

P0101710

KÖZZÉTÉTELI
PÉLDÁNY



42

Mátrix-protein kompozíciók sebgyógyulás elősegítésére

KIVONAT

A találmány aktív zománcanyag-készítmény alkalmazására vonatkozik, éspedig olyan gyógyszerkészítmények vagy kozmetikai készítmények előállítására, amelyek sebek gyógyítására, sebgyógyulás elősegítésére, lágy szövetek regenerálására és kijavítására, továbbá fertőzések és gyulladások megelőzésére és kezelésére szolgálnak. Az aktív zománcanyag növényben levő fogakból nyerhető.

ellenőrző aláírás

PO 10 1710

KÖZZÉTÉTELI PÉLDÁNY



AZ

Mátrix-protein kompozíciók sebgyógyulás elősegítésére

A találmány kezelési és megelőzési célokra alkalmazható zománc mátrixra, zománc mátrix származékokra és/vagy zománc mátrix proteinekre vonatkozik. Az anyagok sebgyógyító, antibakteriális és/vagy gyulladásellenes hatással rendelkeznek.

A zománc mátrix proteinek, például a zománc mátrixokban jelen levő proteinek legtöbbje jól ismert zománc prekursor. A szabadalmi szakirodalom szerint zománc proteinek és zománc mátrix származékok indukálhatják szilárd szövet kialakulását (azaz zománc kialakulását, lásd pl. az US-4 672 032 számú iratot [Slavkin]) vagy szilárd szövetek közötti kötés kialakulását (lásd pl. az EP-B-0 337 967; EP-B-0 263 086 számú iratokat). Vagyis a szakirodalomból csak a szilárd szövetek regenerálása ismerhető meg, míg találmányunk lágy szövetekre gyakorolt hasznos hatások, így a sebgyógyító, antibakteriális és gyulladásellenes hatás nem várt felismerésén alapszik.

Találmányunk tehát azon a felismerésen alapszik, hogy a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek (a továbbiakban a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek helyett az "aktív zománcanyag" kifejezést is használjuk) hasznos ágensek lágy szövetekben (azaz nem-mineralizálódott szövetekben), például kollagént vagy epitélimot tartalmazó szövetekben, így a bőrön és nyálkahártyán, izmokban, vér- és nyirokerekben, idegszövetben, mirigyekben, inakban, szemben és porcokban levő sebek gyógyulásának elősegítésére vagy fokozására. Amint a kísérleti részben bemutatjuk, a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek különösen előnyös



hatást fejtenek ki a lágy szövetekben sebek gyógyítására és megelőzésére.

Ennek megfelelően a találmány aktív zománcanyagot tartalmazó készítményeknek gyógyszerkészítmények vagy kozmetikai készítmények előállítására történő alkalmazására vonatkozik, amelyek (i) sebgyógyításra, (ii) sebgyógyulás fokozására és/vagy (iii) lágy szövetek regenerálására és/vagy kijavítására alkalmazhatók.

A találmány szerinti megoldás tehát alkalmas sebgyógyulás fokozására és lágy szövetek regenerálásának és/vagy kijavításának fokozására oly módon, hogy a kezelésre szoruló egyénnek az aktív zománcanyag terápiásan vagy profilaktikusan hatékony mennyiségét adagoljuk.

Ezenkívül a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és zománc mátrix proteinek antibakteriális és/vagy gyulladásellenes tulajdonságokkal rendelkeznek, így mind lágy, mind szilárd (azaz mineralizálódott) szövetek kezelésére alkalmazhatók.

A találmány tárgykörébe tartozik továbbá az aktív zománcanyagok alkalmazása olyan gyógyszerkészítmények előállítására, amelyek fertőzések vagy gyulladásos állapotok megelőzésére és/vagy kezelésére alkalmazhatók.

Sebgyógyulás

A sebek és/vagy fekélyek rendszerint a bőrből kitüremkedve vagy a nyálkahártya felületén helyezkednek el, vagy pedig valamely szervben infarktus következtében (sztrók) fordulnak elő. A sebek lehetnek a lágy szövet hiányosságának vagy sérülésének, vagy pedig egy mögöttes állapotoknak a kö-



vetkezményei. Kísérletileg előidézett periodontális sebek regenerálását már ismertettük, és ezek nem tartoznak a találmány tárgykörébe. A jelen összefüggésben "bőr" alatt az ember és állat testének legkülső felületét értjük, és beleértjük az érintetlen vagy majdnem érintetlen, valamint a sérült bőrfelületet. A "nyálkahártya" kifejezésen ember és állatok nemkárosított vagy károsított nyálkahártyáját értjük, amely lehet a szájüregbeli, fülbeli, orrbeli, tüdőbeli, szembeli, gyomor-bél rendszerbeli, hüvelybeli vagy végbélbeli nyálkahártya.

Leírásunkban "seb" alatt olyan testi sérüléseket értünk, amelyek a szövetszerkezetek normális integritásának megszakadásával járnak. A kifejezés magában foglalja a bőrsérüléseket, nyálkahártyasérüléseket, léziókat, nekrozisokat és fekélyeket. A "seb" kifejezést népszerűen normálisan a bőr és a nyálkahártya majdnem minden léziójára alkalmazzák, míg a "fekély" kifejezésen a szervek vagy szövetek felületének helyi hiányát vagy üregét értik, amely egy nekrotikus szövet leeseésével képződik. A lézió általában bármely szövethiányosságra vonatkozik. A nekrozis a fertőzésből, sérülésből, gyulladásból vagy infarktusból eredő szövetelhalást jelöli.

A "seb" kifejezést mindenfajta seb (lásd a sebek osztályozását a későbbiekben) jelölésére alkalmazzuk, a gyógyulási folyamat bármilyen fokozatában, beleértve azt a fokozatot, amikor bármilyen gyógyulás megindult volna, vagy pedig amikor valamilyen seb, például sebészi bemetszés történt volna (megelőző kezelés).

A találmány szerinti megoldás értelmében megelőzhető



és/vagy kezelhető sebek lehetnek például aszeptikus sebek, zúzódásos sebek, bemetszett sebek, szakított sebek, nem-invazív sebek (azaz olyan sebek, ahol a bőr nem szakadt meg, de az alatta fekvő szerkezetek sérültek), nyitott sebek, invazív sebek, perforált sebek, pontsebek, szeptikus sebek, szubkután sebek stb. A sérülések lehetnek például felfekvés, fekélyes sebek, ajaksömör, felfekvéses fekély stb. A fekélyek lehetnek például emésztőszervi fekély, nyombélfekély, gyomorfekély, köszvényes fekély, diabotikus fekély, magasvérnyomásos iszkémiás fekély, pangásos fekély, lábszárfekély (vénás fekély), nyelv alatti fekély, nyálkahártya alatti fekély, szimptomás fekély, trofikus fekély, trópusi fekély, nemiszervi fekély, például gonorrhoea által okozott fekély (beleértve a húgycsőgyulladást, méhnyakgyulladást és végbélgyulladást). A találmány szerinti megoldás értelmében sikeresen kezelhető sebekkel vagy sérülésekkel összefüggő állapotok például az égési sérülések, furunkulus, tetanusz, üszkösödés, pikkelyképződés, orbánc, szőrtüszőgyulladás, szakáll-szőrtüszőgyulladás, ótvar stb. Gyakran átfedés van a "seb" és "fekély", illetve a "seb" és "sérülés" kifejezések között, és ezeket a kifejezéseket gyakran véletlenszerűen használják. Ezért – amint azt már említettük – a jelen összefüggésben a "seb" kifejezés felöleli a fekélyeket, léziókat, sérüléseket és infarktuszokat, és ezeket megkülönböztetés nélkül használjuk, hacsak másképpen nem jelezzük.

A találmány szerinti megoldás értelmében kezelhető sebek fajtája tehát lehet i) általános sebek, például sebészeti, sérüléses, fertőzőes, iszkémiás, hő vagy kémiai hatásra



kialakult és erőszakos; ii) specifikusan a szájüregben előforduló sebek, például foghúzás utáni sebek, endodontális sebek, különösen a ciszták és tályogok kezelésével kapcsolatos sebek, baktériumos, vírusos vagy autoimmun eredetű fekélyek és léziók, mechanikai, kémiai, hő hatására képződött, fertőzéses vagy sömörszerű sebek; herpeszes fekélyek, aftás szájgyulladás, akut nekrotizáló fekélyes ínygyulladás és égő száj tünet; iii) a bőrön előforduló sebek, például kóros szövetképződés, égési seb (például kémiai vagy hő hatására képződött), léziók (baktériumos, vírusos vagy autoimmun), harapások és sebészeti bemetszések. A sebek más szempontból a következőképpen osztályozhatók: i) kis szövetveszteség sebészeti bemetszés következtében, kisebb horzsolás vagy kisebb harapás, ii) jelentős szövetveszteség. Ez utóbbi csoport magában foglalja az iszkémiás fekélyeket, felfekvéses fekélyeket, sipolyokat, szakított sebeket, súlyosabb harapásokat, égési sebeket és szervdonorok sebeit (a lágy vagy szilárd szövetekben), valamint az infarktuszokat.

Úgy találtuk, hogy az aktív zománcanyag gyógyító hatása olyan sebek esetén fontos, amelyek a szájüregben fordulnak elő. Az ilyen sebek lehetnek szájsebészeti, így periodontális sebészeti beavatkozással, foghúzással, endodontális kezeléssel, fogpótlással, protézis feltevéssel és használatával stb. kapcsolatos sérülések. A kísérleti részben bemutatjuk a találmány szerinti aktív zománcanyag ilyen sebekre kifejtett előnyös hatását. Ezenkívül megfigyeltük a lágy szöveteket gyógyító hatást is.

A szájüregben a találmány szerinti aktív zománcanyag



alkalmazása az aftás, sérüléssel vagy herpesz eredetű sebek gyógyulását is elősegíti. A sérüléssel és herpesz eredetű sebek természetesen a test más, a szájüregtől eltérő helyein is előfordulhatnak.

Másrészt a találmány szerinti megoldás értelmében megelőzhetők és/vagy kezelhetők az aszeptikus sebek, infarktusok, zúzódások, vágott sebek, csípett sebek, nem-penetráló sebek, nyitott sebek, penetráló sebek, perforáló sebek, pont-sebek, szepszis sebek és bőr alatti sérülések

További a találmánnyal kapcsolatosan fontossággal bíró sebek például az iszkémiás fekélyek, felfekvések, sipolyok, súlyos harapások, égési sebek és szervdonorok sebei.

Az iszkémiás sebek és a felfekvések olyan sebek, amelyek normális esetben nagyon lassan gyógyulnak, és a beteg számára különösen az ilyen esetekben nagyon fontos a gyorsabb gyógyulás elősegítése. Ezenkívül az ilyen sebekkel kezelt betegek esetén a kezelési költségek jelentősen csökkenthetők, ha a gyógyulás elősegíthető és meggyorsítható.

A szervdonor-sebek például akkor keletkeznek, amikor a test egyik részéről egy szilárd szövetet áthelyeznek a test egy másik részére, vagy például transzplantációval kapcsolatban. Az ilyen operációkból eredő sebek nagyon fájdalmasak, ezért a fokozott gyógyulás nagyon fontos.

A "bőr" kifejezésen nagyon tág értelemben véve a bőr epidermális rétegét és - olyan esetekben, amikor a bőr felülete többé-kevésbé sérült - a bőr dermális rétegét is értjük. A bőr szarurétegétől eltekintve a bőr epidermális rétege a külső (epitélium) rétege, és a bőr mélyebb kötőszövetrétegét



nevezik irharéteggnek.

Mivel a bőr a test hatásoknak legjobban kitett része, ezért különösen érzékeny különböző sérülésekkel, így szakadással, vágással, horzsolással, égéssel és fagyással vagy különböző betegségekből eredő sérülésekkel szemben. Ezenkívül a bőr sokszor sérül balesetekben. Mivel a bőr fontos fiziológiai gátként funkcionál, a bőr integritása fontos az egyén jóléte szempontjából, és bármilyen jelen levő szakadás olyan fenyegetést jelent, amelyet a test folyamatos létének védelme érdekében meg kell szüntetni.

A bőrön előforduló sérülések mellett sérülések jelentkezhetnek mindenfajta szövetben (pl. lágy és szilárd szövetekben). A lágy szövetekben - beleértve a nyálkahártyát is - előforduló sérülések különösen fontosak a találmány szempontjából.

A bőrön vagy a nyálkahártyán levő sebek gyógyulása különböző fokozatokon megy keresztül, és a bőr vagy a nyálkahártya begyógyulását vagy regenerálódást eredményezi. Az utóbbi években megkülönböztetik a begyógyulást és a regenerálódást mint az előforduló gyógyulás két típusát. A regenerálódás olyan biológiai folyamatként definiálható, amelynek következtében az elvesztett szövet architektúrája és funkciója teljesen megújul. Másrészt a begyógyulás olyan biológiai folyamat, amelynek következtében a roncsolódott szövet folytonossága olyan új szövettel állítódik helyre, amely nem teremti újra az elvesztett szövet struktúráját és funkcióját.

A sebek nagy része begyógyulással gyógyul, ami azt jelenti, hogy a képződött új szövet strukturálisan és kémiaailag



különbözik az eredeti (sebhely) szövetből. A gyógyulás korai szakaszának egyik folyamata - amely majdnem mindig végbe-
megy - az átmeneti kötőszövetképződés a szövetsérülés terü-
lén. A folyamat azzal indul, hogy a fibroblasztok új extra-
celluláris kollagénmátrixot képeznek. Az új extracelluláris
kollagénmátrix azután a kötőszövet számára támaszték gyanánt
szolgál a végső gyógyulási folyamatban. A végső gyógyulást a
legtöbb szövetben kötőszövetet tartalmazó heg képződése je-
lenti. Az olyan szövetekben, amelyek regenerálódóképességgel
rendelkezik, mint például a bőr és a csontok, a végső gyó-
gyulás az eredeti szövet regenerálódását foglalja magában. Ez
a regenerálódott szövet gyakran némileg hegszerű tulajdonsá-
gokkal rendelkezik, például vastagítja a gyógyult csonttö-
rést.

Normális körülmények között a szervezet rendelkezik
mechanizmusokkal a sérült bőr vagy nyálkahártya gyógyítására
annak érdekében, hogy helyreálljon a bőr mint gát és a nyál-
kahártya integritása. A begyógyító folyamat még kisebb töré-
sek vagy sebek esetén is bizonyos ideig tart, ami óráktól
vagy naptól hetekig tarthat. Fekélyek esetén azonban a gyó-
gyulás nagyon lassú lehet, és a seb hosszú ideig, például hó-
napokig vagy évekig megmaradhat.

A sebgyógyulás fokozatai normális esetben magában fog-
lalnak gyulladást (normálisan 1-3 nap), migrációt (normálisan
1-6 nap), proliferációt (normálisan 3-24 nap) és érést (nor-
málisan 1-12 hónap). A gyógyulás egy komplex és jól szerve-
zett fiziológiai folyamat, amely magában foglal migrációt,
proliferációt és a különböző típusú sejtek differenciá-



lódását, valamint mátrix-komponensek szintézisét. A gyógyulási folyamat az alábbi három fázisra osztható:

i) Hemosztázis és gyulladás

Ha a vérlemezék a keringési rendszeren kívül vannak jelen és trombinnak és kollagénnek vannak kitéve, akkor aktiválódnak és aggregálódnak. Így a vérlemezék az aggregálódással iniciálják a gyógyulási folyamatot és egy időleges záróréteget, biztosítva ezzel a hemosztázist (vérzéscsillapítást) és megakadályozva a baktériumok behatolását. Az aktiválódott vérlemezék iniciálják a koagulációs rendszert, és növekedési faktorokat, így pl. vérlemezke eredetű növekedési faktort (PDGF) és epidermális növekedési faktorokat (EGF) és transzformáló növekedési faktorokat (TGF) bocsátanak ki.

A seb területére vándorló sejtek közül elsők a neutrofilek, majd ezeket a monociták követik, amelyeket a makrofágok aktiválnak.

Úgy tűnik, hogy a neutrofilek fő szerepe abban van, hogy megtisztítsák vagy megvédjék a sebet a szennyező baktériumoktól, és fokozzák a gyógyulást azzal, hogy eltávolítják az elhalt sejteket és vérlemezkéket. A neutrofilek besűrűsége körülbelül az első 48 órán belül leáll, ha a sebben nincs baktériumos szennyeződés. A főleg neutrofileket a vérben képződő monociták keringésben levő populációjából verbuválódó szöveti makrofágok fagocitózissal eltávolítják. Úgy tűnik, hogy a makrofágok alapvetően fontosak a hatékony sebgyógyuláshoz, mivel a patogén organizmusok fagocitóziséért és a szövettörmelék eltávolításáért szintén felelősek. Ezenkívül számos olyan faktort bocsátanak ki, amelyek a gyógyulási fo-



lyamat későbbi eseményeiben vesznek részt. A makrofágok vonzzák a fibroblasztokat, amelyek elindítják a kollagén termelését.

ii) Granulációs szövet képződése és újra-epitelizálódás

A sebesülés utáni 48 órában a fibroblasztok elkezdnek szaporodni, és a seb szélén levő kötőszövetből a seb területére vándorolnak. A fibroblasztok kollagént és glükózaminoglükánokat termelnek, és a sebnél levő alacsony oxigéntenzio stimulálja az endotélium sejtek szaporodását. Az endotélium sejtek elősegítik az új kapilláris háló kialakulását.

A kollagenázokat és plazminogén aktivátorokat a keratinociták választják ki. Ha a seb nincs zavarva és jól el van látva oxigénnel és tápanyagokkal, a keratinociták átvándorolnak a seben. Feltételezhető, hogy a keratinociták csak élő szöveten vándorolnak keresztül, így a keratinociták az elhalt szövet alatti és a seb kérge alatti területre vándorolnak.

A seb területe zsugorodással tovább csökken.

iii) Dermális újramodellálódás

Amint az újraepitelizálódás befejeződött, megindul a szövet újramodellálódása. Ez a fázis, amely néhány évig is eltarthat, helyreállítja a sebesült szövet erősségét.

Az említett gyógyulási folyamatok jelentős időt vesznek igénybe. A gyógyulás sebességét befolyásolja a seb fertőzősmentessége, az egyén általános egészségi állapota, idegentest jelenléte stb. Patológias állapotok, mint például fertőzés, eláztatás, kiszáradás, általános gyenge egészségi állapot és alultápláltság krónikus fekélyhez, például iszkémiás fekélyekhez vezethet.



Amíg legalább felületi gyógyulás be nem következik, a seb ki van téve a folyamatos vagy megújuló fertőzés kockázatának. Ezért minél gyorsabban tud gyógyulni a seb, annál hamarabb elhárul a kockázat.

Így bármilyen eljárás, amellyel előnyösen lehet befollyásolni a sebgyógyulást, nagy jelentőségű.

Ezenkívül mivel majdnem minden szövetjavító folyamat magában foglalja a korai kötőszövetképződést, feltételezhető, hogy ennek és az utána következő folyamatoknak a stimulálása fokozza a sebgyógyulást.

Leírásunkban a "klinikai gyógyulás" kifejezést olyan helyzetek esetén alkalmazzuk, amikor vizuálisan nem észlelhető szövetszakadás, csupán a gyulladás enyhe jelei figyelhetők meg, így például enyhe pír vagy kissé duzzadt szövet. Emellett ha szerv nyugalomban van vagy nem érintik, fájdalom sem jelentkezik.

Amint említettük, a találmány zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek alkalmazására vonatkozik, sebgyógyítószerként, azaz olyan szerként, amely felgyorsítja, stimulálja vagy elősegíti a bőr és a nyálkahártya sebeinek gyógyulását. Ennek megfelelően fontos felhasználási terület a szövetregeneráló- és/vagy gyógyító szerként történő alkalmazás. Emellett sebgyógyító hatásuk következtében a zománc mátrixnak, zománc mátrix származékoknak és/vagy zománc mátrix proteineknek fájdalomcsillapító hatásuk is van.

Hagyományosan sebkezelésre szokásosan száraz vagy nedvesből szárazzá váló kötőszert alkalmaznak. Nedves környe-



zetben ezt fokozatosan felváltja a záró kötőzőszerek használata. Ahhoz, hogy egy sérült testrészt sikeresen gyógyítsunk vagy helyettesítsünk, a sebgyógyulási folyamatnak, fibrózisnak és a mikrobák bejutásának egymással egyensúlyban kell lenniük. Számos, fertőzések kivédésére alkalmas, rendelkezésre álló eszköz alkalmas sebgyógyításra. Késleltetett sebgyógyulás vagy gyulladás súlyosbítja a fibrózist. Ezenkívül korábban úgy vélték, hogy a növekedési faktorok - mint például az epidermális növekedési faktor (EGF), transzformációs növekedési faktor- α (TGF- α), vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF), fibroblaszt növekedési faktorok (FGF), beleértve a savas fibroblaszt növekedési faktort (α -FGF) és a bázikus fibroblaszt növekedési faktort (β -FGF), a transzformációs növekedés faktor- β (TGF- β) és az inzulinszerű növekedési faktorok (IGF-1 és IGF-2) - a sebgyógyulási folyamatok irányítói, és gyakran említik ezeket a sebgyógyulás elősegítőiként; ezek azonban valójában a fibrózist segítik elő, ami rontja a sikeres gyógyulást. Annak ellenére, hogy a gyorsított gyógyulás kínálja a fertőzés kockázatának és az abból eredő, hegképződéshez vezető gyulladás csökkentésének a legígéretesebb lehetőségét, a normális sebgyógyulás felgyorsítása érdekében terápiás területen tett lépések viszonylag csekély sikerrel jártak. Ennek feltételezhetőleg az az oka, hogy a gyógyulási folyamat számos tényező összehangolt együttthatását foglalja magában, amint ezt az előbbiekben kifejtettük.

Kísérleteink során megfigyeltük, hogy a különböző fibroblaszt (embrionális, dermális, periodontális ligamentum eredetű, hal, madár) sejttenyészetekben EMDOGAIN készít-



ménnyel történő stimulálás esetén kétszerannyi TGF β 1 képződik, mint nem-stimulált sejttenyészetekben. A vizsgálat például ELISA módszerrel végezhető (lásd 1. példát az alábbiakban). A szintnövekedés 24 óra hosszat végzett tenyésztés után figyelhető meg, de még jellegzetesebb a rákövetkező napokban (2. és 3. napon). A második nap után a sejtszaporodás is fokozódott az EMDOGAIN készítménnyel stimulált sejttenyészetekben. A TGF β 1-termelés hasonló, de kevésbé jellegzetes fokozódása figyelhető meg humán epitélium-sejtek esetén. Mivel úgy tűnik, hogy a TGF β 1 központi fontosságú a sebek felületének epitelizálódásában, ez a felismerés alátámasztja találmányunkat.

A szájüregben a fedőanyagok alkalmazása általánosan szokásos. Az ilyen fedőanyagok lehetnek hagyományosak, pl. Surgipad vérzéscsillapításra és Coe-Pack periodontális fedőanyag (Coe Laboratories, GC Group, Chicago, USA) nyílt sebekre. A foghúzás után maradt üregbe antibiotikum oldattal átitatott gézt helyeznek, amelyet néhány nap múlva, amikor a gyógyulás megindult, el kell távolítani. Antiszeptikumokkal, például klorhexidinnel történő szájöblítést rendszerint végeztetnek szájsebészeti műtét után. Néha általános vagy helyi antibiotikumot szintén felírnak.

Általában sajátos elővigyázatossági feltételeket kell figyelembe venni sebek kezelésével kapcsolatban, így például sterilitási megfontolásokat, szennyezési problémákat, a kötések/fedőanyagok pontos felhelyezését stb., ami rendszerint megkívánja, hogy a kezelést/alkalmazást jól képzett kezelőszemélyzet végezze. Ennek megfelelően a sebkezelés gyakran



nagyon költséges műveletté válik, ha a sebgyógyítószert naponta többször kell alkalmazni. A sebgyógyítással kapcsolatos költségek csökkenthetők, ha az alkalmazás gyakorisága ritkítható, vagy ha a gyógyulási folyamat gyorsítható, és így csökken a seb gyógyulásához szükséges idő.

Kísérleteink során úgy találtuk, hogy a zománc mátrix, a zománc mátrix származékok és/vagy a zománc mátrix proteinek sebgyógyító tulajdonságokkal rendelkeznek. Ezenkívül a zománc mátrixnak, zománc mátrix származékoknak és/vagy zománc mátrix proteineknek vannak olyan indikációi, amelyek fokozott sebgyógyuláshoz vezetnek. Különösen azt figyeltük meg, hogy a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek alkalmazása után a gyulladásos fázis lerövidül, és a tipikus jelek, például melegség, pír, ödéma és fájdalom kevésbé jelentősek, és az új szövetek gyorsabban képződnek. A sebgyógyulás megfigyelt ideje (a sebészeti beavatkozás után) jelentősen lerövidül olyan esetekhez képest, amikor zománc mátrixot, zománc mátrix származékokat és/vagy zománc mátrix proteineket nem alkalmazunk.

A zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek terápiás és/vagy profilaktikus aktivitása természetesen igazolható *in vivo* tesztekkel kísérleti állatokon vagy emberen (lásd leírásunk kísérleti részét). A zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek hatékonyságát és/vagy aktivitását azonban viszonylag egyszerű *in vitro* tesztekkel, például sejttenyésztéken végzett tesztekkel is igazolhatjuk.

Ezenkívül számos olyan paraméter van, amelyeket figye-



lembe lehet venni a sebgyógyulási hatás kiértékelésekor. Ezek például:

- komputer segítségével végzett planimetrikus mérések (a nyílt seb gyógyulási sebességének kiértékelésére);
- lézer doppler leképzés (a seb perfúziójának kiértékelésére);
- tenziometria (a seb erősségének kiértékelésére);
- hisztopatológia/citológia (a sebszövetek és -folyadékok mikroszkópikus kiértékelésére);
- biokémia (HPLA/RIA) (különböző hatóanyagok és komponensek szövetgyógyulásra gyakorolt hatásának kiértékelésére);
- elektrodiagnosztikumok (a sebgyógyulás és a találmány szerinti megoldás közötti összefüggés kiértékelésére);
- szcintigráfia (a sebszövet radiojelzéses leképezése).

A sebek/fekélyek kezelésével kapcsolatosan a seb tisztítása és tisztántartása különösen fontos. Feltételezhető, hogy a sebek/fekélyek tisztítása és tisztántartása a gyógyulási folyamat előfeltétele, ezenkívül ha sebgyógyítószereket alkalmazunk, ezeknek a szerekek hatásukat friss és élő szövetekre kell kifejteniük, és nem elhalt vagy szennyezett szövetekre. A seb elhalt szövetektől való megtisztítása legalább négy különböző módszerrel történhet: i) éles sebtisztítással, ii) mechanikus sebtisztítással, iii) enzimes sebtisztítással, és iv) autolitikus sebtisztítással.

A találmány tárgykörébe tartozik tehát sebtisztítási módszerek és zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek kombinációjának alkalmazása sebek gyógyítására vagy megelőzésére. Az ilyen kombinációs terápia



a következő két lépést foglalja magában: i) sebtisztítási módszer és ii) egy zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek alkalmazása, és ezt a két lépést bármilyen sorrendben annyiszor hajtjuk végre, ahányszor szükséges.

Ha a sebtisztítást végrehajtottuk, a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek alkalmazhatók közvetlenül a sebre vagy sebbe, vagy pedig bármilyen alkalmas gyógyszerkészítmény formájába, például száraz vagy nedves tiszta fedőanyag formájában, amelybe a zománc mátrixot, zománc mátrix származékokat és/vagy zománc mátrix proteineket belevittük. A zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek természetesen a sebtisztítással kapcsolatban is alkalmazhatók.

Amint a későbbiekben megvilágítjuk, zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek alkalmazhatók önmagukban vagy kompozíció vagy gyógyszerkészítmény formájában.

Fertőzésescsökkentő hatás

A találmány értelmében a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek antimikrobiális hatású terápiás és profilaktikus szerként alkalmazhatók. A zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek fertőzésescsökkentő hatással rendelkeznek.

Leírásunkban a fertőzésescsökkentő hatás kifejezésen a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek az egyén testszöveteiben bekövetkezett vagy bekövetkező fertőzésre kifejtett terápiás és profilaktikus

hatást értjük, ha az egyén testszöveteit zománc mátrixszal, zománc mátrix származékokkal és/vagy zománc mátrix proteinekkel kezeljük.

A fertőzés kifejezésen mikroorganizmusoknak az egyén testszövetébe történő bejutását és ott végbemenő szaporodását értjük, ami lehet klinikailag láthatatlan, vagy pedig kompetitív metabolizmus, enzimek, toxinok, intracelluláris replikáció vagy antigén-antitest válasz következtében kialakuló helyi sejtsérülés következménye.

A találmány értelmében megelőzendő és/vagy kezelendő fertőzést mikroorganizmusok okozhatnak. Az ilyen mikroorganizmusok lehetnek baktériumok, vírusok, élesztők, penészek, protozoák vagy rickettsiák.

Az antibakteriális hatás kifejezésen a baktériumok szaporodásának szuppresszióját vagy a baktériumok elroncsolását értjük. A kifejezés nem korlátozódik bizonyos baktériumokra, hanem általában bármilyen baktériumról szó lehet. A találmány szerinti megoldás azonban elsősorban vonatkozik i) patogén baktériumokra, amelyek emlősökben, így emberben is betegséget okoznak és/vagy ii) olyan baktériumokra, amelyek jelen vannak az emlős szervezetében, és bizonyos körülmények között nemkívánatos következményeket okozhatnak a szervezetben.

Ennek megfelelően a találmány az aktív zománcanyag alkalmazására vonatkozik, baktériumnövekedés megelőzésére vagy kezelésére a test felületén, így bőrön, nyálkahártyán vagy köröm vagy fog felületén.

A leküzdendő bakteriális állapotok általános és egyedi ismeretése

A zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek alkalmazhatók baktériumok által okozott fertőzések kezelésére antimikrobiális szer jelenlétében vagy anélkül. Az aktív zománcanyaggal kezelendő Gram-negatív baktériumok lehetnek coccusok, például *Neisseria* fajok (pl. *N. meningitidis*, *N. gonorrhoeae*) és *Acinetobacter* fajok, pálcák, például *Bacteroides* fajok (pl. *B. fragilis*), *Bordetella* fajok (pl. *B. pertussis*, *B. parapertussis*), *Brucella* fajok (pl. *B. melitenis*, *B. abortus* Bang, *B. suis*), *Campylobacter* fajok (pl. *C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*), *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia* fajok (pl. *E. coli*), *Haemophilus* fajok (pl. *H. influenzae*, *H. parainfluenzae*), *Klebsiella* fajok (pl. *K. pneumoniae*), *Legionella* fajok (pl. *L. pneumophila*), *Pasteurella* fajok (pl. *P. yersinia*, *P. multocida*), *Proteus* fajok (pl. *P. mirabilis*, *P. vulgaris*), *Pseudomonas* fajok (pl. *P. aeruginosa*, *P. pseudomallei*, *P. mallei*), *Salmonella* fajok (pl. *S. enteritidis*, *S. infantilis*, *S. dublin*, *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. schottmülleri*, *S. choleraesuis*, *S. typhimurium* vagy a további mintegy 2500 serotípus bármelyike), *Serratia* fajok (pl. *S. marscescens*, *S. liquifaciens*), *Shigella* fajok (pl. *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. dysenteriae*, *S. boydii*), *Vibrio* fajok (pl. *V. cholerae*, *V. el tor*), *Yersinia* fajok (pl. *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*). Az aktív zománcanyaggal kezelendő Gram-pozitív baktériumok lehetnek coccusok, például *Streptococcus* fajok (pl. *S. pneumoniae*, *S. viridans*, *S. faecalis*, *S. pyogenes*),



Staphylococcus fajok (pl. *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. saprophyticus*, *S. albus*), valamint pálcák, például *Actinomyces* fajok (pl. *A. israeli*), *Bacillus* fajok (pl. *B. cereus*, *B. subtilis*, *B. anthracis*), *Clostridium* fajok (pl. *C. botulinum*, *C. tetani*, *C. perfringens*, *C. difficile*), *Corynebacterium* fajok (pl. *C. diphtheriae*), *Listeria* fajok és *Providencia* fajok. Fertőzést okozó további baktériumok például a *Propionobacterium acne* és a *Pityosporon ovale*.

A zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek alkalmazhatók spirochéták, így például *Borrelia*, *Leptospira*, *Treponema* vagy *Pseudomonas* fajok által okozott fertőzések kezelésére is.

A zománc mátrixszal, zománc mátrix származékokkal és/vagy zománc mátrix proteinekkal együtt kombinációban alkalmazható antimikrobiális szer lehet például egy olyan szer, amely antimikrobiális hatását a sejtfal szintézisének gátlásával fejti ki, ilyenek például a β -laktám- és vankomicin-származékok, előnyösek a penicillinszármazékok, például amdinocillin, amoxicillin, azlocillin, bacampicillin, benzathine pinicillin G, carbenicillin, cloxacillin, cyclacillin, dicloxacillin, methicillin, mezlocillin, nafcillin, oxacillin, penicillin G, penicillin V, piperacillin és ticarcillin; a cefalosporin-származékok, például az első generációs hatóanyagok, mint pl. a cefadroxil, cefazolin, cephalixin, cephalothin, cephapirin és cephadrin, a második generációs hatóanyagok, mint pl. a cefaclor, cefamandol, cefonicid, ceforandin, cefoxitin és cefuroxim, a harmadik generációs hatóanyagok, mint pl. a cefalosporinok, cefopera-



zon, cefotaxim, cefotetan, ceftazidim, ceftizoxim, ceftriaxon és moxalactam; a karbapenem-származékok, például az imipenem, és a monobactam-származékok, például az aztreonam.

Alkalmazhatók továbbá olyan antimikrobiális szerek, amelyek hatásukat a proteinszintézis gátlásával fejt ki, ilyenek például a chloramfenicol, tetracyclinek, előnyösen a demechlocyclin, doxycyclin, methacyclin, minocyclin és oxytetracyclin; az aminoglikozidok, pl. amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, netilmicin, paromomycin, spectinomycin, streptomycin és tobramycin; a polimyxin-származékok, pl. colistin, colistimathat és polymyxin B, valamint az erythromycin-származékok és a lincomycin-származékok.

Ezenkívül alkalmazhatók olyan antimikrobiális szerek, amelyek hatásukat a nukleinsavak szintézisének gátlásával fejtik ki, ilyenek különösen a szulfonamidok, például a szulfacitin, szulfadiazin, szulfizoxazol, szulfametoxazol, szulfametizol és szulfapiridin; a trimetoprim, kinolon-származékok, novobiocin, pirimetamin és rifampin.

A találmány szerinti megoldás egy előnyös megvalósítási módja szerint a szájüregben megjelenő fertőzést küzdjük le, amely bakteriális eredetű.

A szájüregben előforduló baktériumok, amelyeket kontakt gátlással vagy más módon kell leküzdeni, például:

- fogszuvasodást okozó baktériumok, pl. *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* fajok;
- periodontális betegségeket okozó baktériumok, pl. *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Peptostreptococcus*



micros, *Campylobacter* (*Fusobacterium* és *Staphylococcus* fajok), *B. forsythus*;

- fogmedergyulladást stb. okozó baktériumok, pl. *Staphylococcus*, *Actinomyces* és *Bacillus* fajok;
- foggyökér-csúcs körüli léziókat okozó baktériumok, pl. *Spirocheta* fajok.

Gyulladásellenes hatás

A találmány értelmében a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek gyulladásellenes hatású terápiás és profilaktikus szerekként is alkalmazhatók.

Gyulladás manifesztálódásának szuppresszáálására számos hatóanyag alkalmazható, így például az adrenokortikoszteroidok, az úgynevezett nem-szteroid gyulladásellenes hatóanyagokat (NSAID) magában foglaló nagy hatóanyagcsoport, továbbá például az immunszuppresszív szerek. Az adrenokortikoszteroidok, különösen a glukokortikoidok gyógyszerészeti dózisban alkalmazva potenciálisan gyulladásellenes hatással rendelkeznek. Ezek specifikusan gátolják a gyulladásos folyamatok korai vaszkuláris fázisát az erek áteresztőképességének csökkentésével és így a granulociták vándorlásának gátlásával. A glukokortikoidok a késői gyulladásos és reparatív folyamatokba is beavatkoznak, amennyiben gátolják a mezenchima sejtek szaporodását és az extracelluláris makromolekulák, így a proteoglikánok és a kollagén termelődését. Kísérletek igazolták, hogy a glukokortikoidok gátolják például a makrofág funkciót, a humorális antitestek termelődését, a celluláris immunitást és valószínűleg a lizozim enzimek kibocsátását.

A szövetkárosodás súlyossága függ a szervezet anti-



gén/antitest reakciójától, valamint az érintett területen a gyulladásos termékek visszatartódásának a mértékétől. A lokális gyulladás mediátorainak felgyülemzése gyorsítja a folyamatot. A legtöbb esetben a folyamat lassú, a szövet immunbeszűrődésével és granulációs szövet képződésével, amely tartalmazza a gyulladásos sejteket.

Leírásunkban a gyulladásellenes hatás kifejezésén a gyulladással szembeni vagy gyulladást szuppresszáló aktivitást értjük.

A kezelendő gyulladásos állapotok általános és egyedi ismertetése

A találmány értelmében kezelendő gyulladásos állapotok a test bármelyik részén vagy részében előforduló gyulladásos állapotok vagy lágy vagy szilárd szövetekben előforduló bármilyen gyulladásos állapotok lehetnek. A találmány szerinti megoldás egyik megvalósítási módja értelmében egy a szájüregben előforduló gyulladásos állapot kezelhető. Ilyen, a szájüregben előforduló gyulladásos állapotok például a fogmeder-gyulladás, ajakgyulladás, csontnekrózis (sebesülés után), törések.

A találmány szerinti megoldás egy másik megvalósítási módja értelmében egy a csontdonor helyén jelenlevő gyulladást kezelünk. A találmány szerinti megoldás egy további megvalósítási módja értelmében egy az ízületi üregben jelenlevő gyulladást kezelünk. Ilyen gyulladásos állapotok lehetnek például a reumás ízületi gyulladás és ezzel kapcsolatos állapotok.



Antibakteriális versus gyulladásellenes hatás

Sok jelenleg használatos antibiotikummal szemben a zománc mátrix proteinek nem veszélyeztetik a sebgyógyulást, és a gyors sebgyógyulás azután nem ad lehetőséget krónikus vagy hosszantartó gyulladásos folyamatok kifejlődésére. A megfelelő szövetek - mint például a periodontális hiányok esetén alkalmazott zománc mátrix esetén képződött szövetek - újrarendeződése szintén könnyebbé válik a gyors, baktériumos vagy gyulladásos reakciók fellépése nélkül végbemenő sebgyógyulás következtében.

A zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek alkalmazása sebészeti vágások esetén is gyors sebgyógyulást biztosít, feltehetőleg azért, hogy olyan felület alakul ki, amely a baktériumokkal érintkezve gátolja azok növekedését, és ugyanakkor elősegíti a fibroblasztok vándorlását és a kollagén szintetizálódását. Ha a gyulladásos fázis lerövidül, a tipikus jelek, mint például a melegség, pír, ödéma és fájdalom, kevésbé észlelhetők.

Zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek

A zománc mátrix a zománc prekursora, és bármilyen megfelelő természetes forrásból, azaz emlősök növésben levő fogából nyerhető. Alkalmas forrás például a vágóállatok, így borjú, malac vagy bárány növésben levő foga. Alkalmas forrás még például a halak bőre.

A zománc mátrix például az EP-B-0337967 és az EP-B-0263086 számú dokumentumban ismertetett módon állítható elő. A zománc mátrixot lekaparjuk, és zománc mátrix származékokat



állítunk elő például vizes oldatokkal, így pl. pufferrel, híg vizes savval vagy bázissal vagy víz/oldószer eleggyel végzett extrakcióval, majd méretkizárásos elválasztást, sótelenítést vagy más tisztítási lépést végzünk, és végül adott esetben fagyasztva szárítjuk. Az enzimeket hőkezeléssel vagy oldószeres kezeléssel dezaktiváljuk, ilyen esetben a származék folyadék formájában tárolható, fagyasztva szárítás nélkül.

Leírásunkban zománc mátrix származékokon a zománc mátrix olyan származékait értjük, amelyek egy vagy több zománc mátrix proteint vagy ilyen proteinek részeit foglalják magukban, amelyek alternatív illesztéssel vagy feldolgozással természetes folyamatokban képződnek, vagy pedig természetes hosszúságú proteinek enzimes vagy kémiai hasításával, vagy pedig polipeptidek *in vitro* vagy *in vivo* szintézisével (rekombináns DNS-módszerrel vagy diploid sejtek tenyésztésével). Zománc mátrix protein származékok közé tartoznak a zománc mátrixszal rokon polipeptidek és proteinek is. A polipeptidek vagy proteinek alkalmas biodegradálódó hordozómolekulához, így például poliaminosavakhoz vagy poliszacharidokhoz vagy ezek kombinációjához lehetnek kötve. Ezenkívül a zománc mátrix származékok közé tartoznak a szintetikus analóg anyagok is.

A proteinek olyan biológiai makromolekulák, amelyeket peptidkötésekkel egymáshoz kapcsolt aminosav-maradékok alkotnak. A proteineket – mint aminosavak lineáris polimerjeit – polipeptideknek is nevezik. A proteinek tipikusan 50-800 aminosav-maradékot tartalmaznak, és így molekulatömegük körülbelül 6000 és néhány százezer Dalton vagy ennél nagyobb érték



közötti. Az ennél kisebb proteineket peptideknek vagy oligopeptideknek nevezik.

A zománc mátrix proteinek olyan proteinek, amelyek normálisan jelen vannak a zománc mátrixban, azaz a zománc prekurzorában [Ten Cate: *Oral Histology*, 1994; Robinson: *Eur. J. Oral Science*, **106**(1):282-291 (1998)], vagy pedig olyan proteinek, amelyek ilyen proteinek hasításával kaphatók. Az ilyen proteinek molekulatömege általában 120 000 Dalton alatti. Ilyenek például az amelogeninek, nem-amelogeninek, prolinban gazdag nem-amelogeninek, amelinek (ameloblasztin, seatlin) és a tuftelinek.

A találmány szerinti megoldásban alkalmazható proteinek például az amelogeninek, prolinban gazdag nem-amelogeninek, tuftelin, gomoly-proteinek, szérum-proteinek, nyál-proteinek, amelin, ameloblasztin, seatlin és ezek származékai és elegyei. A találmány szerinti aktív zománcanyagot tartalmazó készítmény szintén tartalmazhat legalább két fent említett protein anyagot. Amelogenineket és adott esetben más zománc mátrix proteineket tartalmazó, kereskedelemben kapható készítmény az EMDOGAIN^(R) (Biora AB).

A zománc mátrixok nagyobb proteinjei általában amelogeninekként ismertek. Ezek a mátrix proteineknek mintegy 90 töm.%-át teszik ki. A fennmaradó 10 töm.% prolinban gazdag nem-amelogeninből, tuftelinből, gomoly-proteinekből, szérum-proteinekből és legalább egy nyál-proteinből adódik; azonban más proteinek, pl. amelin, (ameloblasztin, seatlin), amelyeket a zománc mátrix esetén megneveztünk, szintén jelen lehetnek. A különböző proteinek többféle különböző méretben (azaz



különböző molekulatömeggel) szintetizálhatók és/vagy dolgozhatók fel. Ennek megfelelően megfigyeltük, hogy a zománc mátrixban domináló proteinek, az amelogeninek különböző méretekben léteznek, amelyek együttesen szupramolekuláris aggregátumokat képeznek. Ezek jellegzetesen olyan hidrofób anyagok, amelyek fiziológiás körülmények között aggregátumokat képeznek. Ezek más proteinek vagy peptidek hordozóiként szolgálhatnak.

A találmány értelmében más protein anyagok is alkalmazhatók. Ilyenek például a prolinban gazdag proteinek és a poliprolin. A találmány szerinti megoldásban alkalmazható anyagok továbbá például az ilyen proteineknek, a zománc mátrix származékoknak és/vagy zománc mátrix proteineknek, valamint a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek metabolitjainak az aggregátumai. A metabolitok bármilyen méretűek lehetnek, ami a proteinek méretétől a rövid peptidek méretéig terjedhet.

Amint említettük, a találmány értelmében alkalmazható proteinek, polipeptidek és peptidek molekulatömege tipikusan legfeljebb körülbelül 120 kDa, például legfeljebb 100 kDa, 80 kDa, 70 kDa vagy 60 kDa, SDS-PAGE módszerrel meghatározva.

A találmány értelmében alkalmazott proteinek normális esetben használhatók olyan készítmény formájában, amelyben az aktív zománcanyag proteintartalma körülbelül 0,05 töm.% és 100 töm.% közötti, például körülbelül 5-99 töm.%, körülbelül 10-95 töm.%, körülbelül 15-90 töm.%, körülbelül 20-90 töm.%, körülbelül 30-90 töm.%, körülbelül 40-85 töm.%, körülbelül 50-80 töm.%, körülbelül 60-70 töm.%, körülbelül 70-90 töm.%



vagy körülbelül 80-90 töm.%.

A találmány szerinti aktív zománcanyag készítmények különböző molekulatömegű aktív zománcanyagok keverékét tartalmazhatják.

A zománc mátrixban levő proteinek egy nagy molekulatömegű részre és egy kis molekulatömegű részre oszthatók, és úgy találtuk, hogy a zománc mátrix egy jól meghatározott frakciója előnyös tulajdonságokat mutat a periodontális hiányok (azaz periodontális sebek) kezelése szempontjából. Ez a frakció ecetsavval extrahálható proteineket tartalmaz, amelyeket általában amelogenineknek neveznek, és ez a frakció alkotja a zománc mátrix kis molekulatömegű részét (v.ö. EP-B-0377967 és EP-B-0263086).

Amint említettük, a zománc mátrix ezen része azzal az előnyös aktivitással rendelkezik, hogy kötődést indukál a szilárd szövetek között a periodontális hiányok területén. Találmányunk szempontjából azonban az aktív proteinek nem korlátozódnak a zománc mátrix kis molekulatömegű részére. Jelenleg úgy tartják, hogy az - *in vitro* SDS-PAGE módszerrel mért - körülbelül 60 000 dalton alatti molekulatömegű zománc mátrix proteinek, például az amelogenin, amelin, tuftelin stb. az előnyösek, azonban a 60 000 daltonnál nagyobb molekulatömegű proteinek szintén reményt keltő tulajdonságokat mutatnak lehetséges sebgyógyító, antibakteriális és/vagy gyulladásellenes szerekként.

Ennek megfelelően a találmány szerinti megoldás értelmében alkalmazható aktív zománcanyag molekulatömege körülbelül 40 000 daltonig terjed, például 5 000 dalton és 25 000



dalton közötti.

A találmány tárgykörébe tartoznak a WO 97/02730 számú iratban ismertetett peptidek, azaz az olyan peptidek, amelyek a következő tetrapeptidek közül legalább egynek megfelelő szekvenciaelemet tartalmaznak: DGEA (Asp-Gly-Glu-Ala), VTKG (Val-Thr-Lys-Gly), EKGE (Glu-Lys-Gly-Glu) és DKGE (Asp-Lys-Gly-Glu), és amelyek tartalmaznak továbbá egy olyan aminosav-szekvenciát, amelynek egy 20 egymás utáni aminosavból álló szála legalább 80%-ban megegyezik egy ugyanilyen hosszúságú, a következő aminosav-szekvenciákkal megadott aminosav szállal: az 1. szekvencia szerinti aminosav-szekvencia, az 1. szekvencia 1-103. aminosavát tartalmazó szekvencia vagy az 1. szekvencia 6-324. aminosavát tartalmazó szekvencia.

A "szekvencia-azonosság" kifejezésen azt értjük, hogy a peptidek aminosav-szekvenciája az aminosavak helyzete és az egyes aminosavak azonossága szempontjából megegyeznek. Egy hiányt úgy veszünk számításba, mint egy vagy több aminosav-eltérést.

A zománc mátrix proteinek elválasztását úgy végezzük, hogy a proteineket extraháljuk, és a szolubilizált hidroxilapatitból alkalmas módszerrel, például szűréssel, dialízissel vagy ultraszűréssel eltávolítjuk a kalcium- és foszfátionokat [lásd például: Janson J-C. és Rydén L. (szerk.): *Protein purification*, VCH Publishers 1989; Harris E.L.V., Angal S.: *Protein purification methods - A practical approach*, IRL Press, Oxford, 1990].

A tipikus liofilizált protein készítmény főleg vagy kizárólag, 70-90 töm.%-ig terjedő mennyiségű, 40 000-5 000

dalton molekulatömegű (MW) amelogenint és 10-30 töm.% kisebb peptideket, sókat és maradék vizet tartalmazhat. A fő proteincsúcsok 20 kDa, 12-14 kDa és körülbelül 5 kDa értéknél jelennek meg.

A proteinek elválasztásával, például kicsapásával, ioncserés kromatográfiás, preparatív elektroforézises, géelpermeációs elektroforézises, fordított fázisú kromatográfiás vagy affinitás kromatográfiás elválasztásával a különböző molekulatömegű amelogeninek tisztíthatók.

A különböző molekulatömegű amelogeninek különbözőképpen kombinálhatók, a főleg 20 kDa molekulatömegű összetételtől a sok különböző, 40 és 5 kDa közötti molekulatömegű amelogenint tartalmazó aggregátumig és a főleg 5 kDa molekulatömeg összetételig. Más zománc mátrix proteinek, például amelin, tuf-telin vagy a normálisan a zománc mátrixban található proteolitikus enzimek adagolhatók vagy ezeket az amelogenin aggregátum tartalmazhatja.

Zománc mátrix származékok vagy proteinek további forrásként alkalmazhatók az általában megfelelő, szakemberek által jól ismert szintetikus módszerek vagy a rekombináns úton módosított tenyésztett sejtek vagy baktériumok [lásd például: Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989].

A zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek fizikai-kémiai tulajdonságai

A zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek általában hidrofób anyagok, azaz kevésbé oldódnak vízben, különösen magasabb hőmérsékleten. Ezek a

proteinek általában nem-fiziológiás pH-értékeknél és alacsony hőmérsékleten, például 14-20 °C-on oldódnak, míg testhőmérsékleten (35-37 °C) és semleges pH-nál aggregálódnak és kicsapódnak.

A találmány szerinti zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek körébe tartoznak az aktív zománcanyagok, amelynek legalább egy része aggregátum formájában van, vagy pedig *in vivo* alkalmazva képes aggregátumot képezni. Az aggregátumok részecskemérete kb. 20 nm és kb. 1 μ m közötti.

Feltételezhető, hogy a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek oldhatósági tulajdonságai fontosak az anyagok profilaktikus és terápiás aktivitása szempontjából. Ha egy a zománc mátrixot, zománc mátrix származékokat és/vagy zománc mátrix proteineket (a továbbiakban közös névként: aktív zománcanyag) tartalmazó készítményt adagolunk például embernek, a protein természetű anyagok a fiziológiás körülmények között normálisan uralkodó pH következtében kicsapódnak. Így egy a zománc mátrixból, zománc mátrix származékokból és/vagy zománc mátrix proteinekből álló réteg képződik az adagolás helyén, és ezt a réteget (amely olyan esetekben, ahol aggregátumok képződnek, molekuláris vastagságú réteg lehet) fiziológiás körülmények között nehéz leöblíteni. Ezenkívül az anyagok biológiai tapadó tulajdonságai következtében (magyarázatot lásd alább) a kicsapódott réteg szorosan kötődik a szövethez a kicsapódott réteg és a szövet közötti határfelületnél is. Így a fehérje természetű réteg befedi a szövetet, amelyre a zománc mátrixot, zománc



mátrix származékokat és/vagy zománc mátrix proteineket vagy az ezeket tartalmazó készítményt felvittük, és az aktív zománcanyagok hosszú időn keresztül azon a helyen maradnak, azaz az aktív zománcanyagokat nem szükséges sűrűn adagolni. Ezenkívül a helyben képződött réteg majdnem összevethető egy okkluzív bevonattal, azaz a kialakult réteg védi a környezettől a szövetet, amelyre felvittük. A sérült szövet, fertőzött szövet vagy gyulladt szövet esetén egy ilyen réteg megvédi a szövetet a környezetben levő mikroorganizmusokkal való további szennyeződéstől. Ezenkívül a protein természetű réteg a szövettel vagy a szöveten/szövetben/szövetnél jelen levő mikroorganizmusokkal való közvetlen érintkezés útján is kifejtheti hatását.

Annak érdekében, hogy a protein természetű réteg *in situ* képződjön az alkalmazás után, előnyös lehet, ha egy alkalmas puffert viszünk be a zománc mátrixot, zománc mátrix származékokat és/vagy zománc mátrix proteineket tartalmazó gyógyszerkészítménybe vagy kozmetikai készítménybe, ennek célja, hogy megvédjük az aktív zománcanyagot az alkalmazás helyén történő esetleges feloldódástól.

Megfigyeltük, hogy a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek biológiai tapadó-képességgel rendelkeznek, azaz képesek tapadni a bőr vagy nyálkahártya felületéhez. Ezek a tulajdonságok legalább a következő okok miatt nagyon értékesek a terápiás és/vagy profilaktikus kezelés szempontjából:

- a profilaktikusan és/vagy terápiásan aktív anyag(ok) hosszú ideig az alkalmazás helyén tartható(k), azaz i) az al-

- kalmazás gyakorisága csökkenthető, ii) az aktív anyag szabályozott leadása érhető el, és/vagy iii) a helyi kezelés az alkalmazás helyén javul;
- az anyagok maguk alkalmasak más profilaktikusan vagy terápiásan aktív anyagok hordozóanyagaiként, mivel a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek formulálhatók bioadhezív hordozóként, azaz új bioadhezív hatóanyagtovábbító rendszer alakítható ki a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek alkalmazásával.

A hatásmechanizmusra vonatkozó elméletek

A zománc mátrix egy olyan extracelluláris protein mátrix, amely az ásványi felületekre, valamint a protein természetű felületekre tapad. Fiziológias pH-nál és hőmérsékletnél a proteinek oldhatatlan szupramolekuláris aggregátumot képeznek [Fincham et al., *J. Struct. Biol.*, **112**(2):103-109 (1994. március-április); *J. Struct. Biol.*, **115**(1):50-59 (1995. július-augusztus)], amely proteolitikus enzimek hatására fokozatosan bomlik le (ami mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között bekövetkezik feltéve, hogy a proteázok nem inaktiválódtak).

A jelenlegi megfigyelések, melyek szerint zománc mátrix képződik és időlegesen jelen van a gyök kialakulása és cementálódása folyamán, rávilágíthat, hogyan segítik elő a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek a periodontális szövet regenerálódását. Azonban a tá-lálmány szerinti megoldást alátámasztó megfigyelések, miszerint a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zo-

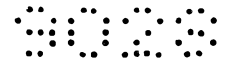
mánc mátrix proteinek a lágy szövetek hiányosságainak gyógyítására, így például a sebgyógyulásra is pozitív hatással vannak, igen meglepőek. Ugyanez vonatkozik a fertőzésellenes és gyulladásellenes hatásra is.

Sok esetben az újonnan mineralizálódott koronában, a fog kibújásakor megtalálhatók a zománc mátrix maradékai. Egy új fog nagyon védtelen a szájüregben található szokásos baktériumok által okozott támadással szemben, hacsak nincs természetes védelme ebben a kezdeti szakaszban.

Az oldhatatlanná tevő, megfelelő antibakteriális és/vagy gyulladásellenes tulajdonságokkal rendelkező zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek alkalmazása a sérült felületre elősegíti és fokozza a gyógyulást.

Amint a kísérleti részben bemutatjuk, a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek vagy protein aggregátumok kontakt gátlással akadályozzák a baktériumnövekedést, miközben a kitett sejtek szemmel láthatólag úgy reagálnak a zománc mátrixra, mint olyan normális környezetre, amely elnyomja a gyulladásos válaszokat.

A találmány értelmében a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek alkalmazhatók gyógyító, valamint megelőző céllal. Ezenkívül a zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek más hatóanyagokkal együtt is alkalmazhatók, ezek lehetnek például baktériumellenes, gyulladásellenes, vírusellenes, gombaellenes anyagok vagy ezek kombinációja növekedési faktorkkal, ilyenek például a TGF β , PDGF, IGF, FGF, keratinocita



növekedési faktor vagy ezek peptid analógjai (feltételezhető, hogy az EGF azzal segíti elő a gyógyulást, hogy fokozza az epitéliumsejtek migrációját és sejtosztódását; ezenkívül az EGF növeli a fibroblasztok számát a sejtekben, ami nagyobb kollagéntermelést eredményez). Enzimek, különösen proteázok – akár olyanok, amelyek eredendően jelen vannak a zománc mátrixban, akár készítmény formájában hozzáadva – szintén alkalmazhatók a zománc mátrixszal, zománc mátrix származékokkal és/vagy zománc mátrix proteinekkal kombinálva.

Az aktív zománcanyagot normálisan gyógyszerkészítmény vagy kozmetikai készítmény formájában formuláljuk. Az ilyen kompozíciók természetesen állhatnak a protein természetű készítményből vagy tartalmazhatnak további farmakológiailag vagy kozmetikailag elfogadható segédanyagot. A gyógyszerkészítményekben és kozmetikai készítményekben való felhasználáshoz különösen alkalmas segédanyagok a propilén-glikol-alginát vagy a hialuronsav és sói és származékai.

Gyógyszerkészítmények és/vagy kozmetikai készítmények

Az alábbiakban példaképpen bemutatunk alkalmas kompozíciókat, amelyek az aktív zománcanyag(ka)t tartalmazzák. Az aktív zománcanyag(ok) felhasználásától függően a kompozíció lehet gyógyszerkészítmény vagy kozmetikai készítmény. A továbbiakban a "gyógyszerkészítmény" kifejezésen kozmetikai készítményeket, valamint a gyógyszerkészítmények és kozmetikai készítmények átmeneti határterületére eső készítményeket, azaz gyógykozmetikumokat is értünk.

A kezelendő egyénnek (embernek vagy állatnak) történő adagoláshoz a zománc mátrixot, zománc mátrix származékokat



és/vagy zománc mátrix proteinekét (melyeket aktív zománcanyagnak is nevezünk) és/vagy ezek készítményét előnyösen egy az aktív zománcanyagot és adott esetben egy vagy több farmakológiailag elfogadható segédanyagot tartalmazó gyógyszerkészítménnyé formuláljuk.

A készítmény lehet például szilárd, félszilárd vagy folyékony formában, így például

biológiailag abszorbeálható flastromok, folyékony gyógyszerkészítmények, ecsetelők, hidrogél ecsetelők, hidrokolloid ecsetelők, filmek, habok, lapok, kötések, tapaszok, továbbító eszközök, implantátumok,

porok, granulumok, granulátumok, kapszulák, agaróz vagy kitozán gyöngyök, tabletták, pirulák, pellettek, mikrokapszulák, mikrogömbök, nanorészecskék,

permetek, aeroszolok, inhalálószeresek,

gélek, hidrogélek, paszták, kenőcsök, krémek, szappanok, kúpok, hüvelykúpok, fogpaszták,

oldatok, diszperziók, szuszpenziók, emulziók, keverékek, balzsamok, szájöblítőszeresek, samponok, beöntések,

készletek, például két különálló tárolóeszközt tartalmazó készletek formájában, ahol az egyik az aktív zománcanyagot tartalmazza adott esetben más hatóanyaggal és/vagy farmakológiailag elfogadható segédanyaggal együtt, míg a másik egy, az első tárolóeszközhöz az alkalmazás előtt az adagolásra kész készítmény kialakítása érdekében hozzáadandó alkalmas közeget tartalmaz,

vagy más alkalmas formában, például implantátum vagy implantátumbevonat formájában vagy valamely az implantálással

vagy transzplantálással kapcsolatosan történő alkalmas formában.

A bőrre vagy nyálkahártyára történő adagoláshoz megfelelő készítményeket tekintjük a találmány szempontjából a legfontosabb megoldásoknak. Ennek megfelelően az adagolandó aktív zománcanyag bármely alkalmas adagolási módhoz, így például a topikális (dermális), orális, bukkális, nazális, aurális, rektális vagy vaginális vagy valamely testüregbe történő adagoláshoz, így például foggyökérre vagy fogcsatornába történő adagoláshoz adaptálható. Ezenkívül a készítmények adaptálhatók a sebészettel, így például a testen belüli vágásokkal kapcsolatosan, a belső sebek és a lágy szövetek gyógyulásának elősegítése érdekében történő adagoláshoz is.

Amint említettük, az aktív zománcanyagot tartalmazó készítmények alkalmasak lehetnek a sebészeti kezelés során történő alkalmazáshoz, így például lokális (pl. a szájüregben történő) alkalmazáshoz gél, film vagy száraz pellet, vagy pedig öblítő oldat formájában vagy a bakteriális támadás megakadályozása érdekében a szöveten vagy felületen pasztával vagy krémmel végzett kezelés céljára. A fogcsatorna területén végzett sebészettel vagy implantálással kapcsolatosan üreg lezáró paszta alkalmazható.

A készítmények a gyógyszerészeti gyakorlatnak megfelelően formálhatók, megfelelő előiratok találhatók például a "Remington's Pharmaceutical Sciences" és az "Encyclopedia of Pharmaceutical Technology" című művekben (szerk.: Swarbrick, J. & J. C. Boylan, Marcel Dekker, Inc., New York, 1988).

Amint említettük, az aktív zománcanyagot tartalmazó ké-



szítményeket a bőrre vagy nyálkahártyára történő adagolásra szánjuk. Természetesen másfajta alkalmazások szintén relevánsak lehetnek, így például műfogsorokra, protézisekre, implantátumokra és testüregbe, például száj- és orrüregbe, valamint hüvelybe történő adagolás. A kezelendő nyálkahártya lehet orális, bukkális, nazális, aurális, rektális vagy vaginális nyálkahártya. Ezenkívül az alkalmazás történhet közvetlenül a sebre vagy a sebbe vagy más szövetsérülésre vagy szövetsérülésbe.

Ezenkívül a dentális/odontológiai területen belül történő alkalmazás szintén nagyon fontos. Ilyen lehetőségek például a periodontális (dentális) tasakok esetén, a fogínyre vagy ínyszekrécióra vagy más, a szájüregben előforduló sebekre vagy szájsebészettel kapcsolatosan történő alkalmazás.

A találmány szerinti aktív zománcanyag antibakteriális tulajdonságai következtében előnyösen alkalmazható fogakra és foggyökerekre kariesz és/vagy plakkok kialakulásának megelőzésére. Ennek alátámasztására megjegyezzük, hogy kimutatták [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 epidemiological, genetic and clinical study in a Swedish child population, *Swed. Dent. J.*, 31(suppl.):1-38 (1986)], hogy a nem teljesen kifejlett (amelogenesis imperfecta) és így nagy mennyiségű amelogenint tartalmazó fogak jelentősen ellenállnak a kariesznek.

Az aktív zománcanyagot tartalmazó gyógyszerkészítmények hatóanyagtovábbító rendszerként szolgálnak. Ilyen szempontból



a "hatóanyagtovábbító rendszer" kifejezésen olyan gyógyszerkészítményt (gyógyszerészeti formát vagy adagolási formát) értünk, amely alkalmazáskor a hatóanyagot eljuttatja az ember vagy állat szervezetébe. Ennek megfelelően a "hatóanyagtovábbító rendszer" kifejezés felöleli az egyszerű gyógyszerkészítményeket, pl. krémeket, kenőcsöket, folyadékokat, porokat, tablettákat stb., valamint az ennél kifinomultabb készítményeket, pl. permeteket, flastromokat, kötéseket, zománcanyagokat, eszközöket stb.

A találmány szerinti, gyógyszerészeti felhasználásra szánt készítmények az aktív zománcanyag mellett farmakológiailag és kozmetikailag elfogadható segédanyagokat is tartalmazhatnak.

A farmakológiailag és kozmetikailag elfogadható segédanyagokon olyan anyagokat értünk, amelyek lényegében véve ártalmatlanok a kezelt egyénre nézve. Az ilyen segédanyagok normálisan kielégítik a nemzeti egészségügyi előírásokat. A hivatalos gyógyszerkönyvek, például a British Pharmacopoeia, az United States of America Pharmacopoeia és az European Pharmacopoeia rögzíti az ilyen farmakológiailag elfogadható segédanyagok jellemzőit.

Hogy egy farmakológiailag elfogadható segédanyag alkalmas-e egy gyógyszerkészítményben való felhasználásra, általában attól függ, hogy milyen adagolási formát választottunk az adott seben való felhasználáshoz. Az alábbiakban felsoroljuk a különböző fajta készítményekben való felhasználáshoz alkalmas, farmakológiailag elfogadható segédanyagok néhány példáját.



Az alábbiakban áttekintjük a találmány értelmében alkalmazható gyógyszerkészítményeket. Az áttekintés az adagolás egyes módjain alapszik. Nyilvánvaló azonban, hogy olyan esetekben, amikor egy farmakológiailag elfogadható segédanyag különböző adagolási formákban vagy készítményekben alkalmazható, akkor az adott farmakológiailag elfogadható segédanyag alkalmazása nem korlátozódik az adott adagolási formára vagy a segédanyag egy adott funkciójára.

A farmakológiailag elfogadható segédanyagoknak a találmány értelmében alkalmazható készítményekhez való megválasztása és optimális koncentrációja általában nem mondható meg előre, hanem a végső készítmény kísérleti kiértékelésének alapján kell megállapítani. Szakember azonban erre nézve iránymutatást találhat a következő műben: "Remington's Pharmaceutical Sciences" (18. kiadás, Mack Publishing Company, Easton, 1990).

Topikálisan alkalmazható készítmények

A nyálkahártyára vagy a bőrre való alkalmazáshoz a találmány szerinti készítmények tartalmazhatnak szokásos nem-toxikus farmakológiailag elfogadható vivőanyagokat és segédanyagokat, ide értve a mikrogömböket és a liposzómákat.

A találmány szerinti készítmények lehetnek bármilyenféle szilárd, félszilárd és folyékony készítmények. Különösen fontosak például a paszták, kenőcsök, hidrofil kenőcsök, krémek, gélek, hidrogélek, oldatok, emulziók, szuszpenziók, balsamok, bedörzsölőszerek, samponok, zselék, szappanok, rudak, permetek, porok, filmek, habok, párnák, szivacsok (pl. kollagén szivacsok), bevonószerek (pl. abszorbeálódó seb-bevonó-



szerek), tapaszok, kötések, flastromok és transzdermális szállítórendszerek.

A farmakológiailag elfogadható segédanyagok lehetnek oldószeresek, pufferek, konzerválószeresek, nedvesítőszeresek, kelátképző anyagok, antioxidánsok, stabilizálószeresek, emulgeálószeresek, szuszpendálószeresek, gélképzőszeresek, kenőcs-alapok, penetrációt elősegítő anyagok, parfümök és bőrvédő anyagok.

Az oldószeresek lehetnek például víz, alkoholok, növényi és halolajok (például ehető olajok, mint pl. mandulaolaj, ricinusmagolaj, kakaóvaj, kókuszolaj, kukoricacsíraolaj, gyapotmagolaj, lenmagolaj, olívaolaj, pálmaolaj, földimogyoróolaj, mákolaj, repceolaj, szezámolaj, szójaolaj, napraforgómagolaj és teamagolaj), ásványi olajok, folyékony paraffin, polietilén-glikolok, propilén-glikolok, glicerin, folyékony polialkil-sziloxánok és ezek elegye.

A pufferanyagok lehetnek például citromsav, ecetsav, borkősav, tejsav, hidrogén-foszforsav, dietilamin stb.

A konzerválószeresek lehetnek például parabenek, pl. metil-, etil-, propil-p-hidroxibenzoát, butilparaben, izobutilparaben, izopropilparaben, káliumszorbát, szorbinsav, benzoesav, metilbenzoát, fenoxietanol, bronopol, bronidox, MDM hidantoin, jóddpropinil-butylkarbamát, EDTA, benzalkónium-klorid és benzilalkohol vagy ezek elegye.

A nedvesítőszeresek lehetnek glicerin, propilén-glikol, szorbit, tejsav, karbamid és ezek elegye.

Kelátképző anyagként alkalmazhatunk nátrium-EDTA-t és citromsavat.



Antioxidánsként alkalmazhatunk például butilezett anizolt (BHA), aszkorbinsavat és származékait, tokoferolt és származékait, ciszteint és ezek elegyét.

Az emulgeálószeres lehetnek például a természetben előforduló gumik és mézgák, pl. akácmézga vagy tragakant mézga, természetben előforduló foszfatidok, pl. szójalecitin, szorbitán-monooleát-származékok, gyapjúzsírok, gyapjúalkoholok, szorbitánészterek, monogliceridek, zsíralkoholok, zsírsavészterek (pl. zsírsav-trigliceridek) és ezek keveréke.

A szuszpendálószeres lehetnek például cellulóz és cellulóz-származékok, pl. karboximetil-cellulóz, hidroximetil-cellulóz, hidroxipropil-cellulóz, karragenan, akácmézga, gumiarábikum, tragakant és ezek keveréke.

A gél-alapok és a sebváladék felfogására képes viszkozitásnövelőszerek lehetnek például folyékony paraffin, polietilén, olajok, kolloid szilíciumoxid vagy alumíniumoxid, cink-szappanok, glicerin, propilén-glikol, tragakant, karboxivinil-polimerek, magnézium-alumínium-szilikátok, Carbo-pol^(R), hidrofil polimerek, pl. keményítő vagy cellulóz-származékok, pl. karboximetil-cellulóz, hidroximetil-cellulóz és más cellulóz-származékok, vízzel duzzadó hidrokolloidok, karragenánok, hialuronátok (pl. adott esetben nátriumkloridot tartalmazó hialuronát-gél) és alginátok, így pl. a propilén-glikol-alginát.

A kenőcs-alapok tartalmazhatnak például méhviaszt, paraffint, cetanolt, cetilpalmitátot, növényi olajokat, zsírsavak szorbitánésztereit (Span), polietilén-glikolokat és zsírsavak szorbitánésztereinek etilénoxiddal képzett kondenzátu-



mait, pl. polioxietylén-szorbitán-monooleátot (Tween).

A hidrofób vagy vízzel emulgeálható kenőcs-alapok lehetnek paraffinok, növényi olajok, állati zsiradékok, szintetikus gliceridek, viaszok, lanolin és folyékony polialkilsziloxánok.

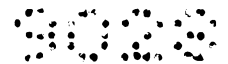
A hidrofil kenőcsalapok lehetnek például szilárd makrogolok (polietilén-glikolok).

További kenőcs-alapok például a trietanolamin-szappanok, szulfatált zsíralkoholok és a poliszorbátok.

A porkészítmények komponensei lehetnek például alginát, kollagén, laktóz, a sebre alkalmazva gélképzésre alkalmas porok (amelyek abszorbeálják a folyadékokat/sebváladékokat). Normális esetben a nagy kiterjedésű, nyílt sebekre történő alkalmazásra szánt poroknak sterileknek kell lenniük, és a részecskének mikronizált formában kell jelen lenniük.

További segédanyagok például a karmellóz, nátrium-karmellóz, hidroxipropilmetil-cellulóz, hidroxietil-cellulóz, hidroxipropil-cellulóz, pektin, xantángumi, szentjánoskenyér-mézga, akácmézga, zselatin, karbomer, emulgeálószer, pl. E-vitamin, gliceril-sztearátok, cetanil-glükózid, kollagén, karragenan, hialuronátok, alginátok és kitozánok.

A bevonószer és/vagy kötőszerek szintén fontos szállítórendszerek az aktív zománcanyag számára. Ha a bevonószereket adagolási forma alakjában alkalmazzuk, az aktív zománcanyag a bevonószer készítése során vagy az előtt keverhető más anyagokkal/komponensekkel, vagy pedig az aktív zománcanyag más módon vihető fel a bevonószerre, pl. úgy, hogy a bevonószer egy az aktív zománcanyagot tartalmazó oldatba me-



rítjük, vagy a bevonószerre az aktív zománcanyagot tartalmazó oldatot vagy diszperziót rápermetezzük. Eljárhatunk úgy is, hogy az aktív zománcanyagot por formájában visszük fel a bevonószerre. A bevonószerrek lehetnek például abszorbeáló seb-bevonószerrek váladékozó sebekre. A bevonószerrek lehetnek hidrogél bevonószerrek formájában is (pl. térhálós polimerek, pl. Intrasilite^(R), amely karboximetil-cellulózt, propilénglikolt vagy poliszacharidokat, diszacharidokat és proteineket tartalmaz) vagy lezáró bevonószerrek formájában, például alginátok, kitozán, hidrofil poliuretán film, kollagén lap, lemez, por, hab vagy szivacs, hab (pl. poliuretán vagy szilikon), hidrokolloidok (pl. karboximetil-cellulóz, CMC), kollagén és hialuronsav alapú bevonószerrek, beleértve ezek kombinációit is.

Az alginát, kitozán és a hidrokolloid bevonószerrek a sebre helyezve felveszik a sebváladékot. Ilyenkor a seb felületén vizes gél képződik, és feltételezhető, hogy ez a gél hasznos a sebgyógyulás szempontjából, mivel megtartja a nedvességet a sebben.

Úgy találtuk továbbá, hogy az aktív zománcanyag bevihető olyan adhezív szövetekbe, amelyek például fibrinogént és trombint és adott esetben XIII-as faktort vagy más plazma koagulációs faktort tartalmaznak a hemosztázis biztosítására. Az adhezív szövet elkészíthető az aktív zománcanyag, fibrinogén és adott esetben XIII-as faktor premixeként, és a trombin hozzáadható a premixhez közvetlenül az adhezív szövet sebre való felvitele előtt. Eljárhatunk úgy is, hogy a fibrinogént és az aktív zománcanyagot és adott esetben a XIII-as

faktort tartalmazó premixet visszük fel a sebre, mielőtt a trombint alkalmaznánk. A trombin *in situ* fibrinné alakítja a fibrinogént, így a sebgyógyulásakor természetesen végbemenő koagulációs folyamatot reprodukálja. Az aktív zománcanyag jelenléte az adhezív szövetben elősegítheti a sebgyógyulási folyamatot, amint ezt a korábbiakban tárgyaltuk. Aktív zománcanyag bevitelére szolgáló alkalmas kereskedelmi termék például a Tisseel^(R) (Immuno AG., Bécs, Ausztria), amely egy két-komponensű, fibrintartalmú seblezárószer.

Fogpasztákban vagy szájöblítőszerekben vagy más a fogakra vagy foggyökérre alkalmazandó készítményekben az aktív zománcanyag jelen lehet enyhén savas pH-jú vivőanyagban oldott, vagy pedig semleges pH-jú vivőanyagban diszpergált formában. A használat során az aktív zománcanyag védőréteget képez a fogak felületén, így megakadályozza, hogy a karrieszt okozó baktériumok megtapadjanak (lásd a 4. példát). Az ilyen fogápoló készítményekben az aktív zománcanyag egy vagy több olyan hatóanyaggal együtt formulálható, amelyek karrieszmegelőző hatással rendelkeznek, ilyenek a fluor vagy más nyomelemek, például a vanádium és a molibdén. Feltételezhető, hogy semleges pH-nál a nyomelemek hozzákötődnek (pl. ionkötésekkel) az aktív zománcanyaghoz vagy beépülnek abba, amelyből azután felszabadulnak és kifejtik karrieszmegelőző hatásukat, amikor az aktív zománcanyag például a karrieszképző baktériumok által termelt savak hatására kialakuló 5,5 körüli vagy annál alacsonyabb pH-nál feloldódik.

A fent említett, topikális alkalmazásra szánt készítmények a legalkalmasabbak arra, hogy közvetlenül a sebre felvi-



gyük, illetve alkalmasak lehetnek arra, hogy valamely releváns testnyílásra vagy testnyílásban, így rektális, uretrális, vaginális, aurális, nazális vagy orális nyílásban alkalmazzuk. A készítmények egyszerűen, bármely szokásos adagolási módszerrel közvetlenül felvihetők a kezelendő területre, például a nyálkahártyára.

A topikális alkalmazási mód esetén fontos készítmények tixotrópos tulajdonságokkal rendelkeznek, azaz a készítmény viszkozitása például keverés vagy rázás hatására úgy változik meg, hogy az alkalmazás időpontjában csökken, és alkalmazás után emelkedik, így a készítmény ott marad az alkalmazás helyén.

Orális alkalmazásra vagy a nyálkahártyára vagy bőrre történő alkalmazásra szánt készítmények

A találmány szerinti készítmények előállíthatók szuszpenzió, emulzió vagy diszperzió formájában is. Az ilyen készítmények az aktív zománcanyagot diszpergálószerekkel, szuszpendálószerekkel és/vagy egy vagy több konzerválószerrel és más farmakológiailag elfogadható segédanyaggal összekeverve tartalmazzák. Az ilyen készítmények alkalmasak lehetnek arra is, hogy segítségükkel az aktív zománcanyagot az érintetlen vagy károsodott nyálkahártyára, például orális, bukkális, nazális, rektális vagy vaginális nyálkahártyára juttassuk, vagy pedig arra, hogy az érintetlen vagy károsodott bőrre vagy sebbe adagoljuk.

Alkalmas diszpergáló és nedvesítőszerek például a természetben előforduló foszfatidok, például lecitin, szójalecitin; az etilénoxid például zsírsavakkal, hosszú szénláncú



alifás alkoholokkal, zsírsavak parciális észtereivel és hexitollal vagy hexitol-anhidriddel alkotott kondenzációs termékei, pl. polioxietilén-sztearát, polioxietilén-szorbit-monooleát, polioxietilén-szorbitán-monooleát stb.

Alkalmas szuszpendálószeres példák a természetben előforduló gumik és mézgák, pl. akácmézga, xantán mézga és a tragakant mézga, cellulózok, pl. nátrium-karboximetilcellulóz, mikrokristályos cellulóz (pl. Avicel^(R) RC 591, metilcellulóz); alginátok és kitozánok, pl. nátrium-alginát stb.

Alkalmas konzerválószeres ilyen esetben azok, amelyeket már a korábbiakban említettünk.

A találmány szerinti készítmények adagolhatók orális úton. Az alkalmas orális készítmények lehetnek részecskék formájában vagy szilárd, félszilárd vagy folyékony adagolási formában.

Az orális adagolásra szánt szilárd készítmények lehetnek például porok, granulátumok, granulumok, tasakok, tabletták, kapszulák, pezsgőtabletták, rágható tabletták, nyelv alá helyezendő pirulák, hatóanyagot azonnal leadó tabletták és módosított hatóanyagleadó tabletták, valamint folyékony vagy folyadékkészítmények, például oldatok, szuszpenziók, emulziók, diszperziók és keverékek. Ezenkívül a készítmények lehetnek olyan por, diszpergálható por vagy granulátum formájában, amelyek valamely folyékony közeg, pl. vizes közeg adagolásával vizes szuszpenziókká alakíthatók.

A szilárd, orális (vagy topikális) alkalmazásra szánt adagolási formák normális esetben az aktív zománcanyagot és adott esetben valamely egyéb hatóanyagot egy vagy több farma-



kológiaailag elfogadható segédanyaggal összekeverve tartalmazák. A segédanyagok lehetnek például

inert hígítószerke vagy töltőanyagok, például szacharóz, szorbit, cukor, mannit, mikrokristályos cellulóz, keményítők, pl. burgonyakeményítő, kalcium-szorbát, nátrium-klorid, laktóz, kalcium-foszfát, kalcium-szulfát vagy nátrium-foszfát;

granuláló és dezintegrálószerke, például cellulózsármazékok, pl. mikrokristályos cellulóz, keményítők, pl. burgonyakeményítő, kroszmellóz-nátrium, alginátok vagy alginsav és kitozán;

kötőszerke, például szacharóz, glükóz, szorbit, akácia, alginsav, nátrium-alginát, zselatin, keményítő, előzselatinált keményítő, mikrokristályos cellulóz, magnézium-alumínium-szilikát, nátrium-karboximetilcellulóz, metilcellulóz, hidroxipropil-metilcellulóz, etilcellulóz, polivinilpirrolidon, polivinilacetát vagy polietilén-glikol és kitozán;

síkosítószerke, beleértve a csúsztatószerkeket és a tapadásgátlószerkeket, például magnézium-sztearát, cink-sztearát, sztearinsav, szilíciumoxidok, hidrogénezett növényi olajok és talkum.

További farmakológiaailag elfogadható segédanyagok lehetnek pl. színezőanyagok, zamatanyagok, plaszticizálószerke, nedvesítőszerke, pufferek stb.

Abban az esetben, ha a gyógyszerkészítmény szilárd adagolási formában van (pl. tabletta vagy kapszula), az adagolási egységet bevonattal, például az alábbiakban említett egy vagy több bevonattal láthatjuk el.



Ha a készítmény tabletta, kapszula vagy egy többszörös egységet tartalmazó készítmény formájában van, akkor a készítményt vagy az egyedi egységeket vagy az egyedi egységeket tartalmazó tablettákat vagy kapszulákat bevonattal, például cukorbevonattal, filmbevonattal (például hidroxipropil-metilcellulóz, metilcellulóz, metil-hidroxietilcellulóz, hidroxipropilcellulóz, karboximetilcellulóz, akrilát kopolimerek [Eudagrit], polietilén-glikol és/vagy polivinilpirrolidon alapú) vagy enterális bevonattal (például metakrilsav kopolimer [Eudagrit], cellulóz-acetát-ftalát, hidroxipropil-metilcellulóz-ftalát, hidroxipropil-metilcellulóz-acetát-szukcinát, polivinil-acetát-ftalát, sellakk és/vagy etilcellulóz alapú bevonattal) láthatjuk el. Ezenkívül egy késleltetőanyag, pl. glicerín-monosztearát vagy glicerín-disztearát is alkalmazható.

Rektális és vaginális adagolásra szánt készítmények

A végbél vagy a hüvely nyálkahártyájára történő adagoláshoz a találmány szerinti készítmények közül előnyösek a kúpok (emulziós vagy szuszpenziós típusúak), beöntések és a rektális zselatinkapszulák (oldatok és szuszpenziók). Alkalmas farmakológiailag elfogadható kúp-alapok például a kakaóvaj, észterezett zsírsavak, glicerinezett zselatin és a különböző vízzoldható vagy diszpergálható alapok, például polietilén-glikolok és polioxietilén-szorbitán-zsírsavészterek. Különböző adalékanyagok, például hatásfokozók és felületaktív anyagok szintén adagolhatók a készítményhez.



Nazális adagolásra szánt készítmények

Az orrnyálkahártyára (valamint a szájnyálkahártyára) történő adagoláshoz a találmány szerinti készítmények közül alkalmasak a permetek és az inhalációs aeroszolok. Egy tipikus nazális készítményben az aktív zománcanyag részecskék formájában van jelen, adott esetben egy alkalmas közegben diszpergálva. A farmakológiailag elfogadható vivőanyagokat és segédanyagokat és adott esetben más, a készítményben jelen levő farmakológiailag elfogadható anyagokat, például hígítószeret, hatásfokozóanyagokat, zamatanyagokat, konzerválószeret stb. a szokásos, a gyógyszergyártásban járatos szakemberek által ismert gyógyszerészeti gyakorlatnak megfelelően választjuk meg.

A zománc mátrix, zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek adagolása

A találmány szerinti, a bőrre vagy nyálkahártyára alkalmazandó gyógyszerkészítményekben az aktív zománcanyag általában 0,01 töm.% és 99,9 töm.% közötti koncentrációban van jelen. A felvitt készítmény mennyisége normális esetben - összes protein per seb/bőr/szövet-felület cm^2 értékben kifejezve - körülbelül $0,01 \text{ mg/cm}^2$ és körülbelül 20 mg/cm^2 közötti, például körülbelül $0,1 \text{ mg/cm}^2$ és körülbelül 15 mg/cm^2 közötti.

A készítmény felvitt mennyisége függ az aktív zománcanyag koncentrációjától a készítményben és az aktív zománcanyag készítményből való felszabadulásának sebességétől, de általában körülbelül $15\text{-}20 \text{ mg/cm}^2$.

Abban az esetben, ha az aktív zománcanyagot folyékony



készítmény formájában alkalmazzuk, az aktív zománcanyag készítménybeli koncentrációja körülbelül 0,1 mg/ml és körülbelül 50 mg/ml közötti. Néha kívánatos ennél magasabb koncentráció is, így például legalább 100 mg/ml.

Ha a készítményt a szájüregben alkalmazzuk, akkor a következő dózisértékeket lehet figyelembe venni:

Majomkísérletekben, a kísérleti céllal létrehozott hiányos területek mérete körülbelül $4 \times 2 \times (5-6)$ mm, ami 50 μ l-nek felel meg, melyekre körülbelül 0,025 és 0,15 mg/mm² közötti vagy 2,5-15 mg/cm² összprotein-dózis alkalmazható. Rendszerint 0,5 ml-ig terjedő, például 0,4, 0,3, 0,2 vagy 0,1 ml készítményt alkalmazunk, melynek koncentrációja körülbelül 1-40 mg/ml, például 5-30 mg/ml.

Emberek esetén a szájüregben előforduló, periodontális betegségek következtében kialakuló hiányos területek mérete rendszerint $(5-10) \times (2-4) \times (5-10)$ mm, ami körülbelül 200 μ l-nek felel meg, és normális esetben foganként legfeljebb 0,5-1 ml, például 0,2-0,3 ml olyan készítményt adagolunk, amelynek összprotein koncentrációja 1-40 mg/ml, például 5-30 mg/ml. A 0,2-0,3 mg/ml koncentráció körülbelül 6 mg proteinnek felel meg 25-100 mm²-enként, vagy pedig 0,1 mg/mm²-nek, ha a gyökér felületére számoljuk. Rendszerint fölösleges térfogatú készítményt adagolunk, hogy befedjen minden felületet. Ha több rétegben visszük fel, a fenti mennyiségek töredékére van szükség.

Általában körülbelül 0,1-0,5 ml, például körülbelül 0,15-0,3 ml vagy körülbelül 0,25-0,35 ml aktív zománcanyagot tartalmazó készítményt alkalmazunk egy húzási fogüregbe (ki-



húzott fog után maradt mélyedésbe). A készítményben az aktív zománcanyag összprotein-koncentrációja normálisan kb. 1-40 mg/ml, például 5-30 mg/ml. Ha egy ilyen készítményből 0,3-0,4 ml-t alkalmazunk a bölcsességfogakra, ez a térfogat kb. 0,1 mg/cm²-nek felel meg (amennyiben a fogüreget 5 mm sugarú és 20 mm magasságú hengerként fogjuk fel).

Az aktív zománcanyag koncentrációja egy gyógyszerkészítményben függ az adott zománcanyagtól, annak hatóképes-ségétől, a megelőzendő vagy kezelendő betegség súlyosságától és a beteg korától és állapotától. Az aktív zománcanyagnak a gyógyszerkészítményekben kialakítandó megfelelő koncentráció-jának meghatározására szakemberek számára ismertek a módsze-rek, és a jó klinikai gyakorlatnak (GCP) megfelelően kialakí-tott szabványok vagy az Investigator New Drug Exemption ("IND") szabályai alapján végezhetők, amelyeket például az International Standard ISO/DIS 14155 Clinical Investigation of Medical Devices, (1994) és ICH (International Committee for Harmonisation): Harmonised Tripartite Guideline for Good Clinical Practice, Brookwood Medical Publications, Ltd., Surrey, UK, (1996) művek ismertetnek. Szakember az alkalma-zandó adagolási formát és adagolási ütemezést bármilyen aktív zománcanyaghoz és/vagy választott más hatóanyaghoz a tanköny-vekben, a fent említett irányelvekben és szabályzatokban is-mertetettek, valamint a szakterület általános ismeretei alap-ján, csupán rutin vizsgálatok alapján meg tudja határozni.

A találmány szerinti aktív zománcanyag alkalmas (i) se-bek megelőzésére és/vagy kezelésére, (ii) fertőzés csökkenté-sére és (iii) gyulladás megelőzésére és/vagy kezelésére oly



módon, hogy az aktív zománcanyag hatékony mennyiségét adagoljuk az ilyen kezelésre szoruló emlősnek. Nyilvánvaló, hogy a találmány szerinti aktív zománcanyagnak sebek megelőzésére és/vagy kezelésére történő alkalmazásának részletei és módozatai megegyeznek vagy analógok más alkalmazási szempontok (antibakteriális és gyulladásellenes szempontok) részleteivel és módozataival és a módszerek szempontjaival. Ez azt jelenti, hogy az aktív zománcanyagra, az aktív zománcanyagot tartalmazó készítményekre, az aktív zománcanyagot tartalmazó gyógyszerkészítményekre, az aktív zománcanyag előállítására, az aktív zománcanyagot tartalmazó készítmények előállítására, az aktív zománcanyagot tartalmazó gyógyszerkészítmények előállítására, valamint a javított tulajdonságokra és alkalmazásokra vonatkozóan kifejtettek a találmány szerinti megoldás összes megvalósítási formájára igazak.

A mellékelt ábrák a találmány szerinti megoldás jobb megértését szolgálják.

Az 1. ábra az EMD-vel stimulált, illetve nem stimulált humán PDL sejtek DNS szintézisének grafikonja.

A 2. ábra a az EMD-vel stimulált, illetve nem stimulált humán PDL sejtek TGF- β 1 termelésének grafikonja.

A 3. ábra a 3. és 4. példában ismertetett átfolyási kísérletben alkalmazott átfolyási kamra és számítógéprendszer sematikus rajza.

A 4., 5. és 6. ábra az *Actinomyces viscosus* EMD-vel, illetve ecetsavval kezelt üveglaphoz való tapadásának vizsgálatára végzett három kísérlet eredményének grafikus ábrázolása.



A 7., 8. és 9. ábra az *Streptococcus mutans* EMD-vel, illetve ecetsavval kezelt üveglaphoz való tapadásának vizsgálatára végzett három kísérlet eredményének grafikus ábrázolása.

A 10A ábra egy, bölcsességfog eltávolítása után az operáció utáni károsodást mutató röntgenkép.

A 10B ábra egy periodontális ligamentum EMD-vel, a 12. példa szerinti módon végzett kezelés utáni röntgenképe.

KÍSÉRLETI RÉSZ

Anyagok és módszerek

Külön-külön vizsgáltuk a következő anyagokat: zománc mátrix származék, EMDOGAIN^(R) (BIORA AB., Malmö, Svédország), amely 30 mg fagyasztva szárított zománc mátrix proteint (a továbbiakban EMD) és 1 ml vivőanyag oldatot (propilén-glikol-alginát) tartalmazott, amelyeket az alkalmazás előtt kevertünk, hacsak nem külön vizsgáltuk a proteint és a vivőanyagot. A 20, 14 és 5 kDa-nál jelentkező fő proteincsúcsok közötti tömegarány 85:5:10 volt. Hőkezelt EMD: a maradék proteázok inaktiválása érdekében 80 °C-on 3 óra hosszat hőkezelt EMD.

A 20 kDa moltömegű amelogenin proteint és az 5 kDa moltömegű tirozinban gazdag amelogenin peptidet (TRAP) EMD-ből izoláltuk HPLC gélpermeációs kromatográfiával (TSK G-2000 SW, 30 töm.% acetonitrilt és 0,9 töm.% NaCl-t tartalmazó oldattal kiegyensúlyozva), és fordítottfázisú kromatográfiával (Pro-RPC, HR 5/10, Pharmacia-Upjohn, Svédország) acetonitrilgradiens alkalmazásával tisztítottuk. Az elválasztott protei-
neket/polipeptideket azután különböző mennyiségekben



EMDOGAIN^(R) vivőoldathoz adtuk, hacsak nem külön vizsgáltuk.

A hialuronsav a Seikagaku Corp. (Tokió, Japán) cég HMT-0028 jelű terméke (moltömeg 990 000).

A baktériumok és élesztők betegektől izolált mikroorganizmusok voltak, amelyeket standard módszerekkel, metabolikus és antigén tulajdonságaik alapján osztályoztunk. Az alkalmazott baktériumokat és élesztőket az alábbiakban megadott táblázatban soroljuk fel.

A szérum albumint (szarvasmarha) és a 1-típusú kollagént (szarvasmarha) a Sigma (St. Louis, USA) cégtől szereztük be.

Az alkalmazott agarlemezek "agy-szív infúziós agarlemezek" voltak, melyeket a Difco cégtől szereztünk be, és humán vörösvértestekkel egészítettünk ki (100 ml/liter-agar).

PÉLDÁK

A találmány szerinti megoldást az alábbi példákkal szemléltetjük, a korlátozás szándéka nélkül.

1. példa

EMDOGAIN-nel kezelt PDL sejtek szaporodása és RGF- β 1

termelése

EMD törzsoldatot készítettünk: egy fiola (30 mg) EMD-t feloldottunk 3 ml sterilre szűrt 0,1 térf. %-os ecetsavban. 60 μ l EMD törzsoldatot hozzáadtunk 6000 μ l Dulbecco-féle módosított Eagle-tápközeghez, amely 10 térf. % borjúembrió-szérumot és 1 térf. % penicillin-streptomycin oldatot tartalmazott. 300 μ l ilyen elegyet bemértünk egy 96 mélyedéses mikrotitráló lemez (Nunc A/S, Dánia, katalógusszám: 167008) mélyedéseibe. Minden mélyedésbe bemértünk 1000 humán periodontális



ligamentum (PDL) sejtet [amelyeket fogszabályozási okokból zápfog-kihúzáson átesett emberek egészséges periodontális szövetéből nyertünk, és Somerman et al. *J. Dental Res.* 67:66-70 (1988) helyen ismertetett módszerével tenyésztettünk], és 37 °C-on 5 térf.% széndioxidot tartalmazó légtérben 5 napig inkubáltunk.

A kontrollként alkalmazott PDL sejteket Dulbecco-féle módosított Eagle-tápközegben tenyésztettük a fenti módon, azonban EMD nélkül.

Inkubálás után a sejteket sejtproliferációs immunvizsgálatnak vetettük alá, és mértük az 5-bróm-2'-dezoxiuridin (BrdU) beépülését a gyártó utasításai szerint (Boehringer Mannheim, katalógusszám: 1647229). Ebben az eljárásban a növekvő sejtek DNS-ébe timidin helyett BrdU épül be. A BrdU beépülését ELISA vizsgálattal detektáltuk, a vizsgálatban mért BrdU mennyisége a DNS-szintézis sebességének, és így a PDL sejtek szaporodási sebességének indikátora.

Az eredményeket az 1. ábrán mutatjuk be, amelyen látható, hogy az EMD jelenlétében tenyésztett sejtek szignifikánsan nagyobb sebességgel szaporodnak, mint az EMD nélkül tenyésztett PDL sejtek.

100 µl a mikrotitráló lapokról nyert felülúszóhoz hozzáadtunk 20 µl 1 n sósavat, majd szobahőmérsékleten 10 percig inkubáltuk. Az inkubált elegyet 20 µl 1 n NaOH/0,5 M HEPES eleggyel semlegesítettük. Ebből az elegyből 100 µl-t bemértünk 400 µl hígítópufferbe. 200 µl hígított elegyet QuantikinesTM kit (R&D Systems, GB, katalógusszám DB100) alkalmazásával ELISA vizsgálatnak vetettünk alá, a gyártó elő-



írásainak megfelelően.

Az eredményeket a 2. ábrán mutatjuk be, melyen látható, hogy az EMD-vel inkubált PDL sejtek esetén a TGF- β 1-termelés kifejezetten növekedett az EMD nélkül inkubált sejtekhez képest.

2. példa

Mikroorganizmusok zománc mátrix származékok és zománc mátrix proteinek jelenlétében végbemenő növekedésének vizsgálata

E példa célja, hogy a zománc mátrix származékok és zománc mátrix proteinek *in vitro* mikróbanövekedésre gyakorolt gátló hatását szemléltessük.

Az e példa szerinti kísérletben alkalmazott proteineket foszfáttal pufferolt, ecetsavval pH=5,5 értékre beállított konyhasó oldatban (PBS) oldottuk. Az alkalmazott mikrobákat pH=6,8 értékű PBS-ben szuszpendáltuk OD₆₀₀=0,4 végső értékig.

50 μ l EMDOGAIN-t (30 mg EMD 1 ml PGA-ban) és 50 μ l EMD-t, hőkezelt EMD-t, valamint A, B, C és H EMD frakciókat (minden esetben milliliterenként 10 mg protein PBS pufferben) agarlemezre csepegtettünk, és hagytuk megszáradni (9 cm átmérőjű agarlemezeket alkalmaztunk, amelyek rezisztencia meghatározásához szokásosan alkalmazott agarlemezek voltak, az egyes mikrobáknak megfelelő kiegészítőanyagokkal ellátva). Ezután a mikrobák homogén szuszpenzióját (1 ml, OD₂₈₀=0,5) szélesztettük a lemezek tetején, és a lemezeket 35 °C-on 3 napig inkubáltuk (aerob tenyészet), illetve 14 napig széndioxiddal dúsított atmoszférában vagy anaerob körülmények között, az egyedi növekedési szükségleteknek megfelelően (anaerob tenyészet). A tenyészeteket naponta ellenőriztük. Kont-



rollként 1-típusú kollagént és szérumalbumint (mindkettő szarvasmarha eredetű) vizsgáltunk ugyanilyen körülmények között. Negatív kontrollként nem-hígított propilén-glikol-alginátot (PGA-EMD vivőanyag), PBS puffert és hialuronsavat (HA-alternatív EMD vivőanyag) szintén vizsgáltunk.

Az eredményeket az 1. táblázatban foglaltuk össze. Csak a zománc mátrix származékok, illetve zománc mátrix proteinek vagy származékok gátolták egyes mikrobák növekedését. A proteinek körül nem voltak jelei diffúziós zónának, ami arra utal, hogy az alkalmazott EMD proteinek az agar felületén aggregálódtak, és hogy csak a proteinekkal közvetlenül érintkező mikrobák növekedése gátlódott. Amikor az inhibíciós zónából vett mintákat folyékony tápközegben (LB-leves kiegészítővel) tenyésztettük, az eredeti mikrobák monokultúráját lehetett újraéleszteni, ami arra utal, hogy az aktív proteinek nem mikrobaölő hatásúak. A vizsgált kontrollok negatív eredményt adtak, ami arra utal, hogy nonspecifikus mechanizmusok nem befolyásolták az eredményeket.

1. táblázat

Növekedés a vizsgált anyag tetején

Törzs	Szérumalbumin	I-típusú kollagén	Propilén-glikol-alginát	EMDOGAIN	EMD	Hőkezelt EMD	EMD A-frakció	EMD B-frakció	EMD C-frakció	EMD H-frakció	Hialuronsav	Kontroll puffer
<i>Actinobacillus actinomycescomitans</i>	+	+	+	-	-	-	+/-	+	-	+	+	+
<i>Escherichia coli</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+/-	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Streptococcus mutans</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
<i>Bacillus subtilis</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Candida albicans</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

EMD A-frakció: főleg amelogenin ~26-20 kDa,

EMD B-frakció: ~17-13 kDa proteinek,

EMD C-frakció: ~10-5 kDa proteinek,

EMD H-frakció: az összes 27 kDa-nál nagyobb molttömegű
protein,

+ : a mikrobák normálisan növekszenek,

- : a mikrobák növekedésének teljes gátlása,

+/- : valamelyes növekedésgátlás a negatív kontrollhoz viszonyítva.

A táblázatban összefoglalt eredményeket az inkubálás második napján (aerob tenyészetek), illetve öt napig tartó



inkubálás után (anaerob tenyészetek) vettük fel.

Az eredmények azt mutatják, hogy az EMD, amely proteinek vagy peptideket tartalmaz, egy felületen aggregálódva gátolja egyes Gram-negatív pálca és néhány Gram-pozitív coccus növekedését. Az EMD proteinek alapvető viselkedési tulajdonságai alapján, továbbá mivel a hatás nem mikrobaölő, a megfigyelt hatás észszerű magyarázata az lehet, hogy a proteinaggregátumok oldhatatlan gátat képeznek, amely elválasztja a mikrobákat a szükséges növekedési szubsztrátumoktól.

3. példa

EMD in vitro hatása *Actinomyces viscosus* megtapadásának arányára

Bevezetés

Az EMD hatását vizsgáltuk az *Actinomyces viscosus* kezdeti megtapadására, amely egy a szájban, a fogköőben széles körben előforduló organizmus, amelyet viszont szokásosan nem tekintenek a súlyos periodontitisszel kapcsolatban levőnek. Bár ez az organizmus a *Porphyromonas gingivalisszal* aggregátumokat képezhet, és így befolyásolhatja a gyökér felületének potenciális periodontális patogénekkal való kolonizációját, az *Actinomyces* fajok viszonylag nagy arányban találhatók az egészséges fogíny alatti területeken. Ez a megfigyelés megerősíti Liljemark és munkatársai megfigyelését [Microbiol. Immunol., 8:5-15 (1993)], miszerint periodontális kezeléseket követően az *Actinomyces* fajok aránya jelentősen emelkedett. Haffajee és munkatársai [J. Clin. Periodont., 24:767-776 (1997)] a fogíny alatti plakkok mikrobaszámából

arra a következtetésre jutottak, hogy egy, a kezdeti perio-dontális kezelésre jó választ adó egyén esetén az *A. viscosus* és a *T. denticola* viszonylag nagy számban fordul elő.

Anyagok

Az *Actinomyces viscosus* HG85 törzset Dr. A. J. van Winkelhofftól szereztük be (Dept. of Oral Microbiology, ACTA). Emdogain-t a Biora cégtől (Malmö, Svédország) szereztük be. RBS detergenst a Fluka cégtől (Fluka Chemie AG, Buchs, Svájc) szereztük be.

Baktériumok növesztése és összegyűjtése

*A. viscosus*t véragar lemezekről Schaedler-levesre oltottunk, és 24 óra hosszat 37 °C-on tenyésztettük. A kapott tenyészetet egy második Schaedle-levestenyészet beoltására alkalmaztuk, amelyet 16 óra hosszat növesztettünk. A sejteket centrifugálással (5 perc, 6500xg) összegyűjtöttük, és ionmentes vízzel kétszer mostuk. Ezután a mikroorganizmusokat 20 percig 30 W teljesítménnyel (Vibra Cell, 375 számú modell, Sonics and Materials, Inc., Danbury, CT, USA) ultrahanggal kezeltük a baktériumláncok és -aggregátumok széttörésére. Az ultrahangkezelést megszakításokkal végeztük, miközben jeges vizes fürdővel hűtöttük az elegyet. A sejtszámlálást Bürker-Türker sejtszámláló segítségével végeztük. Végül az *A. viscosus*t adhéziós pufferben (2 mM kálium-foszfát, 50 mM kálium-klorid, 1 mM kalcium-klorid, pH=6,8) szuszpendáltuk.

Üveglapok bevonása

Üveglapokat megtisztítottunk oly módon, hogy 5 töm. %-os RBS detergensben ultrahanggal kezeltük, csapvízzel alaposan leöblítettük, metanollal mostuk, és végül desztillált vízzel



leöblítettük. Ezzel az eljárással nulla fokú vízérintkezési szöget kaptunk. 0,01 M koncentrációjú ecetsavban feloldottunk 7,5 mg/ml EMD-t. Az üveglapokat egy teflon-markerrel (DAKO A/S, Glostrup, Dánia) két részre osztottuk. 0,01 M-os ecetsavat vittünk fel az egyik oldalra, és 250 µg EMD-t a másikra. Az üveglapokat 4-6 óra hosszat levegőn szárítottuk.

Átfolyási kísérlet

A kísérletben alkalmazott átfolyási kamra és számítógép rendszer vázlatos képét a 3. ábrán mutatjuk be. A kísérletek előtt a csöveket és az átfolyási kamrát adhéziós pufferrel töltöttük fel, és ügyeltünk arra, hogy a rendszer ne tartalmazzon légbuborékot. A bevont üveglemezek alkották az átfolyási kamra alját. Az átfolyási sebességet 2,5 ml/perc értékre állítottuk be (ami az emberi nyálfolyás átlagos sebességével összevethető). A baktériumszuspenziót körülbelül 3-4 óra hosszat cirkuláltattuk a rendszerben, majd megszámoltuk a szubsztrátumhoz tapadt baktériumokat. Három független kísérletet folytattunk le. A kísérleteket 3×10^8 sejt/250 ml adhéziós puffer sejtszámmal végeztük. A kísérlet során 10-15 percenként felvételeket készítettünk a kontroll és az EMD-vel bevont lemezek 6 előre meghatározott helyéről. A párhuzamos átfolyási kamra magassága 0,6 mm volt.

Adatok elemzés

A felvételeken megszámoltuk a megtapadt sejteket, az adatokat sejtszám/cm² értékekre átszámoltuk. Minden kísérletben ezt az értéket alkalmaztuk a statisztikai elemzésben (Student-féle T-teszt páros megfigyelésekhez, n kísérlet esetén).



Eredmények

Az 1. kísérlet (4. ábra) a megtapadt mikroorganizmusok számának fokozatos emelkedését mutatta, különösen az átáramlás első 150 percében. Ezen idő után az EMD-hez tapadt mikroorganizmusok száma elért egy platót $2,0 \times 10^6$ sejt/cm² értéknél, ami körülbelül négyszer magasabb érték, mint az ecetsavval kezelt üveglapoknál mérhető.

A 2. kísérletben (5. ábra) az EMD szintén kiugró mértékben stimulálta az *A. viscosus* szubsztrátumhoz való tapadását. A kísérlet kezdetekor azonban a hatás kevésbé volt nyilvánvaló. Ez talán annak volt köszönhető, hogy az átfolyási rendszerben kisebb baktériumsűrűséget alkalmaztunk. 90 perc után az EMD-hez tapadó baktériumok száma fokozatosan emelkedett a kontrollhoz viszonyítva, és 3 óra után maximumot ért el $1,4 \times 10^6$ sejt/cm² értéknél, ami háromszoros emelkedésnek felel meg.

A harmadik kísérletben (6. ábra) már az átfolyás 5. perce után megfigyelhető volt az *A. viscosus* EMD-hez való tapadásának stimulálása. Az EMD gyors emelkedést indukált a megtapadt organizmusok számában az első 45 percben. Ezután a megtapadás fokozottan folytatódott. Az ecetsavas oldalon való megtapadás folyamata hasonló volt, de kevesebb mikroorganizmus tapadt meg. 200 perc után az EMD-hez történt megtapadás kétszer magasabb volt, mint az ecetsavval kezelt felület esetén.

A három kísérletben a különbség statisztikusan szignifikáns volt ($p < 0,05$).

Az eredményekből világosan látszik, hogy az üvegfelüle-



ten bevonatként alkalmazott EMD jelentős *in vitro* stimuláló hatást fejt ki az *A. viscosus* megtapadására. Bár még nem tudjuk, hogy milyen tényezők felelősek ezért a fokozott kezdeti megtapadásért, feltételezzük, hogy az organizmus kölcsönhatásba lép a prolin-maradékokkal, amelyek nagy mennyiségben fordulnak elő a kereskedelemben kapható proteinkeverék amelogenin komponensében. A baktériumok megtapadását gyakran specifikus protein-peptid és lektin-szénhidrát felismerés alapján határozzák meg. Ismeretes, hogy az *A. viscosus* 1-típusú csillóival kötődni tud a prolinban gazdag proteinekhez, csakúgy mint a nyál prolinban gazdag proteinjeihez (PRP) és az I- és II-típusú kollagénekhez.

Az EMD és egyes szájbeli mikroorganizmusok közötti specifikus kölcsönhatás fontos következményekkel járhat a szájüregben levő biofilm összetételére, mivel a plakk ökológiája változhat. Ha az ökológiai eltolódást olyan irányban befolyásolhatjuk, hogy elősegítsük az olyan organizmusok fejlődését, amelyek nem kapcsolatosak a periodontális betegségekkel, az EMD a periodontális állapot javulását eredményezheti. Ez természetesen teljesen független az EMD egyéb előnyös hatásaitól.

4. példa

EMD *in vitro* hatása *Streptococcus mutans* megtapadásának arányára

Bevezetés

Nagyszámú bizonyíték van arra, hogy a plakk-organizmusok a szájbetegségekből, pl. a periodontitisz és a kariesz patogenezisében kiváltó okként szerepelnek. Az íny alatti



plakk-képződés jelenlegi modellje szerint feltételezik, hogy a *Streptococcus* fajok a fogak felületének fő kolonizálói. Ezután a plakk bakteriális növekedéssel és más baktériumok további hozzánövésével fejlődik. Ez a hozzánövés történhet baktérium-baktérium kötődéssel vagy közvetíthetik nyál-molekulák. A plakkok felépülését szintén gyorsíthatja az extracelluláris makromolekulák termelődése. Jelenleg az *S. mutans* tekintik az egyik olyan a biofilmben előforduló fajnak, amely a leginkább figyelemre méltó a kariesszel kapcsolatban. Bár számos Gram-pozitív baktériumról (pl. *S. mutans*) kimutatták, hogy fogmederbeli csontvesztést okoz genotobiotikus állatok esetén, úgy tűnik, hogy a periodontális tasakok kifejlődése ökológiájának nem ezek a mikroorganizmusok a főszereplői. Mindazonáltal a potenciálisan patogén mikroorganizmusoknak alkalmasnak kell lenniük arra, hogy elkerüljék a gazdaszervezet védekező mechanizmusait, és indukálják a gazdaszervezet szöveteinek bontását.

Anyagok

A *Streptococcus mutans* NS törzset Dr. H. van der Mei-től (Materia Technica, University of Groningen) szereztük be. EMDOGAIN-t a Biora cégtől (Malmö, Svédország) szereztük be. RBS detergenst a Fluka cégtől (Fluka Chemie AG, Buchs, Svájc) szereztük be.

Baktériumok növesztése és összegyűjtése

S. mutans véragar lemezekről Todd-Hewitt-levesre oltottunk, és 24 óra hosszat 37 °C-on tenyésztettük. A kapott tenyészetet egy második Todd-Hewitt-levestenyészet beoltására alkalmaztuk, amelyet 16 óra hosszat növesztettünk. A sejteket

centrifugálással (5 perc, 6500xg) összegyűjtöttük, és ionmentes vízzel kétszer mostuk. Ezután a mikroorganizmusokat 20 percig 30 W teljesítménnyel ultrahanggal (Vibra Cell, 375 számú modell, Sonics and Materials, Inc., Danbury, CT, USA) kezeltük a baktériumláncok és -aggregátumok széttörésére. Az ultrahangkezelést megszakításokkal végeztük, miközben jeges vizes fürdővel hűtöttük az elegyet. A sejtszámlálást Bürker-Türker sejtszámláló segítségével végeztük. Végül az *S. mutanst* adhéziós pufferben (2 mM kálium-foszfát, 50 mM kálium-klorid, 1 mM kalcium-klorid, pH=6,8) szuszpendáltuk.

Üveglapok bevonása

Üveglapokat megtisztítottunk oly módon, hogy 5 töm.%-os RBS detergensben ultrahanggal kezeltük, csapvízzel alaposan leöblítettük, metanollal mostuk, és végül desztillált vízzel leöblítettük. Ezzel az eljárással nulla fokú vízérintkezési szöveget kaptunk. 0,01 M koncentrációjú ecetsavban feloldottunk 7,5 mg/ml EMD-t. Az üveglapokat egy teflon-markerrel (DAKO A/S, Glostrup, Dánia) két részre osztottuk. 0,01 M-os ecetsavat vittünk fel az egyik oldalra, és 250 µg EMD-t a másikra. Az üveglapokat 4-6 óra hosszat levegőn szárítottuk.

Átfolyási kísérlet

A kísérletben alkalmazott átfolyási kamra és számítógép rendszer vázlatos képét a 3. ábrán mutatjuk be. A kísérletek előtt a csöveket és az átfolyási kamrát adhéziós pufferrel töltöttük fel, és ügyeltünk arra, hogy a rendszer ne tartalmazzon légbuborékot. A bevont üveglemezek alkották az átfolyási kamra alját. Az átfolyási sebességet 2,5 ml/perc értékre állítottuk be (ami az emberi nyálfolyás átlagos sebességé-



vel összevethető). A baktériumszuszenziót körülbelül 3-4 óra hosszat cirkuláltattuk a rendszerben, majd megszámláltuk a szubsztrátumhoz tapadt baktériumokat. Három független kísérletet folytattunk le. A kísérleteket 3×10^8 sejt/250 ml adhéziós puffer sejtszámmal végeztük. A kísérletek során 10-15 percenként felvételeket készítettünk a kontroll és az EMD-vel bevont lemezek 6 előre meghatározott helyéről. A párhuzamos átfolyási kamra magassága 0,6 mm volt.

Adatok elemzés

A felvételeken megszámláltuk a megtapadt sejteket, az adatokat sejtszám/cm² értékekre átszámoltuk. Minden kísérletben ezt az értéket alkalmaztuk a statisztikai elemzésben (Student-féle T-teszt páros megfigyelésekhez, n kísérlet esetén).

Eredmények

Az EMD mindhárom kísérletben gátolta az *S. mutans* megtapadásának sebességét (7., 8. 9. ábra; $p < 0,05$). A gátlás mintegy 40-70%-os volt az ecetsavas kontrollhoz képest.

Az első kísérlet (7. ábra) azt mutatta, hogy már 10 perc átfolytatás után csökkenés volt megfigyelhető az *S. mutans* EMD-vel bevont üvegfelületen megtapadt sejtjeinek számában. 3 óra után a megtapadásban 60%-os gátlás volt megfigyelhető a kontrollhoz viszonyítva.

A második kísérletben (8. ábra) az EMP 1,5 órai átfolytatás után kezdte gátolni az *S. mutans* megtapadását. Az *S. mutans* EMD-hez tapadt sejtszáma 40 perces átfolytatás után $0,5 \times 10^6$ sejt/cm² értéknél elért egy platót. 3,5 óra után a sejtszám körülbelül 25% volt a kontrollhoz képest.



A harmadik kísérletben (9. ábra) már az átfolytatás kezdetétől gátlás volt megfigyelhető az EMD hatására a megtapadt *S. mutans* sejtszámban. Az 1. kísérlethez hasonlóan 3 órai átfolytatás után 60%-os gátlás volt megfigyelhető a kontroll értékekhez képest.

Ez a vizsgálat azt mutatta, hogy az EMD szignifikáns gátlóhatást fejt ki az *S. mutans* üvegfelületen való megtapadására. A gátlás lehetséges magyarázata az, hogy az EMD keverékben hidrofób vegyületek vannak jelen. A keverékben nagy mennyiségben jelen levő proteinek egyike az amelogenin, amely egy savas hidrofil C-terminális szekvencia mellett egy 100-300 maradékból álló, prolinban, leucinban, metioninban és glutaminban gazdag hidrofób magot tartalmaz. Saito és munkatársai úgy találták [Arch. Oral Biol. 42:539-545 (1997)], hogy különböző *S. mutans* törzsek immobilizált hidrofób proteinekhez (OAI) való megtapadása gátlódott. A szerzők a sejt-felületen levő mikroorganizmusok negatív töltésének tulajdonították a hatást (ami *S. mutans* esetén így van). Más felületi tulajdonságok szintén szerepet játszhatnak a szubsztráton való megtapadásban. Az *S. mutans* I/II felületi antigént tartalmaz, amelynek N-terminális része különösen gazdag alaninban, és egymás utáni ismétlődéseket foglal magában. Ez a régió előre láthatólag α -hélikus, spirál spirálisa konformációval rendelkezik, és magyarázatot adhat a felületi hidrofobitásra, ami az I/II antigén expressziójával kapcsolatos.

5. példaEMD hatása egyes periopatogének növekedésére

Prevotella intermedia és *Porphyromonas gingivalis* törzseket alkalmas edényekben 10-16 óra hosszat, 37 °C-on, 0,5 mg/l K-vitaminnal és 5 mg/l heminnel kiegészített tioglikolát-levesben, GasPakPlus fedő segítségével létrehozott aerob atmoszférában előtenyésztettünk. Amikor a tenyészetek elérték az $OD_{600} = 0,1-0,2$ értéket, ami milliliterenként 10^6-10^7 cfu-nak (kolóniaképző egység) felel meg, 100 µl alikvotokat vettünk ki, és a baktériumot centrifugálással kicsaptuk. A baktériumokat 100 µl frissen készített humán szérum/steril konyhasóoldat keverékben újraszuszpendáltuk, és a 10^5-10^6 sejtet tartalmazó szuszpenziókat 1,5 ml-es steril Eppendorf-csövekbe vittük át, és kevertük (i) 100 µl EMD-készítménnyel (3 mg EMD 0,1 ml PGA-ban), (ii) 10 µl PGA vivőanyaggal, illetve (iii) növesztési kontrollként alkalmazott 100 µl szérum/NaCl oldat keverékkel. 0, 3, 6 és 24 óra múlva 10 µl alikvotokat vettünk ki a növekedés mérésére. Az alikvotokból 0,9 töm.%-os NaCl oldattal sorozathígítást készítettünk, és a hígítási lépésekből 10 µl-t Schaedler-agarra szellesztettünk. A tenyésztést az előtenyésztésnél alkalmazott körülmények között végeztük. Az agar lemezeket 3-4 napig inkubáltuk, és a cfu és sejtsűrűség (cfu/ml) értékeket azután számoltuk. A kísérleteket hatszor ismételtük.

Az eredményeket az alábbi táblázatokban adjuk meg (cfu/ml értékek a 0 időpontban mért koncentráció százalékában).

1. Kontroll tenyészetek különböző időpontokban

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

2. Tenyészetek PGA vivőanyag jelenlétében különböző időpontokban

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

3. Tenyészetek EMD jelenlétében különböző időpontokban

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

A tenyészeteket jelentősen gátolta az EMD az önmagában alkalmazott vivőanyag és az EMD adagolása nélküli kontrollhoz viszonyítva.

6. példa

EMDOGAIN^(R) hatásának vizsgálata a lágy szövetek sebgyógyulásának fokozására periodontális sebészeti beavatkozás után

A kísérlet célja annak bemutatása, hogy a zománc mátrix származékok és/vagy zománc mátrix proteinek javítják a lágy szövetek periodontális sebészeti beavatkozások utáni gyógyulását.

50-nél több makákó majom fog oldalsó periodontiumán kísérleti jelleggel hiányokat hoztunk létre a fog közepének, a periodontális membránnak és az oldalsó fogmedercsont nyakicsúcsi irányban mintegy 5 mm távolságban történő eltávolításával egy fogászati fúró segítségével. A kísérleti hiányokra ezután semmit sem (kontroll), vagy pedig zománc mátrix származékot (EMDOGAIN, nem rekonstituált liofilizált por vagy rekonstituált kompozíció formájában) alkalmaztunk. A proteinek koncentrációja a rekonstituált kompozícióban körülbelül 5-30 mg/ml volt, és az alkalmazott mennyiség hiányonként körülbelül 0,1-0,2 ml volt.

A sebgyógyulást vizuálisan értékeltük ki a következő 8 hét folyamán. Azon hiányokban, amelyekre EMDOGAIN-t alkalmaztunk, jó gyógyulás (pír és duzzanat nélkül) és elhanyagolható plakk 2 hét után, amikor a csontvarratot eltávolítottuk, jó gyógyulás és csekély gingivitisz 5 hét után, és komplikációmentes gyógyulás volt megfigyelhető 8 hét után, amikor a kísérletet befejeztük. Ezzel szemben a kontroll hiányok esetén gyulladás visszahúzódással és bőséges mennyiségű plakk-képződés 2 hét után, súlyos visszahúzódással és gingivitisz volt megfigyelhető 5 hét és 8 hét után.

7. példa

A zománc mátrix származékok és a zománc mátrix proteinek sebgyógyulásra gyakorolt hatásának vizsgálata

A kísérlet célja annak bemutatása, hogy a zománc mátrix származékok és zománc mátrix proteinek elősegítik a sebek periodontális sebészeti beavatkozások utáni gyógyulását.

55 beteget, akiknek periodontális sebészeti beavatko-

zásra volt szükségük, két csoportba osztottunk, az egyik csoport betegeit (20 egyént) szokásos, módosított Widman-lebeny technikával kezeltük, a másik csoport betegeit (35 egyént) ugyanúgy, de EMDOGAIN-t is kaptak (30 mg/ml, körülbelül 0,3 ml foganként). A sebészeti beavatkozáskor egyik beteg sem kapott antibiotikumot, viszont azt az utasítást kapták, hogy naponta végezzenek aszeptikus (klórhexidines) szájöblítést.

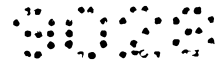
A varratok eltávolításakor (1-3 héttel a sebészeti beavatkozás után) kikérdeztük a betegeket. Míg a kontroll betegek közül 3 (15%) esetén olyan műtét utáni esemény volt, amely antibiotikumos kezelést igényelt, az EMDOGAIN-nal kezelt betegek közül ilyen kezelésre csak egynek (3%) volt szüksége.

8. példa

A zománc mátrix származékok és a zománc mátrix proteinek sebgyógyulásra gyakorolt hatásának vizsgálata foghúzás után

A kísérlet célja a zománc mátrix proteinek és zománc mátrix származékok sebgyógyulásra gyakorolt hatásának bemutatása a 3. őrlőfog kihúzása után.

30 éves vagy ennél idősebb, eltávolítandó szimmetrikus impaktált vagy szemiimpaktált alsó harmadik őrlőfoggal rendelkező betegek egyik ilyen fogát klasszikus, az oszteotómia elvégzéséhez egy vertikális lebeny felemelését magában foglaló módszerrel kihúztuk, míg a másikat kihúztuk, és a fogüreget varratkészítés előtt EMDOGAIN-nel töltöttük fel. A betegek a műtét előtt 1-2 órával antibiotikumot (3 g ampicillint vagy 1 g eritromicint) és a műtét után ibuprofent (3x600 mg) kaptak. Ezenkívül azt az utasítást kapták, hogy 4



hétig naponta kétszer 10 ml klórhexidinnel (0,1%) öblögesse-nek.

A műtét után két héttel eltávolítottuk a varratokat. Az EMDOGAIN-nal kezelt és a kontroll helyeket mind a betegek, mind a fogorvos kiértékelte. Az egyik műtéti centrumban 9 betegnél alkalmaztunk mindkét oldali foghúzást EMDOGAIN-os kezeléssel és anélkül. Egy betegnél volt enyhe irritáció mindkét oldalon, egy másik beteg súlyos fájdalmat észlelt a kontroll oldalon, de nem volt problémája az EMDOGAIN-nal kezelt oldalon. Egy másik műtéti centrumban 6 beteg közül három észlelt fájdalmat a kontroll oldalon. Végül egy harmadik műtéti centrumban egy betegnél fordul elő súlyos fogmedergyulladás a kontroll oldalon, míg az EMDOGAIN-nal kezelt oldal minden probléma nélkül gyógyult. Egy másik beteg enyhe irritációt észlelt a varratoktól mindkét oldalon, de csak a kontroll oldal volt gyulladt és fájdalmas, és kívánt ismételt konyhasó-oldatos kimosást és fájdalomcsillapítók bevitelét.

Ezek a klinikai eredmények arra utalnak, hogy a bölcsességfog kihúzása utáni fogüreg EMDOGAIN-es kezelése elősegíti a gyógyulást, és csökkenti az egyébként gyakran fájdalmas duzzanatot.

9. példa

A zománc mátrix származékok és a zománc mátrix proteinek száraz fogmeder tünet gyógyulására gyakorolt hatásának vizsgálata

A kísérlet célja a zománc mátrix proteinek és zománc mátrix származékok száraz fogmeder tünet gyógyulására gyakorolt hatásának bemutatása.

Egy begyulladt 35 radix relictá eltávolítása után egy 70 éves férfi beteg foghúzási üregével kapcsolatban súlyos fájdalomtól és duzzadástól szenvedett. A fogorvos vizsgálatkor megállapította, hogy száraz fogmeder állapot fejlődött ki, amelyben a kezdeti koagulum dezintegrálódott, és a fogüreg falát képező csont elhalt. A szomszédos csont és lágy szövet begyulladt.

A beteg szívelégtelenségben szenvedett, és Marevan antikoaguláns kezelést kapott. Állapota csökkent perifériás vérkeringést eredményezett. Ezenkívül naponta néhány cigaretta-t szívt.

A fogmedergyulladás hagyományos módon kezeltük, a nekrotikus csont eltávolításával és új vérzés indukálásával. A fogínyt szintén megmozgattuk, és varrattal zártuk a fogüregget. A beteget ezután penicillinnel (hét napig 2 tabletta 660 mg apocillin reggel és este) kezeltük a fertőzés leküzdésére, és naponta kétszer kellett klórhexidin oldattal szájöblítést végeznie. Öt nap múlva, az antibiotikum szedésének befejezése után a beteg még mindig súlyos fájdalmakkal jelentkezett. A műtési terület megsemmisítése és tapintása azt mutatta, hogy a fogmedergyulladás továbbra is fennállt, és több nekrotikus csont volt jelen. A röntgenfelvétel azt mutatta, hogy a csont bomlása és nekrozisa folytatódott a fogüreg állkapocs felőli részén. A műtési területet még egyszer kitisztítottuk, és a kialakult csontléziókat EMDOGAIN-nal (30 mg/ml, max. 0,5 ml) töltöttük, és új varrattal zártuk a fogüregget. További más kezelést nem alkalmaztunk, de utasítottuk a beteget, hogy klórhexidin oldattal továbbra is öblögessen. Két nappal ké-

sőbb a beteg beszámolt arról, hogy mind a fájdalom, mind a duzzanat elmúlt. Az EMDOGAIN-os kezelés után egy héttel eltávolítottuk a varratokat, és a klinikai megfigyelés azt mutatta, hogy a seb jól gyógyult nekrotikus szövetek vagy gyulladás jele nélkül, és a seb területét érintetlen fogíny fedte, pír és duzzanat nélkül. Tapintásra és próbára vérzés vagy fájdalom nem jelentkezett. Kellemetlen szag vagy íz vagy váladék nem volt észlelhető. A beteg nem számolt be fájdalomról vagy más tünetről.

10. példa

A zománc mátrix származékok és a zománc mátrix proteinek megelőző hatásának vizsgálata száraz fogmeder tünet esetén

A kísérlet célja a zománc mátrix származékok és a zománc mátrix proteinek megelőző hatásának bemutatása száraz fogmeder tünet esetén.

Egy 82 éves nőbeteg 44 számú fogán hosszanti törés volt. Ez a fog szolgált pillérként egy a 35-46 fogakat összekötő hídhoz, és néhány évvel korábban endodontális kezelésben részesült. Klinikailag a fogat körülvevő fogíny környezet gyulladt volt, és a fog csúcsáig terjedő teljes távolságon, a nyelv felőli oldalon egy ínytasak volt található. A röntgenfelvételen a 44 számú fog súlyos lokális periodontitise volt megfigyelhető.

A beteg szájhigiéniája jó volt, de az (antikoaguláns) Marevannal kezelt szívelégtelensége miatt az ínyn könnyen vérzést lehetett előidézni. Hat hónappal korábban a beteg 35 számú fogát súlyos periodontitisz miatt műtéti el kellett távolítani. Az operáció után hosszú ideig száraz fogmeder tü-



nettel szenvedett. Nagyon aggódott amiatt, hogy a 44 számú fog eltávolítása nem fog-e ugyanolyan műtét utáni komplikációkkal járni. A fogorvos informálta, hogy korának, a Marevan-kezelésnek, a fertőzött foggyökérnek és az ínytasaknak a kombinációja nagymértékben megnöveli a műtét utáni komplikációk, például a fogmedergyulladás kockázatát, azonban nincs más megoldás, mint a gyökérdarabok sebészeti eltávolítása.

A beteg beleegyezett, hogy a 44 számú fogát eltávolítsuk, majd kísérletképpen EMDOGAIN-kezelést kapott a száraz fogmeder tünet kialakulásának megelőzésére. A beteget érzéstelenítettük, és az arccsont eltávolításával lehetővé tettük, hogy a gyökértöredék eltávolítható legyen anélkül, hogy a hídát levegyük. Eltávolítás után az üres fogüreget mechanikusan kitisztítottuk, és EMDOGAIN-nal (30 mg/ml, legfeljebb 0,5 ml) feltöltöttük, és a lebenyt egy varrattal visszaillesztettük. A beteg (telefonon) az operációs terület elhúzódó vérzéséről (a Marevan kezelést nem állítottuk le a műtét előtt), azonban más tünetről nem számolt be. Amikor a műtét után öt nappal eltávolítottuk a varratot, megállapítottuk, hogy az operált területen a lágy szövet teljesen meggyógyult. A beteg az operáció után nem számolt be semmilyen tünetről, például fájdalomról vagy duzzanatról, és általában nagyon meg volt elégedve a kezeléssel.



11. példa

A zománc mátrix származékok és a zománc mátrix proteinek hatásának vizsgálata baleseti sérülések utáni komplikációk esetén

A kísérlet célja a zománc proteinek és zománc mátrix származékok hatásának vizsgálata betegek baleseti sérülések utáni komplikációinak gyógyulására.

Egy baleset után egy betegnek az érintett felső fogait el kellett látni egy elsősegélynyújtó klinikán. A fogorvos úgy találta, hogy a 11 és 21 számú fogak élettelenek, a 12 és 22 számú fogak I. és II. fokú mesio-incisalis törést szenvedtek. A körülöttük levő íny súlyosan gyulladt volt és gyengén tapadt a fogak felületéhez. A betegnek fájdalmai voltak, és zsibbadásra, duzzadásra, kellemetlen ízre és szagra panaszkodott. Ezenkívül a periodontális ligamentum sérülése volt nyilvánvaló a 11 és 21 számú fogcsúcsok területén. Mindkét centrális bevágást kitisztítottuk, és a gyökeret feltöltöttük frissen készített Ca(OH)_2 -vel.

4 hét múlva úgy találtuk, hogy a sebgyógyulás nem elégséges. Az állapot krónikus gyulladásba ment át, és a fogak elvesztettnek voltak tekinthetők. Az ilyen állapotok szokásos kezelését a négy törött fog kihúzése és híddal vagy implantátummal való pótlás jelentette volna. A beteg azonban erősen tiltakozott egy ilyen kezelés ellen, és a fogak megmentésének utolsó kísérleteképpen mind a négy érintett fogon (11, 12, 21, 22) fogíny-lebény operációt hajtottunk végre. Két fiola EMDOGAIN-t alkalmaztunk (60 mg 3 ml-ben). Foganként legfeljebb 0,2 ml EMDOGAIN-t (30 mg/ml) adagoltunk egy fecs-



kendővel, mielőtt a lebenyeket 7 öltéssel visszavarrtuk. Az operáció után 5 nappal a varratok közül négyet eltávolítottunk. Ezután jelentős javulás történt a szubjektív és a klinikai állapotban. A beteg tovább már nem panaszkodott fájdalomra, a zsibbadásérzés elmúlt, és az érintett területről nem érzett kellemetlen ízt vagy szagot. 2 hét múlva eltávolítottuk a többi varratot is. A fogíny nem volt gyulladt, és a betegnek nem voltak panaszai. Az íny egészséges volt, és nem volt a gyulladásnak jele; szorosan tapadt a foghoz és/vagy állkapocscsonthoz, színe rózsaszín volt (nem kifejezetten piros, mint a gyulladásos területeken megfigyelhető) és normális (nem duzzadt) fogközi szemölcsökkel rendelkezett. Ezenkívül jelentős javulás volt megfigyelhető a fogak érintett területén a periodontális ligamentum újramegjelenése és a röntgenvizsgálatban megjelenített új állkapocscsont képződése formájában.

12. példa

Baleseti sebek gyógyulása a szomszédos fogakon és idegeken

Esetleírás:

Egy 32 éves nőbetegnek súlyos fogkorona körüli gyulladása volt a bal alsó bölcsességfoga (38) körül. A fogászati klinikán a fogat részben eltávolították, a fogcsúcs az orvos által okozott gyökértörés következtében az állkapocscsontban maradt. A beteg a következő napon fájdalommal jelentkezett a speciális szájsebészeten a gyökértöréredék sebészeti eltávolítására.

A műtét után két nappal a beteg szokásos fogorvosánál jelentkezett ellenőrzésre. Bal oldala meg volt duzzadva, és a



baloldali alsóállkapcsi idege tartósan és teljesen blokkolva volt. A klinikai vizsgálat és a röntgenfénykép azt mutatta, hogy a műtét során a fúrás az állkapocscsontot, a 37 számú fog távolabbi gyökerének csúcsi harmadát és az alsóállkapcsi idegcsatornát súlyosan károsította (lásd az 1.A ábra röntgenképét). A tasak mélysége 37 számú fogon 25 mm volt a fog tejétől, ami túl volt a disztális gyökér csúcsán.

Annak érdekében, hogy a 37 számú fognál az elvesztett periodontális ligamentumot regeneráljuk, és megindítsuk a csont és az ideg gyógyulását, az operációs sebet felnyitottuk, és óvatosan kitisztítottuk. A kitett csont konyhasóoldattal történt forgácsmentesítése után a 37 számú fog disztális gyökerének felületét és az alsóállkapcsi ideget EMDOGAIN-nal fedtük (30 mg/ml, főlegben, kb. 1 ml mennyiségben alkalmazva), és a sebet három varrattal összeöltöttük. A beteget utasítottuk, hogy a következő öt napon naponta kétszer öblögessen klorhexidin-oldattal (Corsodyl), és öt napig penicillinnel (Ampicillin, 660 mg x 4) megelőző kezelést kezdtünk.

Tíz nap múlva a beteg visszajött ellenőrzésre és a varratok eltávolítására. Ekkorra a duzzanat elmúlt, és a lágy szövet jól gyógyult. Azonban az alsóállkapcsi ideg teljes érzéstelensége továbbra is fennmaradt, és a beteget informáltuk arról, hogy a szétzúzott ideggel kapcsolatos kilátások teljesen bizonytalanok. Az érzéstelenség lehetetlenné tette, hogy ellenőrizzük a 37 számú fog életképességét. Normális esetben egy ilyen gyökérkárosodás a fogbél és fog elhalásához vezet. Ilyen komplikáció megelőzésére endodontális kezelést javasol-



tunk. Annak érdekében azonban, hogy lássuk, hogy a kísérleti kezelés elősegíti-e a periodontális ligamentum gyógyulását, a beteg beleegyezett, hogy a fogat egyelőre ne kezeljük. A beteget havonta történő ellenőrzésre visszarendeltük.

Két hónappal a fenti ellenőrzés után a beteg helyi hiperérzékenységet észlelt az alsó ajka bal oldalán, ami az ideg gyulladásának a jele. A 37-38 számú fogak területén a lágy szövet sebhely nélkül teljesen meggyógyult. A húzási fogüregben a röntgenvizsgálat új csont képződését mutatta. A 37 számú fog és a környező szövet még mindig érzéketlen volt.

A kezelés után négy hónappal az érzéketlenség elmúlt, és a 37 számú fog életképesnek, azonban túlérzékenynek bizonyult, mind hőre, mind elektromos tesztre. A röntgenvizsgálat azt mutatta, hogy a fogüreg csonttal való feltöltődése szignifikáns volt, és a 37 számú fog disztális gyökerén a periodontális regenerálódás jelei voltak megfigyelhetők.

Az EMDOGAIN-nal történt kezdeti kezelés után öt hónappal a 37 számú fog életképesnek bizonyult. Ekkor a funkcionális periodontális ligamentum teljes regenerálódása volt megfigyelhető röntgenvizsgálattal (1.B ábra), és a csonthiányt a húzási fogüreget normális kinézetű, újonnan képződött csont töltötte ki. Ankylosis jelei nem voltak megfigyelhetők. A tasak mélysége a 37 számú fogon most csak 10 mm volt, ami körülbelül 1 mm-rel a cement-zománc csatlakozás alatt volt. Ezen ellenőrzés után a beteget teljesen gyógyultnak tekintettük, és a szokásos egyévenkénti ellenőrzésre rendeltük vissza.



Kommentár:

A bölcsességfog sebészeti eltávolításakor a szomszédos fogak és idegek sérülésének teljes és gyors gyógyulása ritka. A fentiekhez hasonló súlyos komplikációk rendszerint a károsodott fog teljes eltávolításával, vagy legalábbis a fogbél endodontális eltávolításával és gyökértöméssel végződnek, amit ankylosissal járó csontgyógyulás követ. Egy szétzúzott ideg gyógyulása normálisan 8-12 hónapba telik, ha egyáltalán meggyógyul, és gyakran néhány évig megmarad bizonyos területeken a zsibbadásérzés. A fent ismertetett gyors és jó gyógyulás nagyon szokatlan, és az EMDOGAIN sebgyógyító képességének jeleként tekintendő.

Röntgenvizsgálat:

A: A beteg vizsgálata két nappal a 38 számú fog eltávolítása után. Megfigyelhető a 37 számú fog disztális részének nagy hiánya és az alsóállkapcsi idegcsatorna érintettsége. A műtét során a 37 számú fognál az állkapocscsontnak a foghoz közeli részét is el kellett távolítani.

B: A beteg vizsgálata öt hónappal a műtét után. Megfigyelhető a komplett funkcionális periodontális ligamentum (lamina dura) jele a 37 számú fog gyökerének disztális részén található hiányban. Ankylosisnak nincs jele. Az állkapcsi idegcsatorna vonala látható, és a húzási fogüreg csonttal teljesen ki van töltve. Szintén megfigyelhető a foghoz közeli állkapocscsont-képződés a 37 számú fog körül.



13. példa

A zománc mátrix származékok és a zománc mátrix proteinek hatásának vizsgálata lábszárfekély gyógyulására

1. beteg:

A 1926-ban született férfibeteg ismételt trombózist kapott rossz trombózis utáni tünetekkel és visszatérő lábszárfekéllyel. Antikoaguláns kumarinszármazékkal kapott kezelést szisztémásan, és a fekélyekre helyileg Crupodex (dextrán monomer, BIOGAL) és 3%-os bórsavoldat kezelést kapott.

Az EMDOGAIN-nel végzett kezelés kezdetekor 5 x 4 cm felületű és 0,5 mm mély ovális fekélye volt, amely nagyon rossz epitelizálódással járó granulációs állapotban volt.

A sebet 3%-os H_2O_2 -vel fertőtlenítettük, 500 µl EMDOGAIN-t cseppentettünk rá, és azt egy steril pálcával eloszlattuk. Az EMDOGAIN-t 10 percig hagytuk a levegőn száradni, majd 10%-os Povidon-jód kenőccsel átítatott Rayon anyagú Inadine (Johnson & Johnson) kötszerrel fedtük.

Öt nap múlva a fekély középső részén epitelizálódás kezdődött, és a fekély 1,8 x 2,2 cm méretűre csökkent, és mellékreakció (gyulladás) nem volt. Ekkor EMDOGAIN-t nem alkalmaztunk. 12 napig tartó további epitelizálódás a középső részen és új epitelizálódás a szélső részen következett be mintegy 2 x 2 cm területen. A fekélynek majdnem a fele meggyógyult. Ekkor 400 µl EMDOGAIN-t adagoltunk.

19 nap múlva a fekély középső és szélső részein további epitelizálódás következett be, azonban a távolabbi részen nem, ahol a fekély nagyon mély volt (körülbelül 1 mm). A fekélynek több mint a fele meggyógyult. Ekkor 300 µl EMDOGAIN-t



alkalmaztunk. Az EMDOGAIN-kezelés kezdete óta, ellentétben az azt megelőző időszakkal, a beteg nem érzett fájdalmat a fekély területén. Ezután hetente egyszer alkalmaztunk (200 µl) EMDOGAIN-t a 40. napig, és a fekélyt teljesen gyógyultnak tekintettük 47 nap után.

2. beteg:

Az 1949-ben született nőbetegnek visszeres csomói, krónikus vénás elégtelensége és visszatérő lábszárfekélye volt. Allergiája volt több gyógyszerkészítménnyel (hatóanyag gyógyszer) szemben, továbbá vénás ekcémában szenvedett. Előzőleg helyileg Otosporin-csepp (polimixin-B-szulfát + neomicin-szulfát + hidrokortizon) kezelést és hidrokortizonos szorítókötést kapott.

Az EMDOGAIN-kezelés megkezdésekor a lábszárfekélye 1 cm átmérőjű és 2 mm mély volt. 300 µl EMDOGAIN-t adagoltunk.

5 nap múlva az epitelizálódás 2 mm volt a seb körül, és nem volt mellékhatás (gyulladás). Ekkor EMDOGAIN-t nem alkalmaztunk. 12 nap múlva a fekély átmérője mintegy 2 mm-re csökkent. Ekkor 100 µl EMDOGAIN-t alkalmaztunk.

19 nap múlva a fekély még mindig 2 mm átmérőjű volt, de az alja szépen granulálódott, és a fekély nem volt olyan mély (körülbelül 0,2 mm). Ekkor 100 µl EMDOGAIN-t adagoltunk.

A betegnek a másik lábán körülbelül 0,3 x 1 cm méretű fekélye volt, erre 200 µl EMDOGAIN-t adagoltunk.

7 nap múlva új epitelizálódás és a fekély alján szép granulálódás volt megfigyelhető, és a méret 0,2 x 0,5 cm-re csökkent.

Ezután a 40. napig hetente egyszer 100 µl EMDOGAIN-t

adagoltunk mindkét fekélyre, a fekélyek 47 nap után teljesen gyógyultnak voltak tekinthetők. Az EMDOGAIN-nal szemben allergiás reakció nem volt megfigyelhető.

Ugyanazon a lábszáron egy másik, 0,5 x 0,3 cm méretű fekély képződött, amelyre 100 µl EMDOGAIN-t alkalmaztunk.

3. beteg:

Az 1929-ben született nőbeteg orbánc után mélyvénás trombózist kapott, és az EMDOGAIN-kezelés megkezdésekor nagyon nagy, körülbelül 15 x 19 cm méretű lábszárfekélye volt mélyülő állapotban, ami különböző kezelések után majdnem reménytelennek tűnt. A felső szélétől körülbelül 3 cm-re 700 µl EMDOGAIN-t alkalmaztunk.

7 nap után epitelizálódás nem volt megfigyelhető, de a kezelt terület már nem volt transzparens, és szétszórt kis granulációs területek jelentek meg, és a területen nem volt fájdalom és nem rosszabbodott. 700 µl EMDOGAIN-t adagoltunk.

4 hét múlva a fekély távolabbi, EMDOGAIN-nel nem kezelt részén fertőzés fejlődött ki, amelyről feltételeztük, hogy *Pseudomonas* okozta. Ekkor 700 µl EMDOGAIN-t alkalmaztunk. A fertőzés 7 nap múlva eltűnt.

4. beteg:

Az 1947-ben született nőbetegnek orbánc után felületi vénagyulladásos visszerei voltak, és az EMDOGAIN-kezelés megkezdésekor körülbelül 2 x 0,8 cm méretű, tiszta, de granulációt nem mutató aljú lábszárfekélye volt. 300 µl EMDOGAIN-t alkalmaztunk.

7 nap után a fekély mérete körülbelül 0,7 x 0,3 cm méretűre csökkent, és a fekély körül epitelizálódás, valamint

az alján granuláció volt megfigyelhető. Ekkor 200 µl EMDOGAIN-t, majd öt héten át hetente egyszer 100 µl EMDOGAIN-t alkalmaztunk. Öt hét után a fekély teljesen gyógyultnak volt tekinthető.

14. példa

EMDOGAIN alkalmazása adjuvánsként sima felületi helyek nem-sebészeti periodontális kezelésére

A kísérlet célja annak kiértékelése, hogy az EMDOGAIN elősegít-e a nem-sebészeti periodontális kezelések gyógyulását. A kísérlet közelebbi célja a sima felületi helyekre gyakorolt hatás kiértékelése.

A vizsgálatot 6 hónapig végeztük intra-individuális longitudinális teszt formájában. A vizsgálat kétszeresen vak, osztott száj, placeboval ellenőrzött, véletlenszerű elrendezésben történt.

14 beteget vontunk be vizsgálatba, akik a Göteborgi Egyetem Periodontológiai osztályának periodontológiai klinikáján enyhén előrehaladott periodontológiai betegséggel jelentkeztek.

A kísérletbe vonás feltételei:

- legalább 3 sima fogfelületi terület mindkét ellentétes oldali negyedben, ≥ 5 mm-es próba tasak mélységgel és legalább egy pár terület ≥ 6 mm-es próba tasak mélységgel;

- a kiválasztott fogaknak életképes fogbéllel kell rendelkeznie termo- vagy elektromos stimulálással meghatározva, vagy pedig ha gyökércsatorna-kezelés alatt áll, tünetmentes legyen technikai jelek nélkül.

Az alapvizsgálat elvégzése után a betegeknek esetismer-



tetést tartottunk, és elláttuk őket megfelelő szupragingi-
vális plack-szabályozó eszközzel. Elvégeztük a fokozat-beso-
rolást és a gyökérfelmérést.

Amikor a tasakok vérzése megszűnt, a tasakokra 2 percig
24%-os EDTA-gélt (Biora AB, Svédország) vittünk fel. A tasa-
kokat ezután gondosan átöblítettük konyhasóoldattal, majd
felvittük a kísérleti (EMDOGAIN) vagy a kontroll (PGA gél)
anyagot.

Kiértékelés:

Az alapvizsgálatban, majd az 1., 2., 3., 8. és 24. hé-
ten végzett vizsgálatban a következő adatokat vettük fel:

1. Szájhigiéniai állapot - plakkok jelenléte/hiánya
2. Fogíny állapota - (Gingival Index; Löe 1967)
3. Próba tasakok mélysége
4. Tapadás mértéke
5. Vérzés szondázásra - jelenlét/hiány (15 másodperc)
6. Fogak túlérzékenysége - légfúvásos stimulálásra
(igen/nem)
7. Diszkomfort érzés mértéke - az 1., 2. és 3. héten
végzett vizsgálatkor egy 10 cm-es vizuális analóg
skála (VAS) segítségével felvéve.

PLAKK (standard deviáció)



	Kontroll	EMDOGAIN
Alapérték	0,10 (0,30)	0,19 (0,40)
1. hét	0,08 (0,27)	0,05 (0,22)
2. hét	0,05 (0,22)	0,02 (0,15)
3. hét	0,05 (0,22)	0,10 (0,30)
6. hét	0,14 (0,35)	0,19 (0,40)
26. hét	0,12 (0,33)	0,07 (0,34)

FOGÍNY ÁLLAPOTA (standard deviáció)

	Kontroll	EMDOGAIN
Alapérték	1,40 (0,50)	1,40 (0,50)
1. hét	1,00 (0,32)	0,87 (0,52)
2. hét	0,83 (0,44)	0,74 (0,45)
3. hét	0,69 (0,60)	0,60 (0,50)
6. hét	0,67 (0,53)	0,64 (0,58)
26. hét	0,62 (0,54)	0,62 (0,49)

VÉRZÉS SZONDÁZÁSRA (%)

	Kontroll	EMDOGAIN
Alapérték	100	100
1. hét	67	44
2. hét	43	33
3. hét	29	26
6. hét	33	31
26. hét	19	24



BETEG SZUBJEKTÍV ÉRTÉKELÉSE; VAS érték

1. hét

VAS érték	Kontroll	EMDOGAIN
0-20	8%	0%
21-40	15%	8%
41-60	31%	30%
61-80	8%	0%
81-100	38%	62%

3. hét

VAS érték	Kontroll	EMDOGAIN
0-20	14%	7%
21-40	0%	7%
41-60	3%	0%
61-80	21%	22%
81-100	57%	64%

Következtetések:

A betegek kevesebb operáció utáni problémával rendelkeztek, kevesebb vérzés és kevesebb plakk mutatkozott, valamint jobb volt gingivális index érték. Ezek az eredmények igazolják az EMDOGAIN sebgyógyító hatását.



15. példa

Kísérleti sebgyógyulási vizsgálat sertéseknél

Bevezetés

Cél:

A kísérlet célja osztott vastagságú sebek gyógyulási folyamatának kiértékelése sertéseknél, valamint az EMD ilyen sebekre gyakorolt hatásának vizsgálata.

Az állatfaj kiválasztásának oka:

Tesztmodellként azért választottunk sertéseket, mivel már igazolták, hogy ez a faj a humán sebek gyógyulásának jó modellje.

Anyagok és módszerek

Állatok:

A vizsgálatot négy nőstény SPF sertésen (Yorkshire és Duroc dániai keresztezése) végeztük. Az akklimatizálódási időszak kezdetén az állatok testtömege körülbelül 35 kg volt.

Egy hétig tartó akklimatizálódás alatt az állatokat naponta megfigyeltük, a gyenge állapotban levő állatok kizárása érdekében. A megfigyeléseket feljegyeztük.

Tartási körülmények:

A vizsgálatot szűrt levegővel ellátott, 21 ± 3 °C hőmérsékletű, $55 \pm 15\%$ relatív légnedvességű teremben, óránként tízszer végzett légcserével végeztük. A megvilágítási ciklusok: 12 óra világos, 12 óra sötét. A megvilágított időszak 6 és 18 óra között volt.

Az állatokat egyedileg rekeszekben tartottuk.



Almozás:

Alomként puhafa fűrészport ("LIGNOCELL H 3/4"; Hahn & Co., D-24796, Bredenbek-Kronsborg) alkalmaztunk. Az esetleges szennyeződésekre nézve rendszeres elemzést végeztünk.

Takarmányozás:

A takarmányozás kereskedelemben kapható sertéstakarmánnyal ("Altromin 9033", Chr. Petersen A/S, DK-4100, Ringsted) történt, naponta kétszer körülbelül 800 g. A fő tápkomponensekre és az esetleges szennyeződésekre nézve rendszeres elemzést végeztünk.

Ivóvízellátás:

Naponta kétszer házi minőségű ivóvizet kínáltunk. Az esetleges szennyeződésekre nézve rendszeres elemzést végeztünk.

Sebek:

Sebeket hoztunk létre az 1. napon. Az állatokat 40 mg/ml azaperonnal 1 ml/10 kg dózisban (Strasnil Vet., Janssen, Belgium) és 1 mg/ml atropinnal 0,5 ml/10 kg dózisban (Atropin, DAK, Dánia) egyetlen i.v. injekció formájában, majd körülbelül 2 ml 50 mg /ml metomidáttal (Hypnodil, Janssen, Belgium) érzéstelenítettük.

Az állatok hátán mindkét oldalon egy területet leborotváltunk, szappannal és vízzel megmostuk, fertőtlenítettük 70%-os etanollal, amelyet steril konyhasóoldattal leöblítettük, majd steril gézzel szárazra töröltük.

A preparált területeken nyolc sebet (25 x 25 x 0,4 mm) hoztunk létre, a gerinc mindkét oldalán négyet-négyet, egy ACCU-Dermatom (GA 630, Aesculap) segítségével. A sebeket 1-



től (a fejhez legközelebbi) 4-ig (a fejtől legtávolabbi) számoztuk az állat baloldalán és 5-től (a fejhez legközelebbi) 8-ig (a fejtől legtávolabbi) az állat jobboldalán.

A koagulált vért steril gézzel eltávolítottuk.

Közvetlenül a sebészeti beavatkozás előtt, körülbelül 8 órával a sebészeti beavatkozás befejezése után és azután amikor csak szükséges volt, intramuszkulárisan 0,3 mg/ml buprenofint (Anorfin, GEA A/S, Dánia) adagoltunk 0,04 mg/kg dózisban.

Adagolás:

A sebeket létrehozásuk után a következőképpen kezeltük:

Állat száma	1		2		3		4	
Helyzet	Bal	Jobb	Bal	Jobb	Bal	Jobb	Bal	Jobb
Fejhez közeli	A			B	A			B
	B	A			B	A		
		B	A			B	A	
Fejtől távoli			B	A			B	A

A = kontroll

B = EMD

Az EMD készítményt az adagolás előtt körülbelül 15 perccel készítettük el a gyártó utasítása szerint. Az EMD készítményt a készítéstől számítva 2 órán belül felhasználtuk. A sebkezeléshez az EMD készítményt vékony rétegben vittük fel a seb felületére. 4 sebre egy fiola EMD-t alkalmaztunk.

Sebek fedése:

A sebeket Tegaderm készítménnyel fedtük, erre Fixomul-



lal rögzített gézt helyeztünk, és ezeket rögzítőhálóval (Bend-a-rete, Tesval, Olaszország) rögzítettük. A sebfedéseket naponta megvizsgáltuk.

A sebfedéseket a 2. napon (az összes állat esetén) és a 3. napon (a 3. és 4. állat esetén) cseréltük.

Az átkötözés előtt az állatokat a nyakba 1,0 ml/10 kg dózisban intramuszkulárisan adott injekcióval érzéstelenítettük, amely 5 ml Zoletil 50 Vet. (125 mg tiletamin és 125 mg zolazepam 5 ml oldatban, Virbac, Franciaország) 6,5 ml Rompun Vet. (20 mg/ml xilazin, Bayer, Németország) és 2,5 ml Metadon DAK (10 mg/ml metadon, Nycomed DAK, Dánia) keveréke volt.

A sebek megfigyelése:

A sebeket ellenőriztük a 2. napon (az összes állat esetén), a 3. napon (az összes állat esetén) és a 4. napon (a 3. és 4. állat esetén). A váladékozás és a gyulladás mértékét kiértékeltek. Az epidermisz megjelenését részletesen leírtuk.

Klinikai tünetek:

A betegség, egészség és magatartás változásának minden látható tünetét naponta feljegyeztük. Minden a normálistól való eltérést rögzítettünk a kezdetére, tartamára és intenzitására nézve.

Testtömeg:

Az állatokat kezdéskor, a seb kialakításakor és a vizsgálat befejezésekor megmértük.

Végső megfigyelések:

A 3. napon (körülbelül 56 órával a sebkialakítás után) az 1. és 2. állatot leöltük egy pisztolyból kilőtt kábító-lövedékkel történt elkábítás után a kulcscsont alatti véna és



artéria felvágásával.

A 4. napon (körülbelül 72 órával a sebkialakítás után) az 3. és 4. állatot leöltük egy pisztolyból kilőtt kábító-lövedékkel történt elkábítás után a kulcscsont alatti véna és artéria felvágásával.

Szövetmintavétel:

Minden sebet kiemeltünk egy a vázizomzatból kivágott blokk formájában. Ha az alatta levő vázizomhoz tapadt volna, az izom egy darabját is felvettük a fixáláshoz. A blokkokat foszfáttal pufferolt 4%-os formaldehidben fixáltuk.

Hisztológiai készítmény:

A fixálás után minden sebből négy, 5 μ m névleges vastagságú, hematoxilinnal és eozinnal megfestett reprezentatív mintát rögzítettünk paraffinban. A megfestett metszeteket fénymikroszkóp alatt egy rács alkalmazásával figyeltük meg. Így mérni lehetett a seb teljes hosszát és az epitelizálódott felület hosszát. Ezt az arányt minden metszet esetén az epitéliumsejtekkel fedett seb százalékában adtuk meg. Minden seb esetén meghatároztuk az átlagértéket, majd a csoport átlagértékét számítottuk.

Statisztika:

Az adatokat feldolgoztuk, így megkaptuk az átlagértékeket és standard deviáció értékeket. Az esetleges extrém értékeket szintén azonosítottuk. Ezután minden folyamatos változót teszteltünk varianciahomogenitásra nézve Bartlett-teszttel. Ha a variancia homogén volt, a változó esetén variancia-analízist végeztünk. Ha bármilyen szignifikáns eltérést észleltünk, Dunnett-teszttel becsültük a csoporton belüli kü-

lönbségeket. Ha a variancia heterogén volt, a változókat Shapiro-Wilk-módszerrel normalitásra nézve teszteltük. Normál eloszlás esetén a csoporton belüli differenciákat Student-teszttel azonosítottuk. Egyébként az esetleges csoporton belüli differenciákat Kruskal-Wallis-teszttel becsültük. Ha bármilyen szignifikáns csoporton belüli differenciát észleltünk, a csoport azutáni azonosítását Wilcoxon Rank-Sum-teszttel végeztük.

A statisztikai elemzéseket SAS módszerrel (6.12 változat) végeztük. Ismertetése a következő helyen található: "SAS/STAT User Guide, Version 6, negyedik kiadás, 1+2. kötet, 1989, SAS Institute Inc., Cary, North Carolina 27513, USA.



Szekvencialista

<110> Biora AB

<120> Mátix-protein kompozíciók sebgyógyulás elősegítésére
healing

<130> 20542PC1

<160> 2

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 407

<212> PRT

<213> Ismeretlen

<400> 1

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> Ismeretlen

<400> 2

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



Szabadalmi igénypontok

1. Aktív zománcanyag-készítmény alkalmazása bőrön vagy nyálkahártyán előforduló sebek gyógyítására szolgáló gyógyszerkészítmények vagy kozmetikai készítmények előállítására.

2. Aktív zománcanyag-készítmény alkalmazása bőrön vagy nyálkahártyán előforduló sebek gyógyulásának elősegítésére szolgáló gyógyszerkészítmények vagy kozmetikai készítmények előállítására.

3. Aktív zománcanyag-készítmény alkalmazása bőr vagy nyálkahártya regenerálására vagy kijavítására szolgáló gyógyszerkészítmények vagy kozmetikai készítmények előállítására.

4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a seb a szájüreg nyálkahártyáján van jelen.

5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol a seb testi sérülésből vagy sebesülésből ered, amely szájsebészettel, beleértve a periodontális sebészeti beavatkozást, foghúzást, endodontális kezelést, fog-implantátum beépítését, vagy fogprotézis felhelyezésével és alkalmazásával kapcsolatos, a seb lehet aszeptikus seb, zúzott seb, vágott seb, tépett seb, nem-mélyreható seb, nyílt seb, mélyreható seb, áthatoló seb, szúrt seb, szeptikus seb, infarktusos és szubkután seb, továbbá lehet iszkémiás fekély, felfekvés, sipoly, súlyos harapás, égés, donorhely seb, valamint aftás seb, baleseti seb vagy herpeszrel kapcsolatos seb.

6. Aktív zománcanyag-készítmény alkalmazása fertőzés megelőzésére és/vagy kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények előállítására.

7. A 6. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a fertőzést

mikroorganizmus okozta.

8. A 6. vagy 7. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a baktériumok a bőrön vannak jelen.

9. A 6. vagy 7. igénypont szerinti alkalmazás baktériumos állapot megelőzésére és/vagy kezelésére, ahol a fertőzés a szájüregben van jelen.

10. Aktív zománcanyag-készítmény alkalmazása bőr vagy nyálkahártya gyulladásos állapotának megelőzésére vagy kezelésére szolgáló gyógyszerkészítmények vagy kozmetikai készítmények előállítására.

11. Az 1-10. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol az aktív zománcanyag lehet zománc mátrix, valamely zománc mátrix származék és/vagy zománc mátrix protein.

12. Az 1-11. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol az aktív zománcanyag lehet enamelinek, amelogeninek, nem-amelogeninek, prolinban gazdag nem-amelogeninek, amelinek, közelebbről ameloblasztin, seatlin, tuftelinek és ezek származékai valamelyike vagy ezek keverékei.

13. Az 1-12. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol az aktív zománcanyag moltömege SDS PAGE módszerrel meghatározva legfeljebb 120 kD, előnyösen legfeljebb 100 kD, még előnyösebben legfeljebb 90 kD, még annál is előnyösebben legfeljebb 80 kD, és még annál is előnyösebben legfeljebb 70 kD, legelőnyösebben legfeljebb 60 kD.

14. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol az aktív zománcanyag-készítmény a következő anyagok közül legalább kettőt tartalmaz: amelogeninek, prolinban gazdag nem-amelogeninek, tuftelin, tuft-proteinek, szérumprotei-



nek, nyálproteinek, amelin, ameloblasztin, seatlin és ezek származékai.

15. Az 1-14. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, ahol az aktív zománcanyag nagy részének a molekulatömege 20 kD körüli.

16. Az 1-15. igénypontok bármelyike szerinti alkalmazás, EMDOGAIN vagy abban található bármely protein vagy peptid felhasználásával, ahol sebek a bőrön vagy nyálkahártyán fordulnak elő.

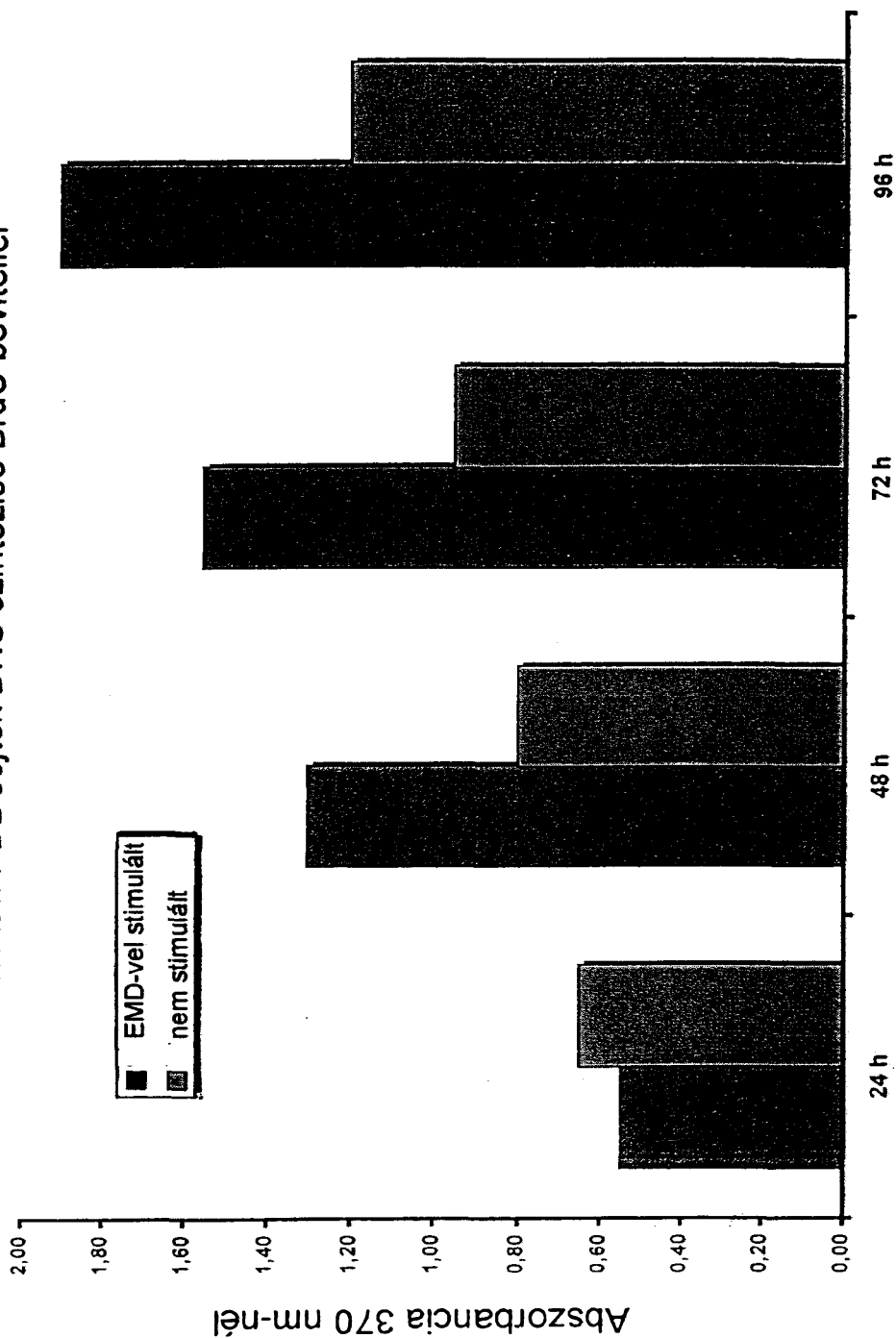
A meghatalmazott:

98 oldal leírás
11 oldal rajz

109 oldal

DANUBIA
Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft
Dr. Gárdonyi Zoltánné
szabadalmi ügyvivő

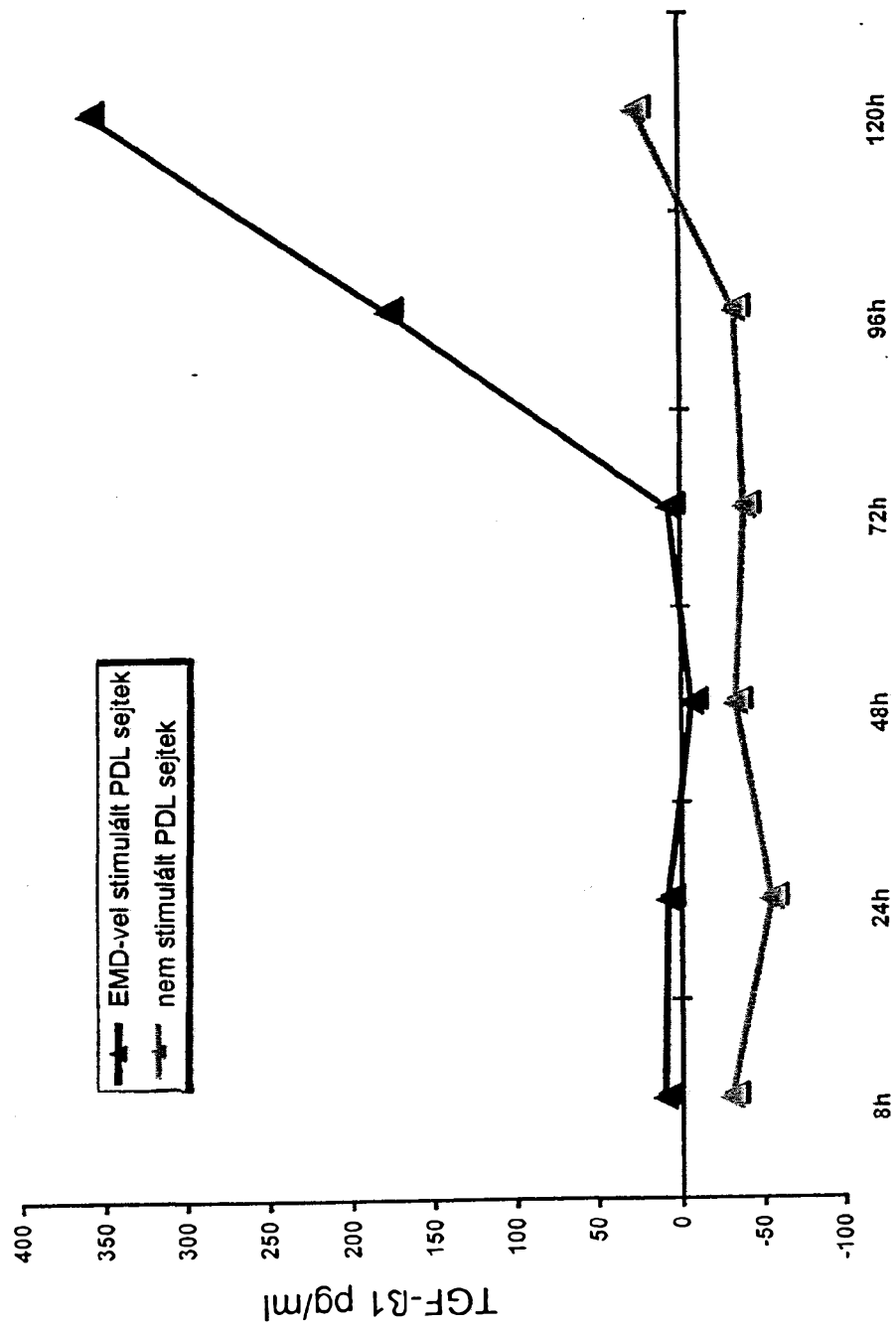
Humán PDL sejtek DNS szintézise BrdU bevitellel



1. ábra

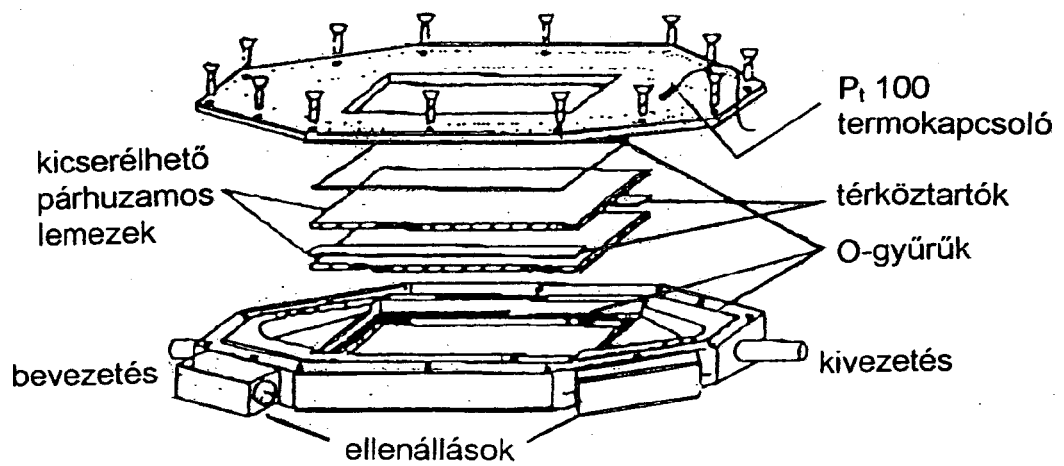
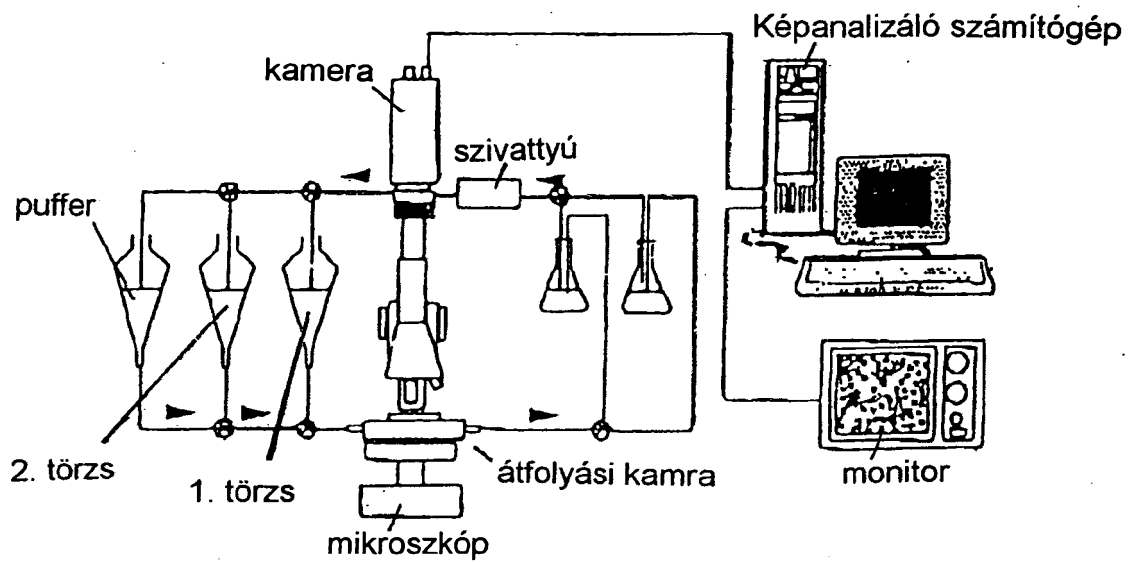
RE

EMD-vel stimulált és nem-stimulált humán PDL sejtek TGF- β 1-termelése

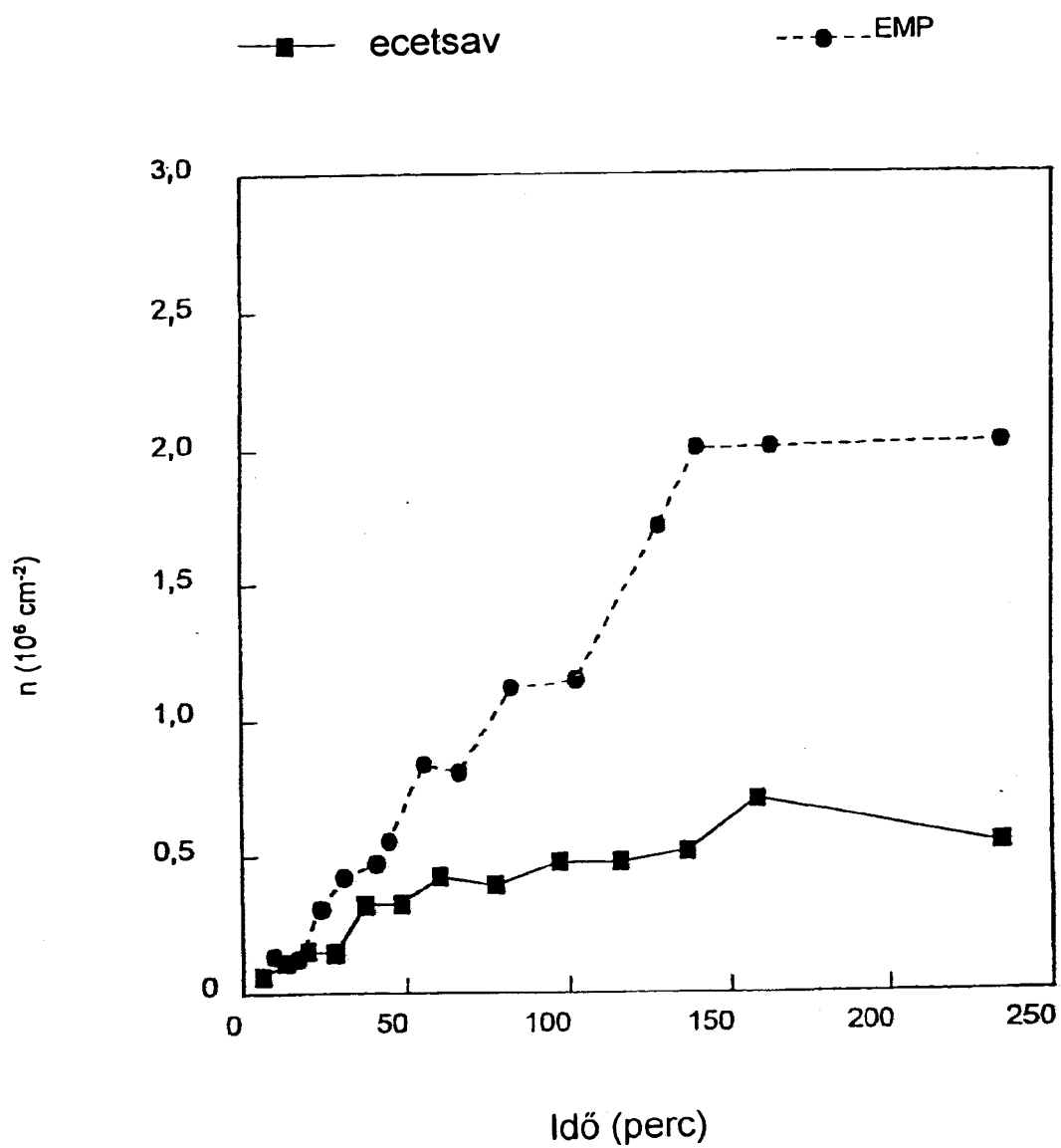


Tenyészet ideje (óra)

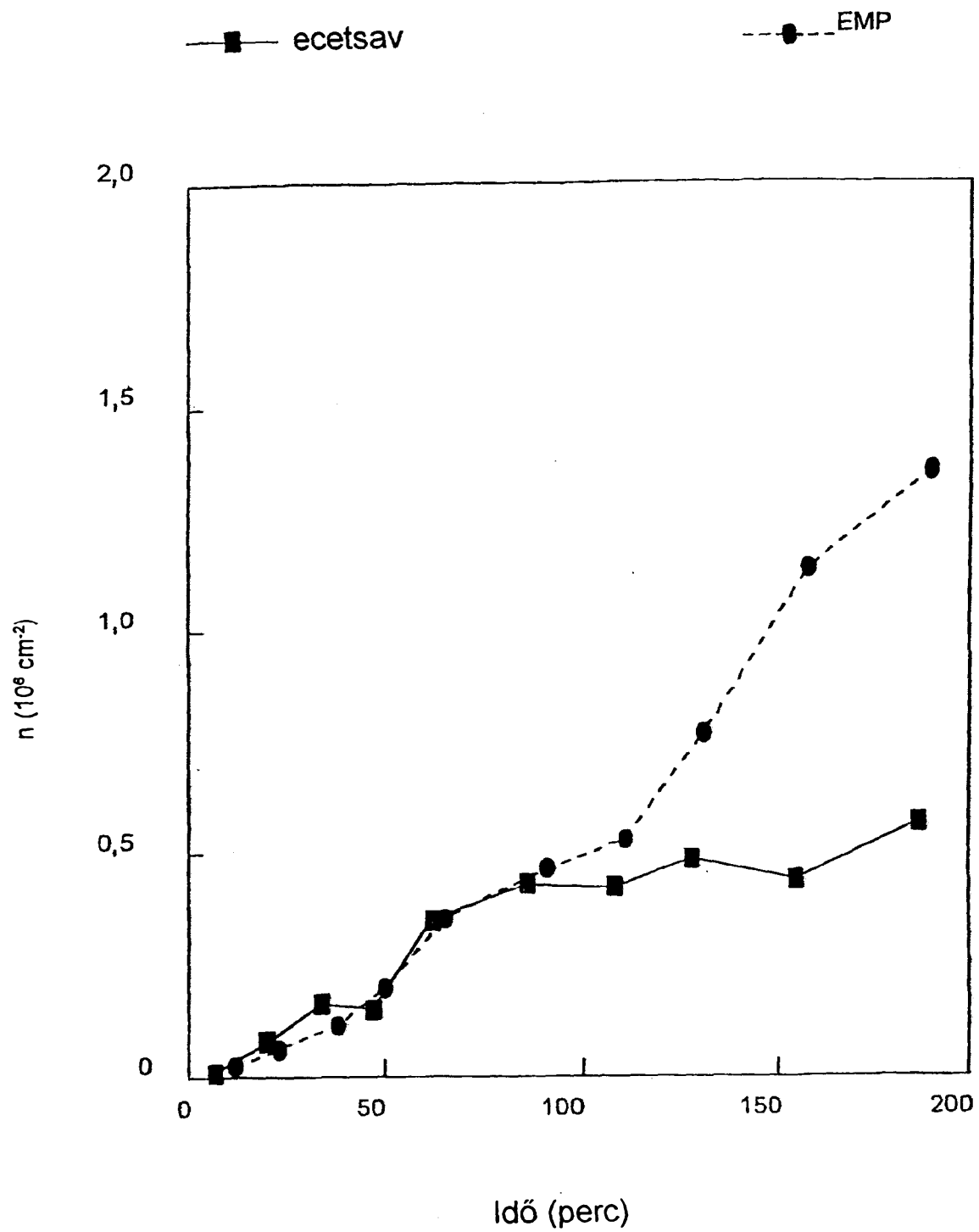
2. ábra



3. ábra

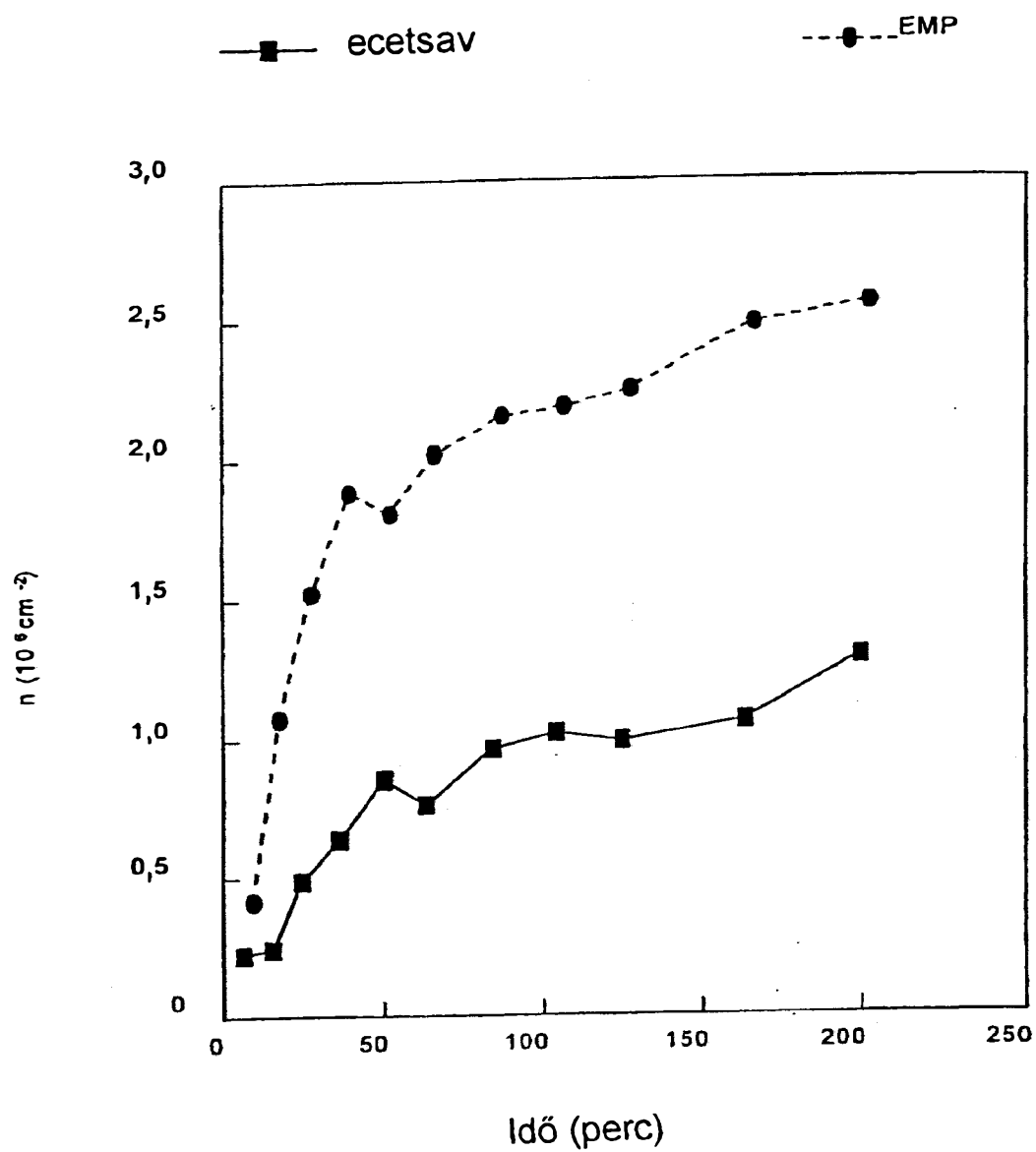


4. ábra

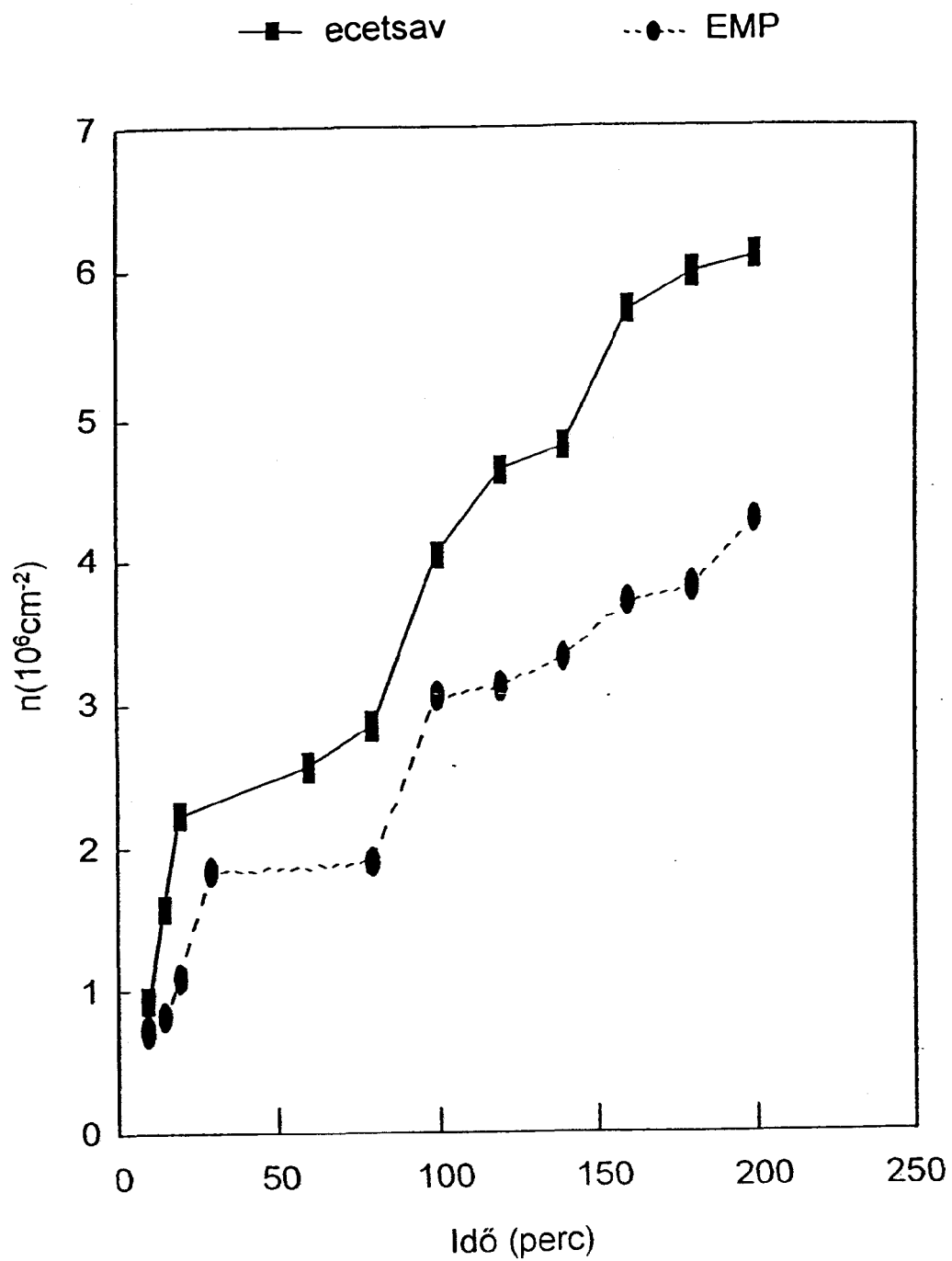


5. ábra

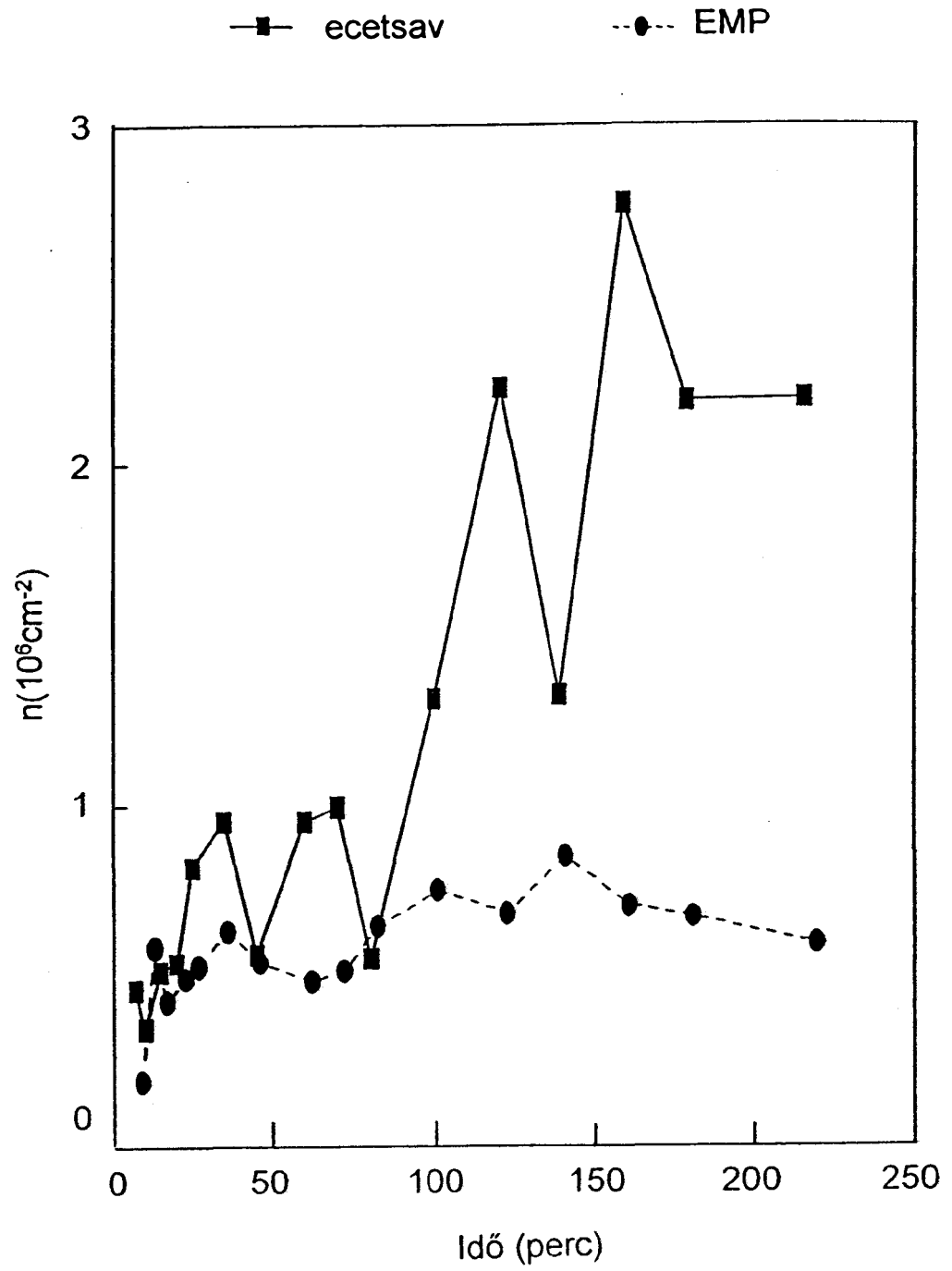
5/11



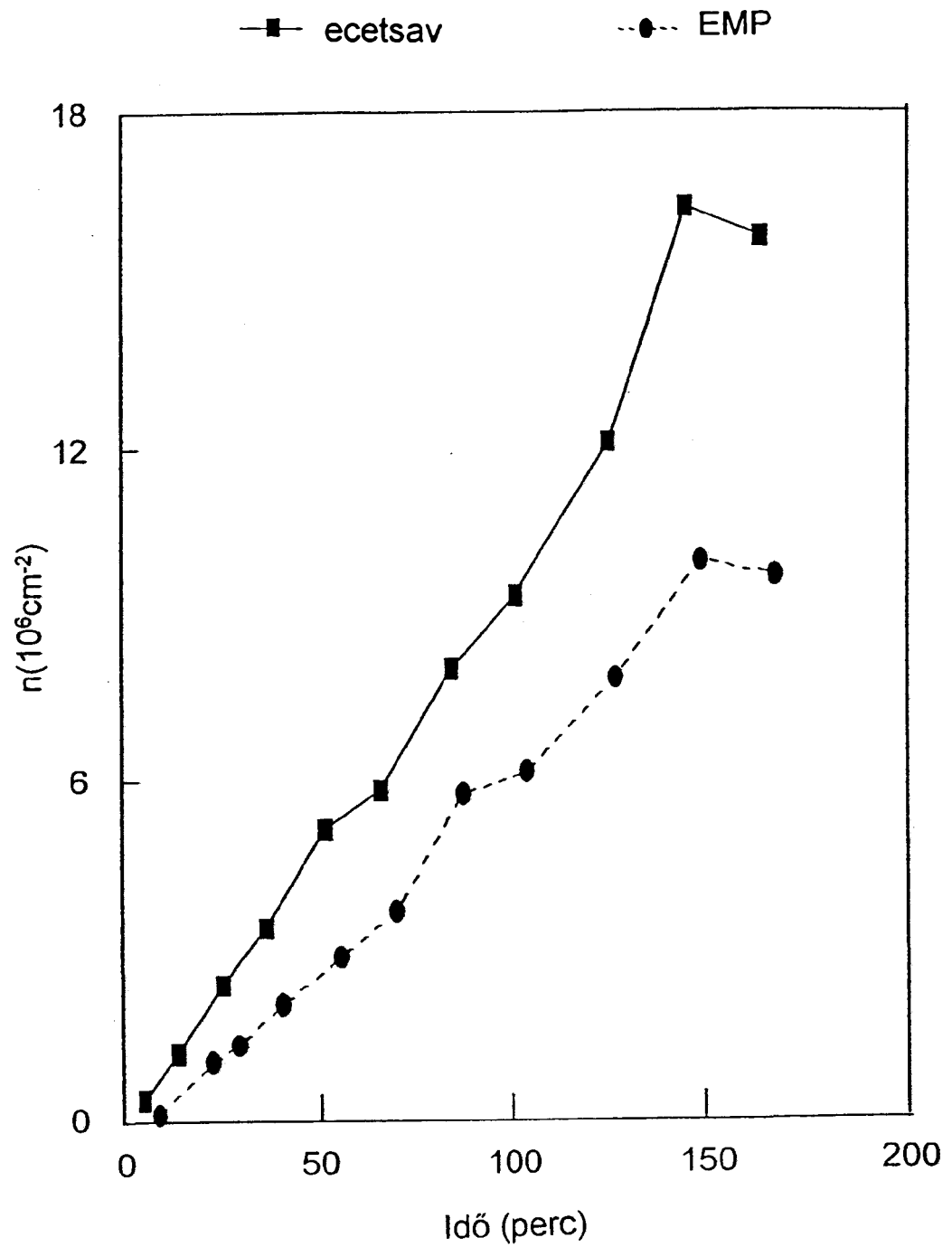
6. ábra



7. ábra



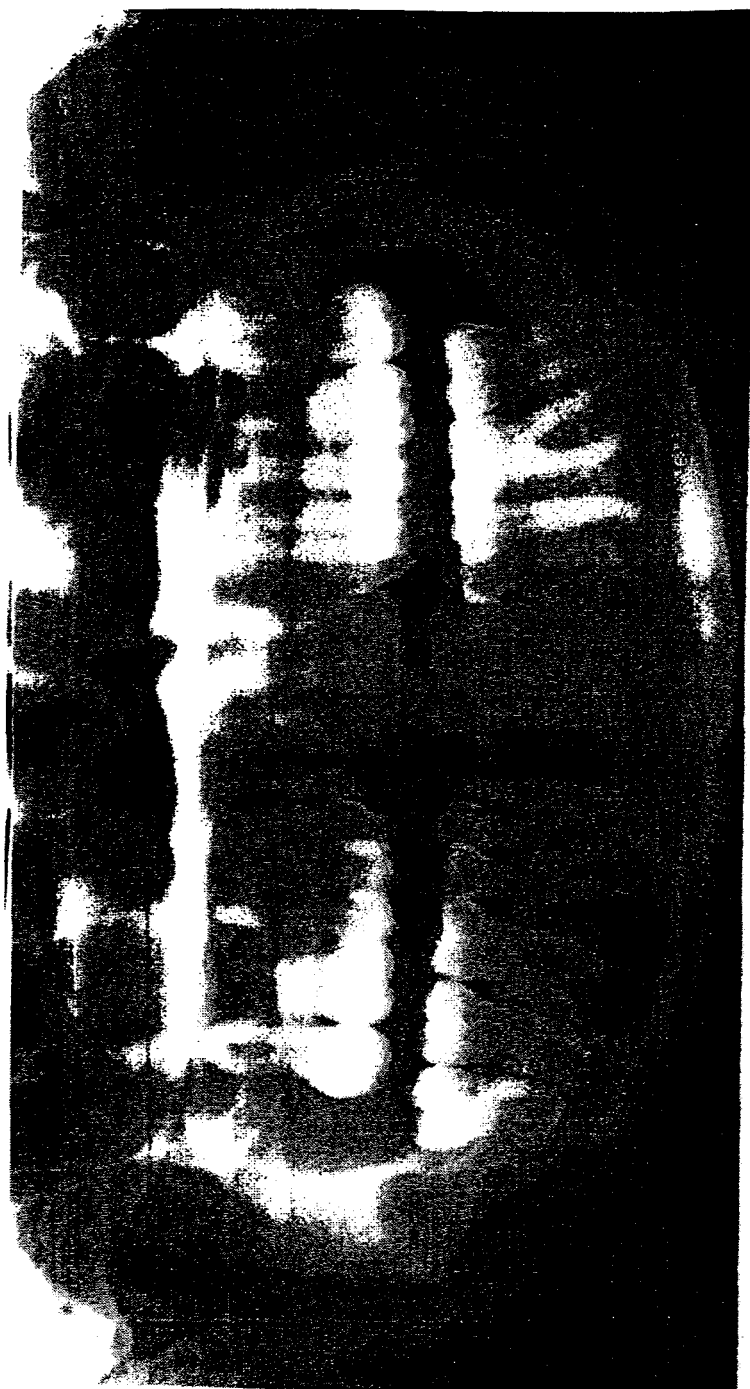
8. ábra



9. ábra



10A ábra



10B ábra

Rn