



REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1179** (13) **Z**
(51) Int.Cl.: *A61K 9/66* (2006.01)
A61K 35/15 (2015.01)
A61K 35/19 (2015.01)
A61K 38/18 (2006.01)
A61K 38/19 (2006.01)

(12) **BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

(21) Nr. depozit: s 2017 0043 (22) Data depozit: 2017.03.29	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2017.08.31, BOPI nr. 8/2017
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (72) Inventatori: PISARENCO Sergiu, MD; CUȘNIR Adrian, MD; ANGHELICI Gheorghe, MD; ZUGRAV Tatiana, MD (73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (74) Mandatar autorizat: COȘNEANU Elena	

(54) **Metodă de tratament al ulcerelor trofice**

(57) **Rezumat:**

1

Invenția se referă la medicină, în special la chirurgia septică și poate fi utilizată pentru tratamentul ulcerelor trofice.

Metoda constă în aceea că cu 24...48 ore înainte de tratament se separă o suspensie de celule mononucleare din sangele pacientului, care conține 3×10^7 /ml de celule, de asemenea de la pacient cu 2...3 ore înainte de prima procedură se prelevă 30...40 ml de sânge, care se centrifughează timp de 8...12 min cu

2

3000...3500 rot./min cu obținerea unui cheag fibrinic bogat în trombocite, suspensia se administrează subcutanat în jurul plăgii, la o distanță de 1 cm de la marginile ei, în cantitate de 5...15 ml, după care pe plagă se aplică cheagul fibrinic, procedura se repetă peste fiecare 4 zile, iar seria de tratament este de 8...10 proceduri.

Revendicări: 1

(54) Method for treating trophic ulcers**(57) Abstract:**

1

The invention relates to medicine, in particular to purulent surgery and can be used for treating trophic ulcers.

The method consists in that 24...48 hours before the treatment, a suspension of mononuclear cells from the patient's blood containing $3 \times 10^7/\text{mL}$ cells is separated, 30...40 mL of blood is also taken from the patient 2...3 hours before the first procedure, which is centrifuged for 8...12 min with

2

3000...3500 rpm to produce a fibrin clot enriched with platelets, the suspension is administered subcutaneously around the wound, at a distance of 1 cm from its edges, in an amount of 5...15 mL, after which the fibrin clot is applied to the wound, the procedure is repeated every 4 days, and the course of treatment is 8...10 procedures.

Claims: 1

(54) Метод лечения трофических язв**(57) Реферат:**

1

Изобретение относится к медицине, в частности к гнойной хирургии и может быть использовано для лечения трофических язв.

Метод состоит в том, что за 24...48 часов до лечения отделяют суспензию мононуклеарных клеток из крови пациента, содержащей $3 \times 10^7/\text{мл}$ клеток, также от пациента за 2...3 часа до первой процедуры проводят забор 30...40 мл крови, которую

2

центрифугируют в течение 8...12 мин с 3000...3500 об./мин с получением фибринового сгустка обогащенного тромбоцитами, суспензию вводят подкожно вокруг раны, на расстоянии 1 см от ее краев, в количестве 5...15 мл, после чего на рану применяют сгусток фибрина, процедура повторяется через каждые 4 дня, а курс лечения составляет 8...10 процедур.

П. формулы: 1

Descriere:

- Invenția se referă la medicină, în special la chirurgia septică, și poate fi utilizată pentru tratamentul proceselor septico-purulente ale ulcerelor trofice.
- 5 Este cunoscută metoda de tratament al ulcerelor trofice în piciorul diabetic, care constă în aceea că se efectuează necrectomia țesuturilor necrotizate din regiunea ulcerului, apoi timp de 5...7 zile se efectuează lavajul plăgii cu soluție antiseptică, după care se aplică un pansament îmbibat cu soluție de 0,5% de iodopiron. După sanarea plăgii se aplică autotransplanturi dermale [1].
- 10 Este cunoscută, de asemenea, metoda de tratament al ulcerelor trofice în piciorul diabetic, care constă în aceea că se efectuează pansamente cu un amestec care conține plasmă îmbogățită cu trombocite, soluție de 10% de CaCl_2 în cantități egale și un preparat antibacterian la care este sensibilă flora din plagă [2].
- 15 Mai este cunoscută metoda de tratament al complicațiilor septico-purulente cu o rezistență majoră a microorganismelor față de antibiotice în piciorul diabetic, care constă în aceea că se efectuează pansamente cu soluție de 1% de acid clorhidric pe plagă după aplicarea antibioticelor pe plaga menționată. Pansamentele se efectuează până la apariția granulațiilor [3].
- 20 Este cunoscută metoda de tratament al ulcerelor trofice în piciorul diabetic, care constă în aceea că se administrează i/v soluție de Tiroxin-alanil-glicil-phenilalanil-leucil-arginină diacetat (Dapargin), și anume 4 mg, doza pentru 24 ore, în 10 ml de ser fiziologic, care se administrează timp de 10 zile, apoi se repetă peste 2 săptămâni [4].
- 25 Este cunoscută, de asemenea, metoda de tratament al ulcerelor trofice în piciorul diabetic, care constă în aceea că se administrează i/a în artera femurală a membrului afectat autolimfocite prelucrate cu glutoxim 20 mg timp de 45 min. Autolimfocitele sunt obținute cu ajutorul unui plasmoseparator de celule sangvine AS-TEC 204 firma „Fresenius”. Procedura se efectuează de două ori cu un interval de 48...72 ore [5].
- 30 Este cunoscută metoda de regenerare a ulcerelor trofice inclusiv de geneză diabetică, care constă în aceea că preliminar, cu 24...48 ore înainte de tratament, se separă o suspensie de celule mononucleare din sângele recipientului, care conține $3 \times 10^7/\text{ml}$ de celule, apoi suspensia separată, peste o zi, în cantitate de 5...15 ml, se administrează subcutanat în jurul plăgii, la o distanță de 1 cm de la marginile ei, și în mușchii gastrocnemian afectat, seria de tratament constituie 12...14 zile [6].
- 35 Dezavantajele metodelor cunoscute constau în aceea că are loc o regenerare lentă a țesuturilor afectate, în unele cazuri sunt necesare intervenții chirurgicale de plastie a defectelor dermale, precum și utilizarea antibioticelor timp îndelungat și aplicarea repetată a metodelor menționate pentru obținerea unei regenerări complete.
- 40 Problema pe care o rezolvă invenția constă în sporirea eficienței în combaterea complicațiilor septico-purulente în ulcerele trofice, stimularea proceselor regenerative și prevenirea dezvoltării proceselor degenerative și necrotice ale țesuturilor afectate.
- 45 Metoda constă în aceea că cu 24...48 ore înainte de tratament se separă o suspensie de celule mononucleare din sângele pacientului, care conține $3 \times 10^7/\text{ml}$ de celule, de asemenea de la pacient cu 2...3 ore înainte de prima procedură se prelevă 30...40 ml de sange, care se centrifughează timp de 8...12 min cu 3000...3500 rot./min cu obținerea unui cheag fibrinic bogat în trombocite, suspensia se administrează subcutanat în jurul plăgii, la o distanță de 1 cm de la marginile ei, în cantitate de 5...15 ml, după care pe plagă se aplică cheagul fibrinic, procedura se repetă peste fiecare 4 zile, iar seria de tratament prevede 8...10 proceduri.
- 50 Rezultatul invenției constă în intensificarea proceselor regenerative, antiinflamatoare și de resorbție, ce contribuie la o cicatrizare *per primum* a plăgii cu preîntâmpinarea trecerii proceselor necrotice în țesuturile profunde și cu remisii îndelungate.
- 55 Platelet Rich Fibrin (PRF) prezintă o matrice fibrinică bogată în trombocite, care include în sine citokine, factori de creștere și leucocite, având posibilitatea de a elimina substanțele menționate un timp îndelungat. El poate fi utilizat sub formă de cheag sau membrană. Trombocitele pot secreta factori de creștere numai după formarea cheagului fibrinic, care îi conferă un potențial terapeutic.
- Produsul menționat se pregătește în eprubete vacuumate cu un activator al plasmei, acestea pot fi eprubete din plastic cu un strat aplicat de SiO pe pereții interni sau eprubete

din sticlă fără adaos, deoarece sticla este un activator al plasmei sangvine. După care se centrifughează 30...40 ml de sânge, timp de 8...12 min cu 3000...3500 rot./min. Apoi cheagul se amplacează într-o boxă (PRF-BOX) pentru scurgerea cheagurilor de fibrină. Scopul centrifugării este sedimentarea eritrocitelor. Principala condiție este factorul g (RCF, accelerația centrifugă), care depinde de viteza de rotație și de distanța de la eprubetă până la axa centrală a centrifugii.

Pentru obținerea PRF se începe centrifugarea la cel mult 1 min după prelevarea sângelui. Până la începerea centrifugării se amestecă bine sângele în eprubetă. Activatorul plasmei activează factorul 12, cu cât mai mare este concentrația activatorului cu atât mai bine se amestecă sângele și cu atât mai multă și mai repede se formează trombina, care transformă fibrinogenul în fibrină.

În perioada de până la 7 zile după aplicarea cheagului fibrinic pe suprafața ulcerului din el se elimină următoarele:

- leucocite și monocite ce se transformă în macrofagi, celule care stimulează regenerarea țesutului;
- VEGF – factorul de creștere a endoteliului (Vascular endothelial growth factor), care este o proteină de semnalizare, se elimină de celule pentru stimularea vasculogenezei și angiogenezei;
- PDGF – factorul de creștere a trombocitelor (Platelet-derived growth factor) – proteină ca factor de creștere și are importanță pentru angieneză;
- TGF – beta - factor de creștere și transformare (Transforming growth factor beta) – proteină care controlează proliferarea, diferențierea celulară și alte funcții;
- proteine, care au importanță în procesul de angieneză, stimulează creșterea țesuturilor;
- TSP – trombospondina este un inhibitor al angiogenezei, acționând asupra adheziei și creșterii celulelor endoteliale;
- IGF-1 – factor de creștere de tip insulenic 1 – proteină din familia factorilor de creștere de tip insulenic.

Cultura de celule mononucleare conține substanțe biologice active ce contribuie la activizarea reacțiilor imune, la intensificarea sintezei proteinelor și a proceselor fermentative, precum și la inhibarea reacției inflamatoare, în locul administrării suspensiei are loc ameliorarea microcirculației, proliferarea țesutului conjunctiv, intensificarea proceselor de resorbție. Ca rezultat are loc un proces antiinflamator, reparativ și regenerativ intens, cicatrizarea plăgii se produce mai rapid, provocând diminuarea edemului și prevenind dezvoltarea lui datorită ameliorării microcirculației în țesuturile plăgii.

Metoda se realizează în modul următor: de la pacient, preliminar cu 24...48 ore, se prelevă 20...40 ml de sânge, la care se adaugă 20...100 UI de heparină la 1 ml de sânge. Din sânge se separă celulele mononucleare pe un gradient de densitate, se spală cu ser fiziologic steril, se includ în mediul de cultură (mediu Eagle, TC 199, RPMI 1640, etc.) și se amplacează în termostat la temperatura de 37°C pentru 24...48 ore. După perioada de incubare cultura celulară se separă de mediul de cultură și se amestecă, obținându-se o suspensie în 5...15 ml de ser fiziologic steril. De asemenea se pregătește cheagul de fibrină, și anume se prelevă 30...40 ml de sânge și se centrifughează timp de 8...12 min la 3200 rot./min, apoi se scurge cheagul de fibrină bogat în trombocite. Plaga se curăță de mase necrotice, de fibrină până la apariția sângerării din marginile ei, se prelucrează cu soluții antiseptice, apoi suspensia de celule, care conține 3×10^7 /ml de celule în cantitate de 5...15 ml, în dependență de suprafața plăgii, se administrează în jurul plăgii, la 1 cm de la marginea ei, în stratul subcutanat al membrului afectat, procedura se repetă peste fiecare 4 zile, iar seria de tratament constituie 8...10 proceduri.

Metoda revendicată a fost utilizată pentru tratamentul a 10 pacienți. Rezultatele au fost satisfăcătoare.

Exemplul 1

Pacientul K., 66 ani, internat în secția chirurgie septică cu o plagă supurată de 6x9 cm în regiunea 1/3 inferioare a gambei drepte, care s-a dezvoltat timp de 2 săptămâni de la o rană în regiunea menționată. Pacientul suferă de diabet zaharat de 18 ani. După investigarea clinică și paraclinică a pacientului s-a utilizat metoda revendicată, și anume la a doua zi de spitalizare s-au prelevat 30 ml de sânge, la care s-au adăugat 600 UI de heparină. S-a separat cultura de celule mononucleare. S-a utilizat mediul de cultură RPMI 1640, care a fost amplasat în termostat la temperatura de 37°C pentru 48 ore. Apoi s-a separat cultura de

- 5 mediul de cultură și s-a amestecat cu 10 ml de ser fiziologic steril. De asemenea, cu 2 ore până la efectuarea metodei, s-a pregătit cheagul de fibrină pentru a fi aplicat pe suprafața plăgii. S-a efectuat prelucrarea plăgii. S-au administrat în jurul plăgii în stratul subcutanat 10 ml de suspensie de celule. Pe suprafața plăgii s-a aplicat cheagul de fibrină bogat în trombocite. Procedura a fost repetată peste fiecare 4 zile, seria de tratament a constituit 9 proceduri. Plaga s-a cicatrizat *per primum*, fără semne de inflamație. Pacientul a fost externat în stare satisfăcătoare.

Exemplul 2

- 10 Pacienta N., 53 ani, internată în secția chirurgie septică cu o plagă supurată de 4x6 cm în regiunea plantei drepte, care s-a dezvoltat timp de 5 luni de la o rană tăiată în regiunea menționată. După investigarea clinică și paraclinică a pacientei s-a utilizat metoda revendicată, și anume la a doua zi de spitalizare s-au preluat 30 ml de sange, la care s-au adăugat 600 UI de heparină. S-a separat cultura de celule mononucleare. S-a utilizat mediul
- 15 de cultură RPMI 1640, care a fost amplasat în termostat la temperatura de 37°C pentru 48 ore. Apoi s-a separat cultura de mediul de cultură și s-a amestecat cu 15 ml de ser fiziologic steril. De asemenea, cu 2 ore până la efectuarea metodei, s-a pregătit cheagul de fibrină pentru a fi aplicat de suprafața plăgii. S-a efectuat prelucrarea plăgii. S-au administrat în jurul plăgii în stratul subcutanat 10 ml de suspensie de celule. Pe suprafața plăgii s-a aplicat
- 20 cheagul de fibrină bogat în trombocite. Procedura a fost repetată peste fiecare 4 zile, seria de tratament a constituit 9 proceduri. Plaga s-a cicatrizat *per primum*, fără semne de inflamație. Pacientul a fost externat în stare satisfăcătoare.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. RU 2359624 C1 2009.06.27
2. RU 2322247 C1 2008.04.20
3. RU 2184551 C2 2002.07.10
4. RU 2144831 C1 2000.01.27
5. RU 2228204 C2 2004.05.10
6. MD 696 Y 2013.11.30

(57) Revendicări:

Metodă de tratament al ulcerelor trofice, care constă în aceea că cu 24...48 ore înainte de tratament se separă o suspensie de celule mononucleare din sângele pacientului, care conține $3 \cdot 10^7$ /ml de celule, de asemenea de la pacient cu 2...3 ore înainte de prima procedură se prelevă 30...40 ml de sânge, care se centrifughează timp de 8...12 min cu 3000...3500 rot./min cu obținerea unui cheag fibrinic bogat în trombocite, suspensia se administrează subcutanat în jurul plăgii, la o distanță de 1 cm de la marginile ei, în cantitate de 5...15 ml, după care pe plagă se aplică cheagul fibrinic, procedura se repetă peste fiecare 4 zile, iar seria de tratament este de 8...10 proceduri.

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii		
(21) Nr. depozit: s 2017 0043 (22) Data depozit: 2017.03.29 (71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (54) Titlul: Metodă de tratament al ulcerelor trofice		
II. Clasificarea obiectului invenției:		
(51) Int.Cl: <i>A61K 9/66</i> (2006.01) <i>A61K 38/18</i> (2006.01) <i>A61K 35/15</i> (2015.01) <i>A61K 38/19</i> (2006.01) <i>A61K 35/19</i> (2015.01)		
III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)		
MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): Int.Cl: <i>A61K 9/66</i> (2006.01) <i>A61K 38/18</i> (2006.01) <i>A61K 35/15</i> (2015.01) <i>A61K 38/19</i> (2006.01) <i>A61K 35/19</i> (2015.01) ulcer trofic, celule mononucleare EA, CIS (Eapatis): Int.Cl: <i>A61K 9/66</i> (2006.01) <i>A61K 38/18</i> (2006.01) <i>A61K 35/15</i> (2015.01) <i>A61K 38/19</i> (2006.01) <i>A61K 35/19</i> (2015.01) трофическая язва, моноклеарные клетки SU (nonpublic): Int.Cl: <i>A61K 9/66</i> (2006.01) <i>A61K 38/18</i> (2006.01) <i>A61K 35/15</i> (2015.01) <i>A61K 38/19</i> (2006.01) <i>A61K 35/19</i> (2015.01) трофическая язва, моноклеарные клетки		
IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate		
V. Documente considerate a fi relevante		
Categorie*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A, D	RU 2359624 C1 2009.06.27	1
A, D	RU 2322247 C1 2008.04.20	1
A, D	RU 2184551 C2 2002.07.10	1
A, D	RU 2144831 C1 2000.01.27	1
A, D	RU 2228204 C2 2004.05.10	1
A, D, C	MD 696 Y 2013.11.30	1
A	MD 742 B1 1997.06.30	1
A	MD 985 F1 1998.06.30	1
A	MD 1052 F1 1998.10.31	1
A	MD 1585 F1 2001.01.31	1
A	MD 2229 F1 2003.08.31	1
A	MD 2933 F1 2005.12.31	1

A	MD 3076 F1 2006.06.30	1
A	MD 4197 B1 2013.02.28	1
A	SU1528468 A1 1989-12-15	1
A	SU1718947 A1 1992-03-15	1
A	SU1450831 A1 1989-01-15	1
A	SU1287869 A1 1987-02-07	1
A	SU1219097 A1 1986-03-23	1
A	SU1263261 A1 1986-10-15	1
A	SU1118373 A1 1984-10-15	1
A	SU724141 A1 1980-03-30	1
A	SU589983 A1 1978-01-30	1

*** categoriile speciale ale documentelor citate:**

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri

Data finalizării documentării 2017.06.12

Examinator GROSU Petru