od 15-90% hmotn./hmotn.; približne od 20-90% hmotn./hmotn.; približne od 30-90% hmotn./hmotn.; približne od 40-85% hmotn./hmotn.; približne od 50-80% hmotn./hmotn.; pri-

bližne od 60-70% hmotn./hmotn.; približne od 70-90% hmotn./
hmotn.; alebo približne od 80-90% hmotn./hmotn.

31. Použitie podľa akéhokoľvek z predchádzajúcich nárokov,
v ktorom farmaceutický prostriedok ďalej obsahuje farmaceu-
tický prijateľnú prísadu.

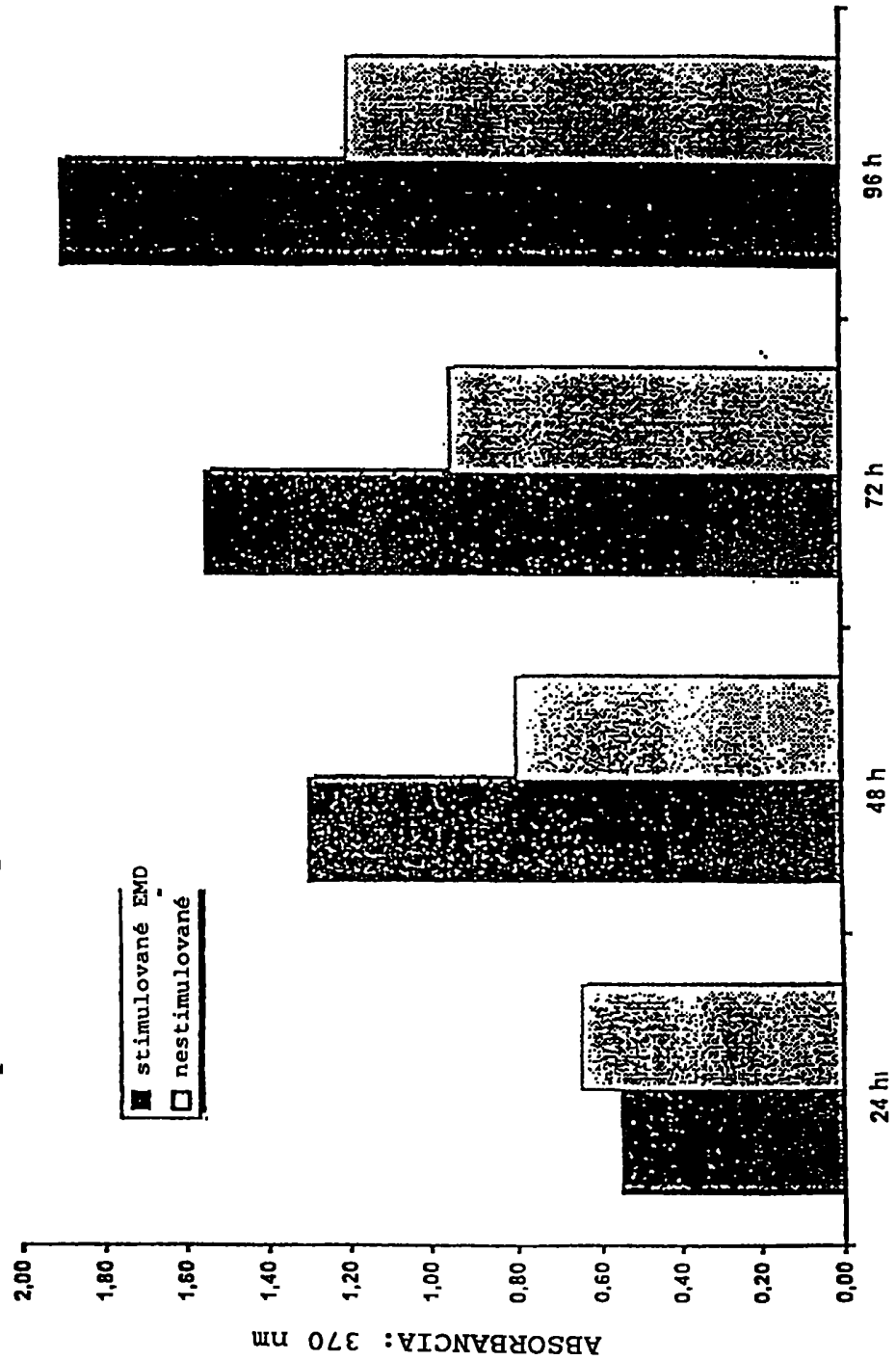
32. Použitie podľa nároku 31, v ktorom je farmaceutický
prijateľnou prísadou propylénglykolalginát.

33. Použitie podľa nároku 31, v ktorom je farmaceutický
prijateľnou prísadou kyselina hyalurónová alebo jej soľ alebo
derivát.

34. Použitie podľa akéhokoľvek z nárokov 1-33, v ktorom je
na hojenie rán na koži alebo na slizniciach použitý EMDOGAIN^R
alebo akýkoľvek proteín alebo peptid obsiahnutý v tomto prí-
pravku.

1/11

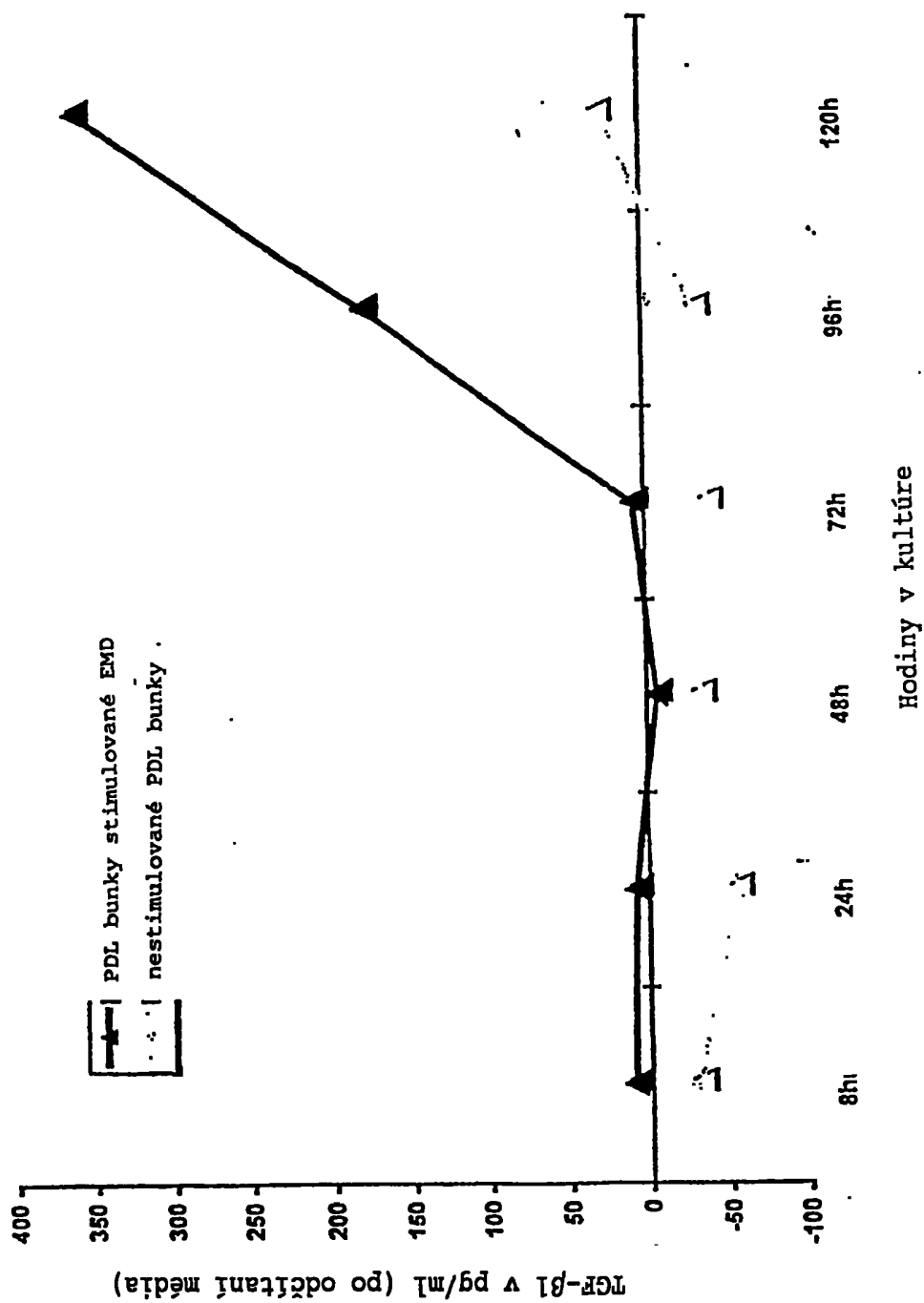
Syntéza DNA podľa inkorporácie BrdU v ľudských PDL bunkách



Obr. 1

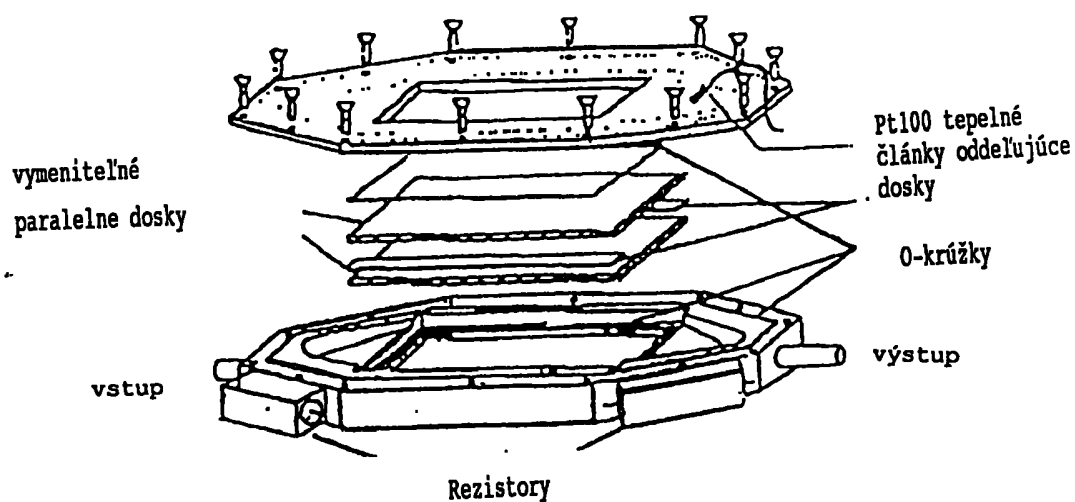
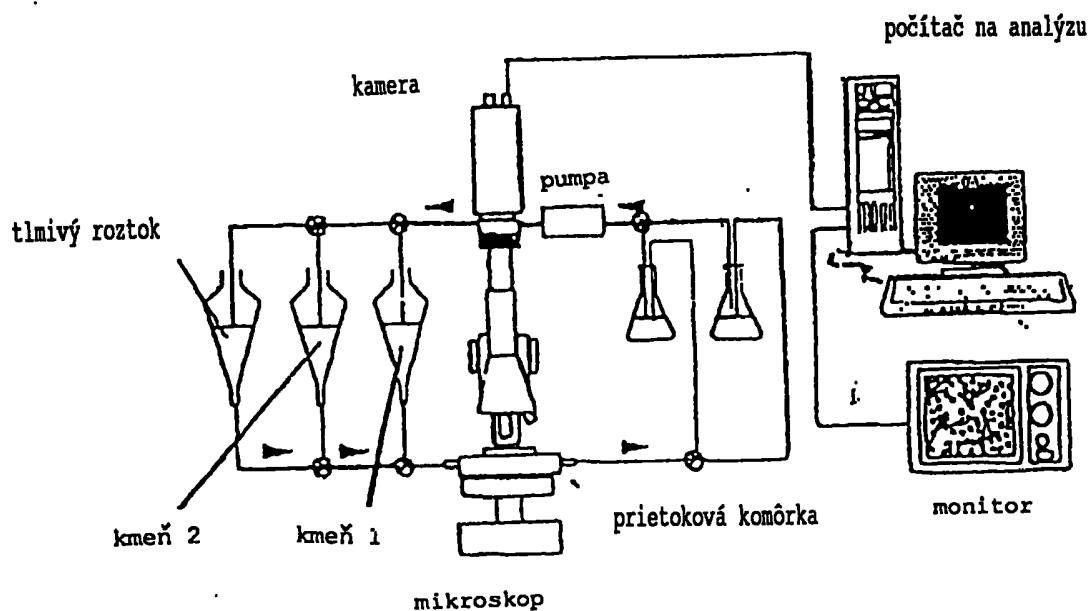
2/11

Produkcia TGF- β 1 v ľudských PDL bunkách stimulovaných
a nestimulovaných EMD



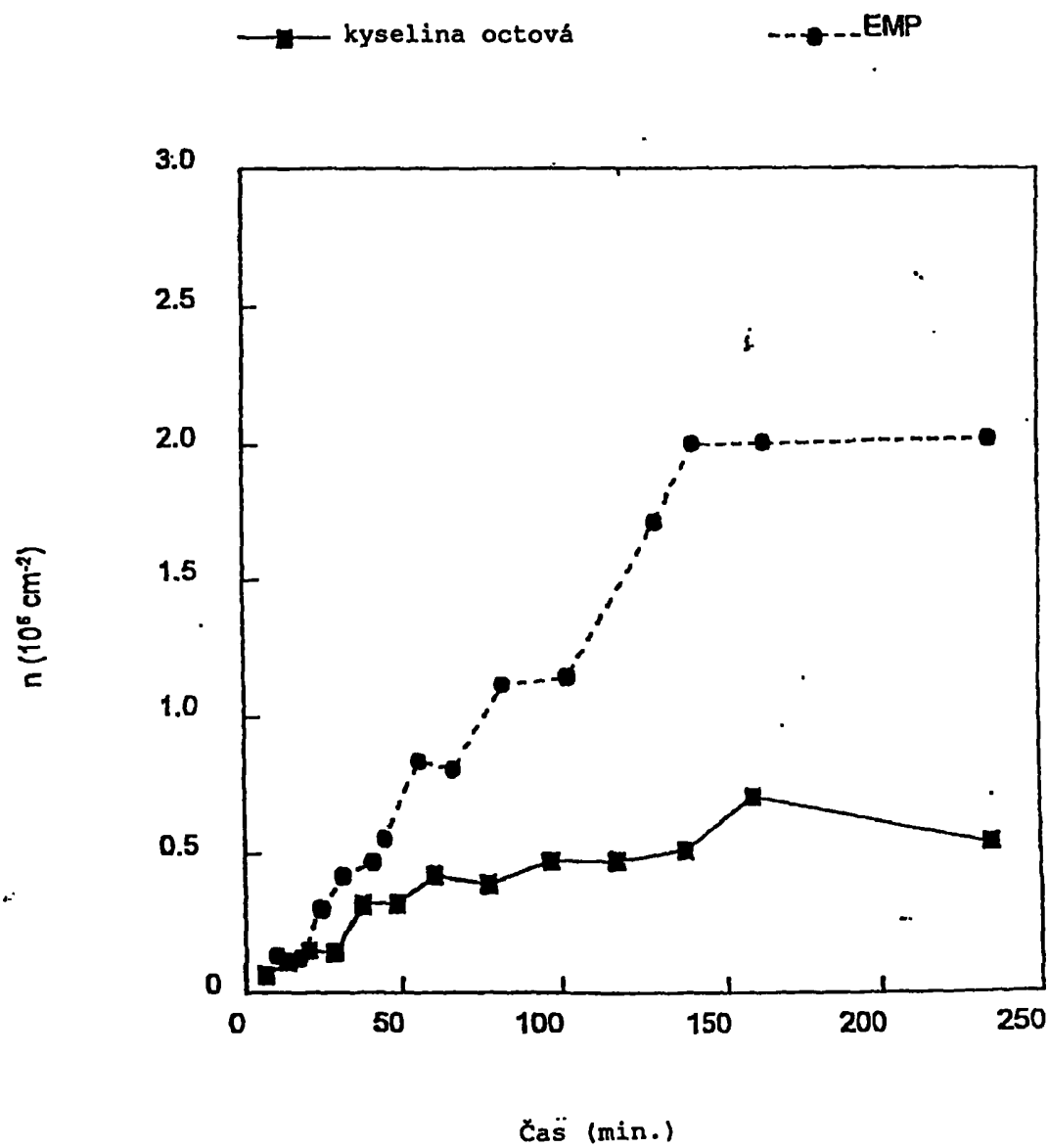
Obr. 2

3/11



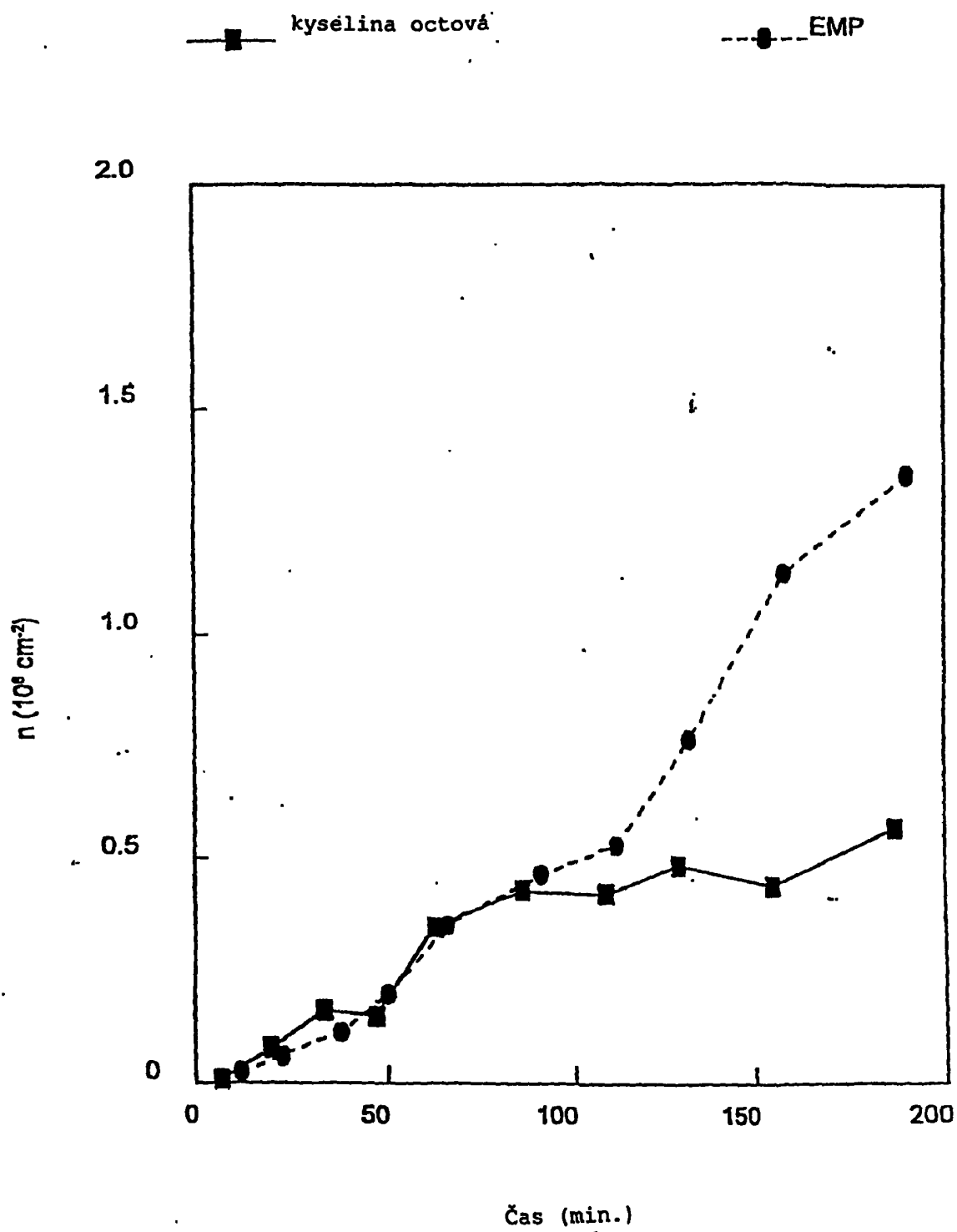
Obr. 3

4/11



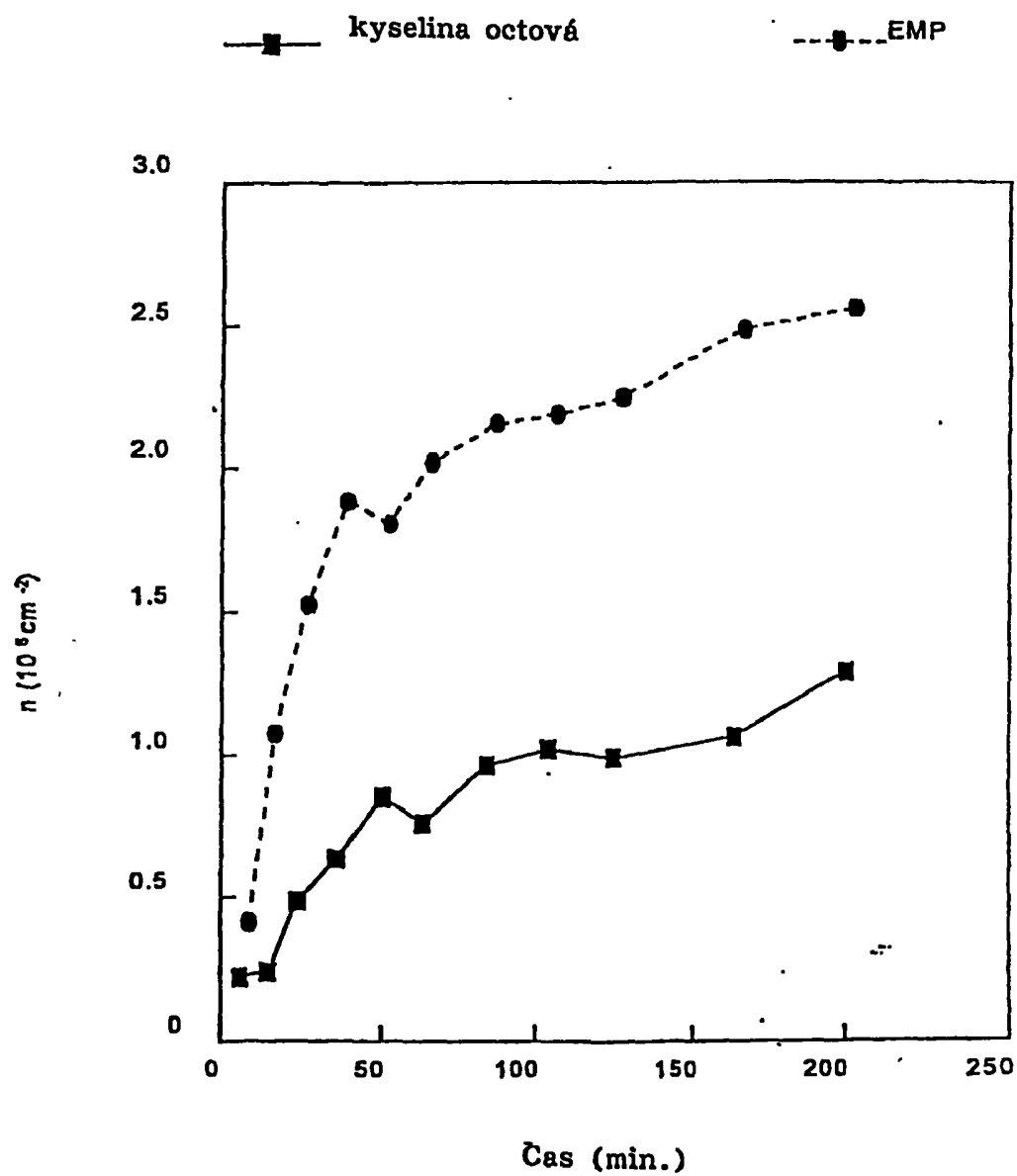
Obr. 4

5/11



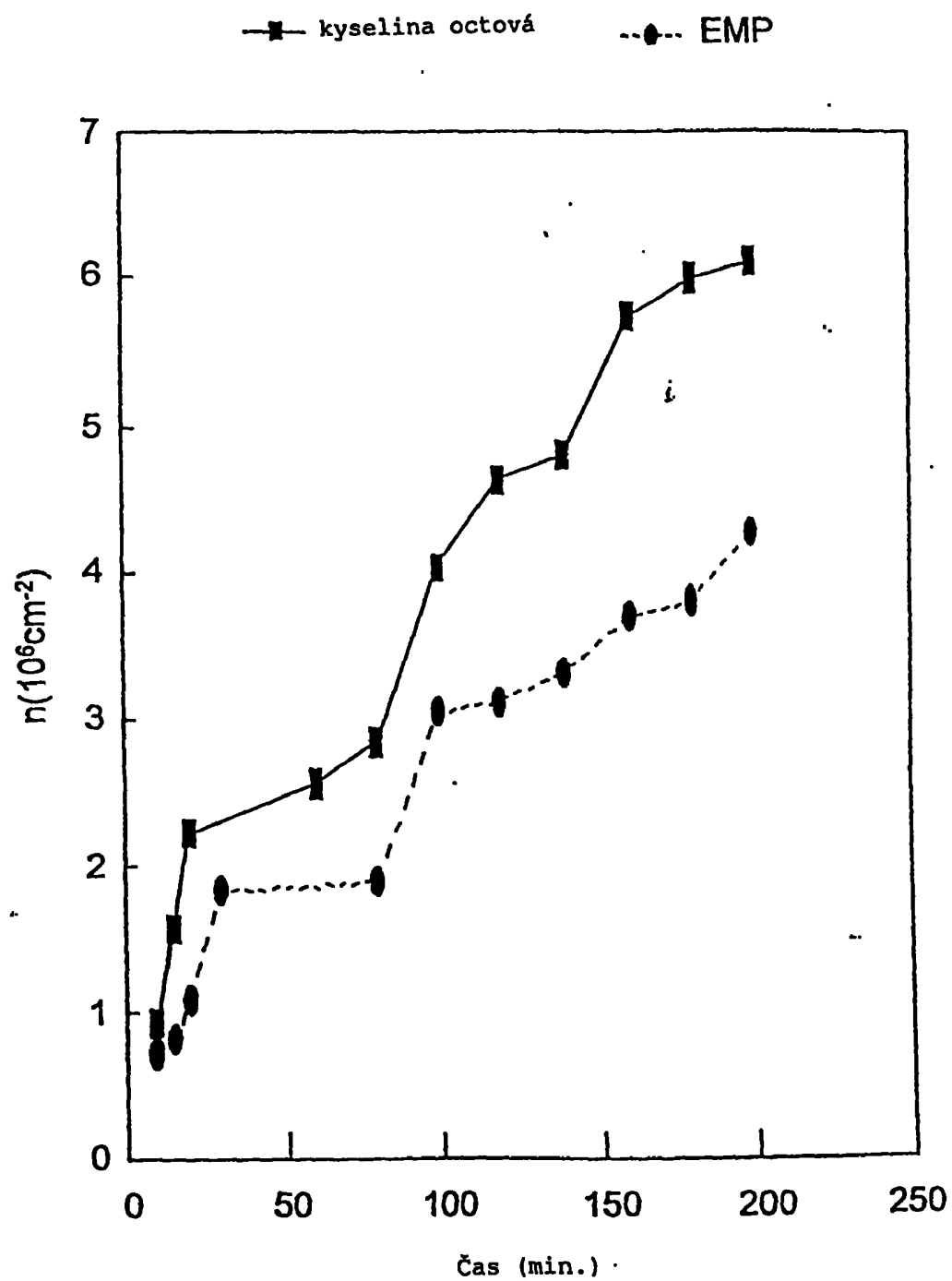
Obr. 5

6/11



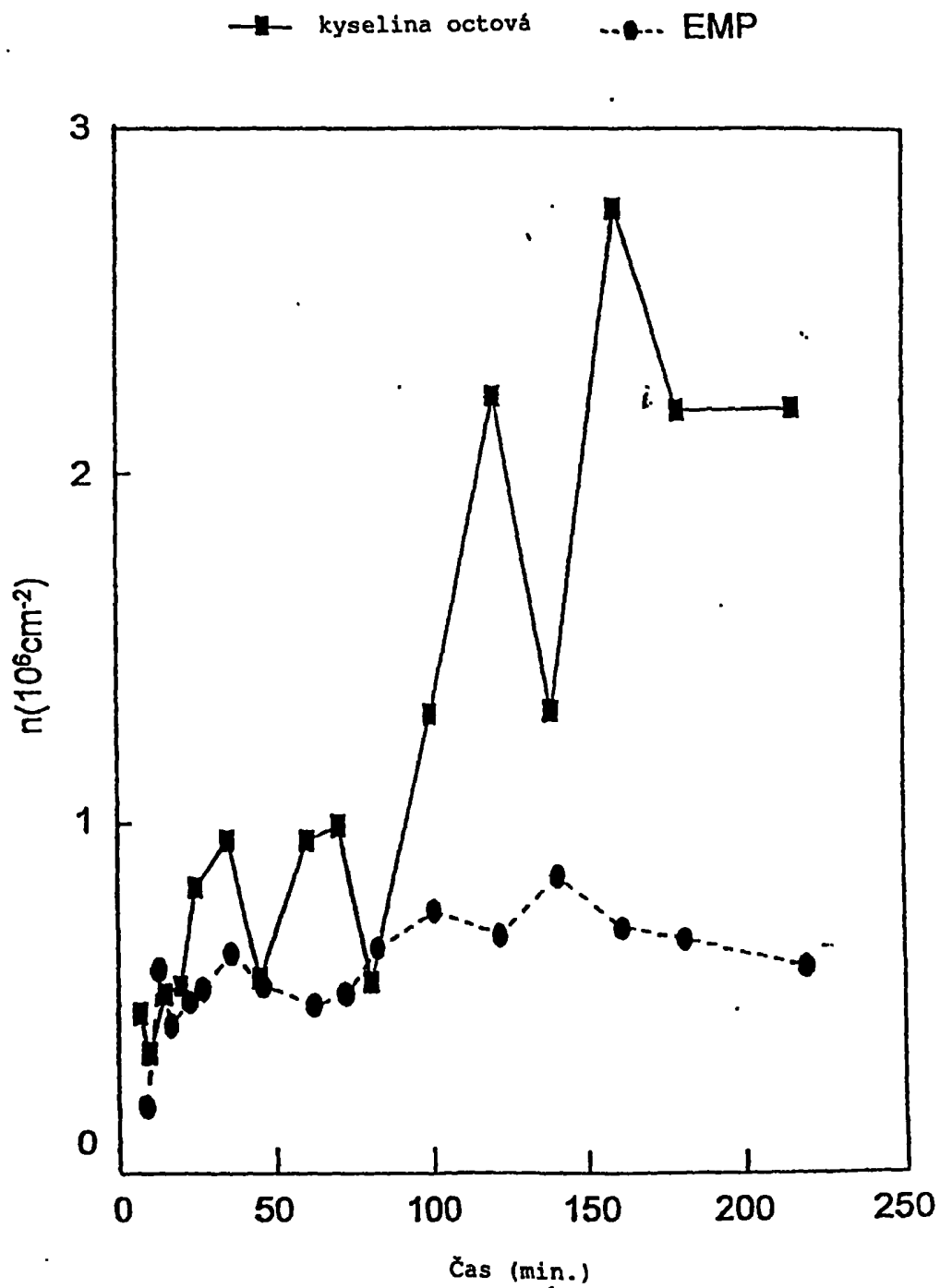
obr. 6

7/11



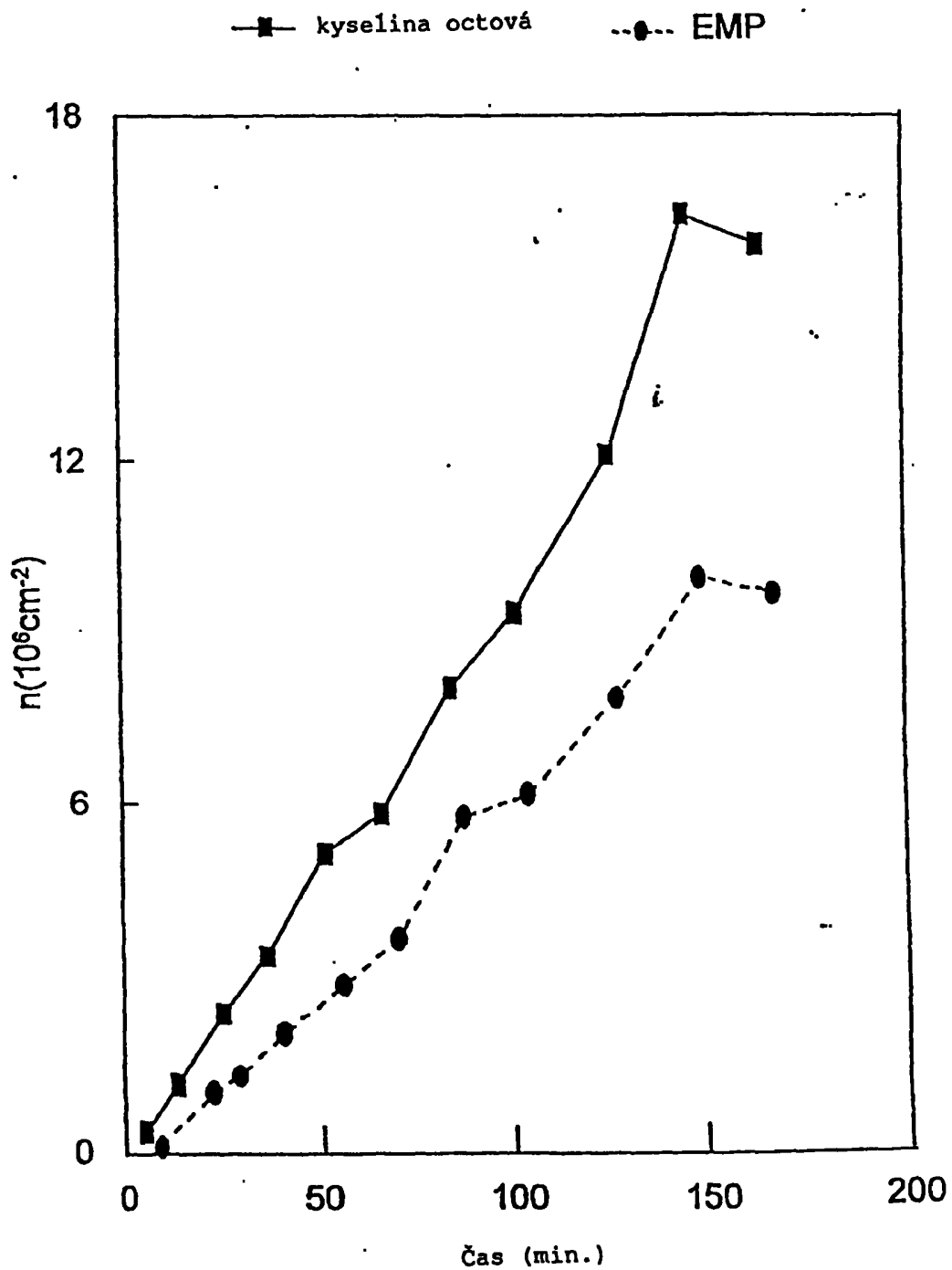
Obr. 7

8/11



Obr. 8

9/11



Obr. 9

10/11



Obr. 10A

11/11



Obr. 10B