



(12) CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: a 2019 00135

(22) Data de depozit: 27/02/2019

(41) Data publicării cererii:
30/10/2020 BOPI nr. 10/2020

(71) Solicitant:
• UNIVERSITATEA DE MEDICINĂ ȘI
FARMACIE "IULIU HAȚIEGANU" DIN
CLUJ-NAPOCA, STR. VICTOR BABEȘ
NR. 8, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(72) Inventatori:
• ILEA ARANKA, STR. BUCUREȘTI
NR. 51/42, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;

• BOȘCA ADINA BIANCA, STR. VIDRARU
NR.5-7, AP.83, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• CÂMPIAN RADU SEPTIMIU,
STR.GORUNULUI NR.3, AP.19,
CLUJ-NAPOCA, CJ, RO;
• SORIȚĂU OLGA, STR. SOMEȘUL RECE
NR.1233C, GILĂU, CJ, RO;
• GUȚIU EUGEN, STR.21 DECEMBRIE
NR.131, AP.139, CLUJ-NAPOCA, CJ, RO

(54) RĂDĂCINĂ DENTARĂ ARTIFICIALĂ ȘI PROCEDU
DE REALIZARE A ACESTEIA DIN ACID POLILACTIC
GREFAT CU CELULE STEM MEZENCHIMALE

(57) Rezumat:

Invenția se referă la o rădăcină dentară artificială și la un procedeu de obținere a acesteia. Rădăcina, conform invenției, este formată dintr-o matrice (1) poroasă realizată din acid polilactic, având forma de trunchi de con cu o bază (1a) mare și o bază (1b) mică, prin care sunt formate porozitățile prin practicarea unor rețele de canale având un canal (3) central, care străbate rădăcina între cele două baze (1a și 1b), precum și niște canale (4) radiale conectate cu canalul (3) central care se deschid pe o suprafață (1c) laterală a matricei (1), aceasta fiind grefată cu un material (2) osos, produs din celule stem mezenchimale derivate din țesut adipos (pADCS) prediferențiate spre linia osoasă. Procedeu, conform invenției, constă în etapele de realizarea unei matrici poroase din acid polilactic (PLA) prin printare 3D, recoltarea țesutului adipos, izolarea, cultivarea și multiplicarea pADSC nediferențiate, caracterizarea, diferențierea și evidențierea diferențierii pADSC spre linia osoasă, marcarea acestora și cultivarea pe matricea de PLA a celulelor stem derivate din țesutul adipos prediferențiate spre linia osoasă.

Revendicări: 7
Figuri: 21

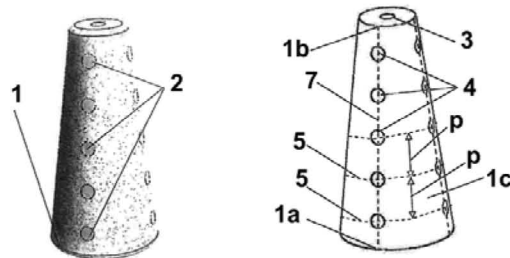


Fig. 1

Fig. 2



**Rădăcină dentară artificială și procedeu de realizare a acesteia din
acid polilactic grefat cu celule stem mezenchimale**

Invenția se referă la o rădăcină dentară artificială și la procedeu de confecționare prin printare 3D în scopul utilizării pentru grefarea alveolelor postextractionale.

Având în vedere că după extractia unitatilor dentare se reduce dimensiunea alveolelor postextractionale în medie cu 25-30% în primele 3 luni (proces care continuă de-a lungul vieții), practicienii au încercat să reducă acest proces fiziologic prin diferite metode de preservare a dimensiunilor a alveolelor postextractionale.

Daca extractiile dentare sunt laborioase și necesită sacrificiul osului alveolar, acestea vor fi urmate de rezorbții osoase importante care nu vor permite o reabilitate orală corespunzătoare a funcțiilor aparatului stomatognat. Practicianul se află de multe ori în situația în care trebuie să realizeze o augmentare a osului alveolar. Aceasta o poate realiza imediat postextractional sau ulterior după vindecarea plăgii postextractionale.

Grefarea alveolelor imediat postextractional se poate realiza cu diferite tipuri de materiale cum ar fi: autogrefele, alogrefele, xenogrefele și materialele aloplastice, fiecare material și tehnică având avantajele și dezavantajele sale.

Dintre materialele aloplastice se pot utiliza diferite tipuri de compuși, fiecare având avantaje și dezavantaje:

- polimerii naturali biodegradabili (colagen, gelatină, chitosan, alginat); cu dezavantajul că au o bioactivitate redusă pentru stimularea formării țesutului osos, se resorb destul de repede de la locul de inserare și au o rezistență mecanică redusă;
- polimerii sintetici biodegradabili (polilactocaprone – PLC, acidul polilactic – PLA, acidul poliglicolic – PGA și copolimerul acidul poli-lactic-co-glicolic – PLGA); au o rezistență mecanică bună, sunt biodegradabili, dar acest proces este mult mai lent decât în cazul polimerilor naturali ceea ce permite regenerarea osoasă la locul de inserare; au dezavantajul că sunt materiale hidrofobe (cu excepția PGA-ului care este hidrofil) ceea ce reduce aderența celulelor la suprafața lor, iar prin degradarea lor rezultă produși acizi care vor scădea pH-ul țesuturilor de la locul de implantare;

- bioceramicile care sunt biomateriale anorganice care au la bază fosfatul de calciu sau vitroceramica (hidroxiapatita, β -fosfatul tricalcic); hidroxiapatita are dezavantajul de a se resorbi foarte lent și incomplet, ceea ce va împiedica procesele de regenerare osoasă;
- metalele (matricele de titan sau aliaje pe bază de titan, matricele de magneziu sau aliaje pe bază de magneziu); matricele de titan sunt neresorbabile și vor necesita o nouă intervenție chirurgicală pentru îndepărtarea lor, față de matricele din magneziu care au o rată crescută de resorbție;

Pentru augmentarea osoasă practicianul poate apela la autogrefe de țesut osos recoltate de la nivelul crestei iliace, menton, linia oblică externă, ramul ascendent mandibular, coaste, calvarie. Toate aceste autogrefe au următoarele dezavantaje: intervenția chirurgicală lasă defecte uneori importante la nivelul zonei donoare, risc de infecție și hemoragie, pacientul este puțin compliant la intervenția chirurgicală (apare edemul și durerea postintervențională), grefa osoasă suferă și ea un proces de rezorbție. De aceea în defectele osoase mici pacienții preferă augmentarea osoasă cu heterogrefă osoasă. Acestea au următoarele dezavantaje: pot apare fenomene de reject, structura nouă formată doar seamana cu structura osoasă, are calități inferioare osului, nu are proprietăți osteogenice, se pot transmite infecții cu prioni.

Cercetatorii au căutat noi soluții pentru regenerarea tisulară osoasă îndreptându-și atenția către celule stem mezenchimale. O sursă bună de izolare a celulelor stem adulte este țesutul adipos deoarece: este abundent, este ușor de recoltat, poate urma unei proceduri de lipoaspirație, nu lasă defecte la nivelul zonei donoare, are o bună multiplicare în culturile celulare, pot fi diferențiate spre osteoblaste. Etapele de lucru sunt accesibile și rezidă în: recoltarea țesutului adipos, izolarea celulelor stem adulte derivate din țesutul adipos (ADSCs), cultivarea ADSCs, prediferențierea spre osteoblaste, creșterea și însămânțarea ADSCs pe matrici, implantarea complexului ADSCs-matrice. Păstrarea dimensiunii alveolei postextractionale va permite o inserare corespunzătoare a unui viitor implant dentar sau aplicarea unei proteze mobilizabile cu o bună stabilitate pe câmpul protetic. Studiile anterioare de regenerare tisulară osoasă utilizând ADSCs s-au axat pe ingineria tisulară parodontală.

Studiul pentru această invenție s-a realizat pe model animal porcine care se apropie cel mai mult de modelul uman din punct de vedere al anatomiei, fiziologiei, patologiei și al imunologiei.

Perspectivile invenției sunt cu privire la aplicabilitatea acestei metode la pacienții cu defecte osoase postextractionale sau de altă natură pentru regenerarea tisulară osoasă prin utilizarea

rădăcinilor dentare artificiale hibride grefate cu celule stem mezenchimale autologe. Pentru evitarea la om a reacțiilor alergice sau de rejet determinate de elemente din mediul de cultură (cum ar fi serul bovin) se poate avea în vedere utilizarea serului propriu al subiectului în mediile de cultură.

Metode de realizare a matricelor

- tehnici care utilizează gazele - "gas foaming technique"
- tehnici care utilizează solvenți – "solvent casting technique"
- tehnici care utilizează levigarea și separația termică
- tehnici de "electrospinning"
- tehnici de prototipare rapidă
- tehnici de congelare care utilizează emulsiile
- tehnici de printare tridimensională – 3D care se pot realiza prin: printare prin injecție ("inkjet printing"), printare asistată laser ("laser printing") și prin extrudare ("extrusion printing").

US 2016157965 "Dental Bone Implant and Implant Method" prezintă o metodă și tehnică de augmentare verticală a osului alveolar printr-o suprastructură care se mulează pe defectul osos și se potrivește acestuia. Suprastructura, după propunerea inventatorului poate fi realizată din materiale biocompatibile neresorbabile cum este titanul sau poliamida. Suprastructura are o suprafață internă în contact cu defectul alveolar osos și o suprafață externă. Această suprastructură prezintă perforații sub formă de canale circulare care pornesc de la nivelul suprafeței externe, trec prin grosimea suprastructurii și se deschid pe suprafața internă. Conform propunerii inventatorului această suprastructură fenestrată (cu multiple orificii) are rolul de a asigura conținutul și contactul materialelor de adiție osoasă cu defectul osului alveolar, dar poate fi și un ghid chirurgical pentru viitoarele implanturi dentare. Fixarea suprastructurii se realizează printr-un material adeziv sau șuruburi. Materialele de adiție non-solide propuse sunt: osul autolog, celulele stem derivate din țesutul adipos sau creșterea tridimensională a celulelor osoase și endoteliale pe o matrice tridimensională. Sunt propuse pentru accelerarea osteoregenerării, utilizarea proteinelor osoase morfogenetice (BMPs, TGF), factorului de creștere fibroblastic (FGF), factorului de creștere pentru insulină (IGF), factorului de creștere epidermal (EGF) și factorului de creștere derivat din trombocite (PDGF). Opțional, suprafețele suprastructurii pot fi acoperite/condiționate cu materialul de adiție osoasă.

Limitările acestei invenții, după părerea noastră sunt date de: lipsa perforațiilor multiple a corticalei osoase ceea ce limitează procesul de augmentare osoasă vertical (perforațiile sunt

realizate doar la locul de inserare a implantelor dentare); lipsa unui "split" osos care să favorizeze contactul materialelor de adiție osoasă cu structurile vasculare și celule stem autologe de la nivelul situsului receptor. O altă limitare este utilizarea unor suprastructuri neresorbabile care nu vor mai fi îndepărtate din cavitatea orală. Prezența unei suprastructuri de titan, de un volum considerabil, va determina multiple artefacte dacă pacientul va avea nevoie în viitor de o examinare RMN a extremității cefalice. Nu se face referire dacă se trepanează periostul, dacă se secționează sau cum va suporta periostul încărcătura prin forțele masticatorii dezvoltate (dacă va suferi procese de ischemie) și nici cum se acoperă cu mucoasă orală suprastructura inserată. Pentru reușita augmentării osoase verticale este nevoie ca lamboul muco-periostal să nu fie în tensiune.

Invenția noastră are rol **preventiv** deoarece scopul nostru este de preservare imediată a dimensiunilor alveolelor postextractionale fără să se aștepte instalarea resorpției osului alveolar. Astfel în invenția noastră noi dorim să valorificăm potențialul natural al organismului uman de regenerare prin stimularea acestui mecanism (inserarea de celule stem mezenchimale **autologe** derivate din țesutul adipos, prediferențiate spre țesutul osos, cultivate pe o matrice de acid polilactic, resorbabilă, printată 3D antomofom). În invenția US 2016157965 "Dental Bone Implant and Implant Method" se are în vedere și adăugarea unei suprastructuri peste o alveolă goală (dar resorbită secundar proceselor patologice, cum se întâmplă în boala parodontală), iar prin canalul circular să se insere un implant dentar, adică realizarea implantului dentar într-o singură etapă, această suprastructură având rol de ghid chirurgical și retentor pentru materialul de adiție osoasă. În invenția noastră noi dorim să realizăm implantul dentar în a doua etapă, după ce sistemul hibrid implantat și-a exercitat efectul de rădăcină dentară artificială biocompatibilă și a preservat dimensiunea alveolelor postextractionale. De asemenea menținerea dimensiunii creștelor edentate este utilă și în protezarea mobilizabilă fără sprijin implantar.

Problema tehnică pe care o rezolvă invenția este de preservare a dimensiunilor a alveolelor postextractionale prin grefarea cu rădăcini dentare artificiale biocompatibile.

Rădăcină dentară artificială, conform invenției, este alcătuită dintr-o matrice poroasă, realizată din PLA, prin printare 3D și apoi grefată cu celule stem mezenchimale autologe derivate din țesutul adipos și prediferențiate spre linia osoasă care vor produce ulterior matricea osoasă.

Procedeul de obținere a rădăcinii dentare din acid polilactic grefat cu celule stem mezenchimale constă în parcurgerea următoarelor etape:

1. Realizarea unei matrici porose a rădăcinii dentare prin printarea 3D din PLA

2. Recoltarea țesutului adipos
3. Izolarea pADSCs
4. Cultivarea și multiplicarea pADSCs nediferențiate
5. Caracterizarea pADSCs
6. Diferențierea pADSCs spre linia osoasă
7. Evidențierea diferențierii pADSCs spre linia osoasă
8. Marcarea pADSCs prediferențiate spre linia osoasă cu PKH₂₆
9. Cultivarea pe matricea de PLA a celulelor stem derivate din țesutul adipos prediferențiate spre linia osoasă.

Se prezintă în continuare un exemplu de realizare a invenției, nelimitativ, în legătură cu figurile 1-21, care reprezintă:

- figura 1, exemplu de rădăcină dentară din acid polilactic grefat cu celule stem
- figura 2, matrice poroasă tronconică cu canale radiale dispuse în același plan
- figura 3, matrice poroasă tronconică cu canale radiale dispuse decalat
- figura 4, secțiune cu un plan A-A din figura 3
- figura 5, structura chimică a acidului polilactic
- figura 6, rădăcină dentară artificială realizată din PLA
- figura 7, modele de rădăcini dentare artificiale din PLA
- figura 8, morfologia rădăcinilor dentare porcine (8.A), amprenta alveolelor postextractionale (8.B) și modelul tunat din gips al alveolelor postextractionale (8.C)
- figura 9, dimensiunile rădăcinii din figura 2
- figura 10, etape de lucru pentru recoltarea țesutului adipos porcine
- figura 11, etape de izolare a pADSCs
- figura 12, culturi celulare primare de pADSCs
- figura 13, culturi celulare de pADSCs la confluență de 90%, pasaj 1
- figura 14, caracterizarea imunocitochimică a pADSCs - imagini de microscopie în fluorescență; expresia antigenelor de suprafață (imaginile de sus – punctele strălucitoare) și prezența nucleilor celulelor în cololația DAPI (imaginile de jos)
- figura 15, citometrie în flux- cuantificarea expresiei antigenelor de suprafață a pADSCs
- figura 16, metoda de diferențiere spre linia osoasă a pADSCs
- figura 17, modificarea fenotipului celular al pADSCs și formarea nodurilor de osteogeneză

- figura 18, imagini de microscopie în fluorescență - expresia pozitivă pentru OP și FA a pADSCs prediferențiate spre linia osoasă la examinarea imunocitochimică (imaginile de sus – punctele strălucitoare) și prezența nucleilor celulelor în cololația DAPI (imaginile de jos); aspectul citoscheletului la macarea cu Actina F
- figura 19, citometrie în flux – cuantificarea expresiei antigenului OP evaluată la diferite exemplare porcine (variabilitatea intraspecie)
- figura 20, imagini comparative ale rădăcinilor dentare artificiale grefate cu pADSCs, prediferențiate spre linia osoasă (celule stem marcate cu fluorocromul PKH₂₆): microscopie optică (10X) versus microscopie optică în fluorescență
- figura 21, protocolul de lucru pentru confecționarea și implantarea rădăcinilor dentare artificiale anatomoforme, grefate cu pADSCs autologe, prediferențiate spre linia osoasă, pe model porc.

Rădăcina dentară artificială constă dintr-o matrice poroasă 1, realizată din PLA, prin printare 3D care este grefată cu material osos 2, obținut din celule stem mezenchimale prediferențiate spre linia osoasă.

Forma rădăcinii este dată de forma matricei poroase 1.

Porozitatea matricei 1 se obține prin practicarea unei rețele de canale alcătuită dintr-un canal central 3 care se întinde pe întreaga lungime a rădăcinii, de la baza 1a la vârful 1b și unor canale radiale 4 conectate cu acesta. Porozitățile create de canalele 3 și 4 se vor umple, pe un mediu de cultură, cu material osos 2, obținut din celule stem mezenchimale.

Canalele radiale 4 se desprind din canalul radial 3 și se deschid pe suprafața laterală 1c a matricei 1.

Canalele 4 sunt grupate în secțiuni 5, paralele cu baza rădăcinii 1a, distanța dintre secțiuni fiind p. În fiecare secțiune 5, canalele radiale 4 sunt dispuse echidistant în raport cu axa canalului central 3, în forma ”unei roți cu spițe” 6.

Matricea poroasă 1 poate avea diferite forme, particularizate după forma alveolei.

Într-un exemplu de realizare (figura 1, 2), matricea poroasă 1 are forma de trunchi de con și este prevăzută cu un canal central 3 care străbate întreaga matrice de la baza mare 1a, la baza mică 1b. Din canalul central 3 se desprind canale radiale 4 care se deschid pe suprafața laterală 1c a matricei 1.

În fiecare secțiune 5, paralelă cu baza mare 1a, situată la un pas p , canalele radiale 4 sunt dispuse echidistant în raport cu axa canalului central 3, în forma "unei roți cu spițe" 6.

Într-o secțiune 5 pot fi trei, patru sau mai multe canale 4, dar numărul canalelor 4 este același în fiecare secțiune 5.

În raport cu o generatoare 7, canalele 4 pot fi amplasate coliniar, cu pasul p (figura 2), în fiecare secțiune 5 având câte un canal 4.

Pe două generatoare 7, alăturate, canalele 4 pot fi dispuse intercalat, cu pasul $2p$ (figura 3, 4). Dispunerea intercalată permite obținerea unui grad mai mare de porozitate.

Roțile cu spițe (6) pot fi suprapuse cu canalele (4) aliniat în plan vertical pe o generatoare 7 (figura 2), sau intercalate la jumătatea unghiului dintre două canale (4) alăturate (figura 3).

În secțiune transversală, canalele 3 și 4 au formă circulară, dar pot avea diverse forme poligonale.

Rolul canalelor 3 și 4 este de a permite circulația mediului de cultură necesar viabilității și multiplicării celulelor stem mezenchimale. Datorită sistemului de canale 3 și 4 practicate în matricea 1, într-un mediu de cultură, celulele stem mezenchimale pot migra și forma noduli de osteogeneză atât în interior cât și pe suprafața exterioară a matricei. Un alt rol al canalelor 3 și 4 este de evacuare a produșilor de catabolism celular.

Procedeul de obținere a rădăcinii dentare din acid polilactic grefat cu celule stem mezenchimale constă în parcurgerea următoarelor etape:

1. Realizarea unei matrici porose a rădăcinii dentare prin printarea 3D din PLA
2. Recoltarea țesutului adipos
3. Izolarea pADSCs
4. Cultivarea și multiplicarea pADSCs nediferentiate
5. Caracterizarea pADSCs
6. Diferențierea pADSCs spre linia osoasă
7. Evidențierea diferențierii pADSCs spre linia osoasă
8. Marcarea pADSCs prediferențiate spre linia osoasă cu PKH₂₆
9. Cultivarea pe matricea de PLA a celulelor stem derivate din țesutul adipos prediferențiate spre linia osoasă.

1. Realizarea unei matrici porose a rădăcinii dentare prin printarea 3D din PLA.

Pentru realizarea matricii poroase într-o primă fază se realizează modelul 3D al rădăcinii. Realizarea modelului 3D al rădăcinii dentare se poate face prin amprentarea alveolelor postextractionale și realizarea unor modele fizice. Modelul 3D al rădăcinii se poate obține prin măsurarea modelului fizic și proiectarea unei matrici 1 care aproximează modelul fizic, sau, mai precis, prin scanarea 3D a modelului fizic. În al doilea caz, rezultă un nor de puncte din care se obține prin prelucrare software modelul 3D (virtual) al modelului fizic.

O altă variantă este realizarea unui CBCT (Cone Beam Computed Tomography), iar pe baza fișierului ".stl" să se genereze modelul virtual al viitoarei rădăcinii dentare artificiale, conform situsului receptor. Această variantă va permite realizarea rădăcinii dentare artificiale și grefarea ei cu pADSCs înainte de realizarea extracției dentare, astfel încât imediat postextractional în alveolă se inseră noua rădăcină dentară artificială. Această situație este cu aplicabilitate clinică, pe model uman.

Există o gamă destul de largă de imprimante 3D care permit printarea matricii 1 din acid polilactic (PLA).

Imprimanta 3D folosește tehnologia de laminare strat cu strat, după fiecare strat printat în forma dorită (a cărei grosime variază între 0,1 și 0,2 mm în funcție de nevoi) se trece la următorul strat, în acest timp capul de printare este încălzit la 195°C și patul de lucru la 60°C pentru a împiedica deslipirea obiectului printat de pe suprafața de lucru.

Comanda printării se face cu ajutorul echipamentului de comandă sau cu un calculator cu coduri numite „Gcode” care poartă informația de mișcare a axelor x,y,z și a extruderului.

Pentru realizarea unui obiect printat 3D este nevoie de un model 3D virtual, în format .stl sau .obj (formate universale 3D). După conceperea modelului dorit în fișierul în format .stl, mai apoi se face generarea Gcod-ului. Simularea pentru printarea 3D se face cu o aplicație compatibilă cu imprimanta 3D. Pentru verificarea straturilor de printare se poate face o simulare a procesului.

Acidul polilactic (PLA) “este un poliester alifatic termoplastice produs din resurse regenerabile, cum ar fi amidonul din porumb (în Statele Unite) sau trestia de zahăr în restul lumii. PLA se poate produce prin fermentație sau sinteză chimică, este biodegradabil în anumite condiții, cum ar fi prezența oxigenului și este greu de reciclat (fig. 5).

Se prezintă sub forma a doi enantiomeri L-acid lactic și D-acid lactic. PLA-ul este un polimer semi-cristalin, cu temperatura de sticlificare de 55 - 59°C și de topire de 174-184°C. Are o

bună rezistență mecanică, cu un modul Young ridicat, plasticitate termală și o bună procesabilitate. Este un polieșter relativ hidrofobic, instabil în condiții de umiditate, motiv pentru care în organismul uman lanțurile de polieșter se rup, prin hidroliză non-enzimatică, rezultând produși netoxici (acidul lactic, bioxidul de carbon și apă) care sunt eliminați prin ciclul Krebs în urină.

PLA-ul este un important material pentru ingineria tisulară, fiind atractiv prin prețului de cost redus și disponibilitatea largă pe piața comercială. PLA-ul utilizat pentru printarea rădăcinilor dentare artificiale din această invenție fost furnizat de către producătorul Polonia de Devil Desing (www.Devildesing.pl) sub formă de filament translucid cu diametrul de 1.75mm, cu temperatura de extrudare de 173–178 °C.

2. Recoltarea țesutului adipos

Recoltarea țesutului adipos se realizează în condiții de asepsie din zone bogate în pADSCs, prin metode medicale cunoscute.

3. Izolarea pADSCs

Probele se dezinfectează cu alcool 70% timp de 15 secunde, iar mai apoi se spală de trei ori cu PBS (*phosphate buffered saline*). Tehnica de izolare a pADSCs este cea a explantului, motiv pentru care probele se tăie în fragmente mici de 0.5-1-2mm³. Se folosește digestia enzimatică prin incubarea probelor cu 1ml de colagenază 1% și 1ml de tripsină, timp de 30 de minute, la temperatură de 37°C și vibrație continuă. S-a inactivat acțiunea enzimelor proteolitice prin adăugare a câte 15ml de mediu de cultură DMEM/F12 10% care conține: 10% ser fetal bovin (FBS), 1% penicilină și streptomycină, aminoacizi neesențiali (NEA), 2mM α -glutamină, piruvat de sodium, β -mercaptoetanol. Se trece apoi la centrifugarea probelor la 1150 de rotații/minut, timp de 7 minute. Se decantează supernatantul, iar peletul de celule stem mezenchimale și explantele vor fi resuspendate în mediul de cultură DMEM/F12 25% (acesta s-a obținut din mediul DMEM/F12 15% prin adăugare de 5ml de FBS), în flacoane de culturi celulare de 25cm².

4. Cultivarea și multiplicarea pADSCs nediferențiate

Explantele/pADSCs se incubează la 37°C, umiditate 95% și 5% CO₂ într-un incubator cu control CO₂/O₂/N₂. Mediul de cultură DMEM/F12 se va schimba la 2-3 zile. La 10 zile de la izolare culturile celulare se obțin culturile primare de pADSCs. Când celulele stem mezenchimale din culturile primare au atins o confluență de 80-90% se va realiza pasajul acestora, iar o parte dintre pADSCs au fost conservate prin congelare și păstrate în azot lichid.

5. Caracterizarea pADSCs

Caracterizarea pADSCs se realizează prin imunocitochimie și citometrie în flux pentru antigenele CD90, CD73, SOX-2 și OCT3/4.

6. Diferențierea pADSCs spre linia osoasă

Celulele pADSCs urmează o fază de prediferențiate spre linia osoasă prin utilizarea mediului osteogenic simplu (OS) și a mediului osteogenic complex (OC), pe plăci cu 6 godeuri, după schema din Fig. 14. Mediul OS conține: DMEM/F12 10%, 50 mM acid ascorbic, 10 mM β -glicerofosfat, 0.1 mM dexametazonă. Mediul OC conține: mediul OS + factori de creștere osoasă, cum sunt BMP2 (bone morphogenic protein) și β -TGF (β -transforming growth factor).

BMP2 este un factor osteogenic care are rol în inițierea formării osoase, în vindecarea osoasă și induce expresia altor proteine osoase morfogenetice (BMPs). TGF- β este un factor mitogenic și osteogenic care induce diferențierea osteoblastică în celulele nediferențiate, dar inhibă osteogeneza în celulele deja angajate în acest proces.

7. Evidențierea diferențierii pADSCs spre linia osoasă

Prediferențierea spre linia osoasă a pADSCs se observă la microscopia optică, prin modificarea fenotipului celular și prezența nodulilor de osteogeneză, iar la imunocitochimie și citometria în flux prin exprimarea antigenelor pentru osteopontin și fosfataza alcalină.

8. Marcarea pADSCs prediferențiate spre linia osoasă cu PKH26

Pentru a putea vizualiza migrarea, multiplicarea în interiorul matricelor de PLA și formarea nodulilor de osteogeneză a pADSCs prediferențiate spre linia osoasă, acestea au fost marcate cu un fluorocrom roșu PKH₂₆ (colorează membrana celulară și se transmite după diviziunea celulară și celulelor fiice, pentru mai multe săptămâni).

9. Cultivarea pe matricea de PLA a celulelor stem derivate din țesutul adipos prediferențiate spre linia osoasă.

Însămânțarea pADSCs prediferențiate spre linia osoasă și marcate cu PKH₂₆ pe matricile de PLA s-a realizat prin injectare cu ajutorul unei seringi de 2ml. Matricile au fost în prelabil sterilizate la etilen oxid. Celulele stem suspendate în mediul de cultură OS au fost injectate în canalul central al matricii, iar mai apoi au fost depuse prin picurare și pe suprafețele lor externe. Matricile au fost puse în godeuri de culturi celulare și au fost acoperite în totalitate cu mediul OS.

Pentru o mai bună dezvăluire a invenției, în continuare se prezintă etapele procesului de realizare a unor rădăcini dentare porcine.

1. Printarea 3D a rădăcinilor dentare porcine din PLA

În vederea printării 3D a rădăcinilor dentare porcine s-au realizat extracții dentare pe mandibule de porc achiziționate din comerț, s-au amprentat alveolele postextractionale și s-au turnat modelele de studiu. Această etapă a fost necesară pentru a studia morfologia rădăcinilor dentare porcine, pentru efectuarea măsurătorilor și pentru a putea verifica potrivirea de tip matrice-patrice a viitoarelor rădăcini dentare artificiale din PLA în alveolele postextractionale (a se vedea Fig. 8).

Pentru printarea 3D a rădăcinilor dentare s-a utilizat **modelul de imprimantă "Prusa Mendel i2"**, cu următoarele componente și date tehnice:

- Precizia de mișcare pe axele X și Y este de 0,015 mm
- Precizia de mișcare pe axa Z este de 0,005 mm
- Precizia de printare pe axele X,Y este de 0,10 mm și pe axa Z 0,01 mm.
- Grosimea stratului de printare este cuprinsă între 0,1-0,2 mm.

S-a realizat macheta poroasă din figura 2, cu dimensiunile din figura 9. Pentru acest modele a fost nevoie de 1 gram material de PLA și de 3 minute de printare cu următoarele setări:

- temperatură cap printare : 195 °c
- temperatură pat de lucru : 60 °c
- viteză de printare 15 mm/s
- diuză de printare 0,3mm
- ventilație suplimentară pentru răcirea materialului .

2. Recoltarea țesutului adipos porcine

Recoltarea țesutului adipos porcine s-a realizat din regiune cefei (zonă bogată în pADSCs), de la 8 porci vietnamezi, de vârsta tânără (3-4 luni). S-au recoltat probe de 2-3 cm³, în condiții de asepsie și s-au transportat la Laboratorul de Culturi Celulare în mediul Dulbecco's Modified Eagle Medium 15% (DMEM/F12) care conține: 15% ser fetal bovin (FBS), 1% penicilină și streptomicină, aminoacizi neesențiali (NEA), 2mM α -glutamină, piruvat de sodiu, β -mercaptoetanol. Preanestezia s-a realizat intramuscular cu Azaperone 1 mg/kg corp și Midazolam 1 mg/kg corp, urmată de injectarea intravenoasă de Ketamină 5 mg/kg corp. S-a realizat sutura plăgii, s-a efectuat protecția antibiotică locală prin pulverizare, iar postoperator s-au administrat antiinflamatoare nesteroidiene (buprenorphine subcutatnat 0.1 mg/kgcorp de 2 ori pe zi timp de 3 zile) – a se vedea Fig. 10.

3. Izolarea pADSCs

Probele au fost dezinfectate cu alcool 70% timp de 15 secunde, iar mai apoi au fost spălate de trei ori cu PBS (*phosphate buffered saline*). Tehnica de izolare a pADSCs a fost cea a explantului, motiv pentru care probele au fost tăiate în fragmente mici de 0.5-1-2mm³. S-a practicat digestia enzimatică prin incubarea probelor cu 1ml de colagenază1% și 1ml de tripsină, timp de 30 de minute, la temperature de 37°C și vibrare continuă. S-a inactivat acțiunea enzimelor proteolitice prin adăugare a câte 15ml de mediu de cultură DMEM/F12 10% care conține: 10% ser fetal bovin (FBS), 1% penicilină și streptomycină, aminoacizi neesențiali (NEA), 2mM α -glutamină, piruvat de sodium, β -mercaptoetanol. S-a trecut apoi la centrifugarea probelor la 1150 de rotații/minut, timp de 7 minute. S-a decantat supernatantul, iar peletul de celule stem mezenchimale și explantele au fost resuspendat în mediul de cultură DMEM/F12 25% (acesta s-a obținut din mediul DMEM/F12 15% prin adăugare de 5ml de FBS), în flacoane de culturi celulare de 25cm².

În figura 11 se prezintă fazele etapei de Izolarea pADSCs: 1- proba de țesut adipos porcine, 2 – fragmentarea probelor pentru izolarea pADSCs prin metoda explantului, 3 – digestia enzimatică, 4 – neutralizarea digestiei enzimaticice, 5 – centrifugarea, 6 – însămânțarea pADSCs și explantelor pe mediul de cultură.

4. Cultivarea și multiplicarea pADSCs nediferențiate

Explantele/pADSCs au fost incubate la 37°C, umiditate 95% și 5% CO₂ într-un incubator cu control CO₂/O₂/N₂. Mediul de cultură DMEM/F12 15% a fost schimbat la 2-3 zile. La 10 zile de la izolarea culturilor celulare am obținut culturile primare de pADSCs - a se vedea Fig. 12. Când celulele stem mezenchimale din culturile primare au atins o confluență de 80-90% s-a realizat pasajul acestora (a se vedea Fig. 13), iar o parte dintre pADSCs au fost conservate prin congelare și păstrate în azot lichid.

5. Caracterizarea pADSCs

Caracterizarea pADSCs s-a realizat prin imunocitochimie și citometrie în flux pentru antigenele CD90, CD73, SOX-2 și OCT3/4. S-a obținut pozitivitate pentru toate antigenele evaluate, dar cea mai redusă expresie a fost pentru antigenul OCT3/4 (a se vedea Fig. 14). Există o variabilitate intraspecie a expresiei acestor antigene, ceea ce ne arată prezența în probele recoltate de pADSCs cu expresie antigenică inomogenă (a se vedea Fig. 15).

Explicatia figurilor 14-15.

6. Diferențierea pADSCs spre linia osoasă

pADSCs au fost prediferențiate spre linia osoasă prin utilizarea mediului osteogenic simplu (OS) și a mediului osteogenic complex (OC) pe plăci cu 6 godeuri după schema din figura 16. Mediul OS conține: DMEM/F12 10%, 50 mM acid ascorbic, 10 mM β -glicerofosfat, 0.1 mM dexametazonă. Mediul OC conține: mediul OS + factori de creștere osoasă, cum sunt BMP2 (bone morphogenic protein) și β -TGF (β -transforming growth factor).

BMP2 este un factor osteogenic care are rol în inițierea formării osoase, în vindecarea osoasă și induce expresia altor proteine osoase morfogenetice (BMPs). TGF- β este un factor mitogenic și osteogenic care induce diferențierea osteoblastică în celulele nediferențiate, dar inhibă osteogeneza în celulele deja angajate în acest proces.

În acest studiu am utilizat pentru stimularea diferențierii spre linia osoasă a pADSCs, câte o singură doză de factori de creștere, iar dozele administrate au fost scăzute: **10ng BMP2/ml** mediu OS și/sau **5ng TGF- β_1 /ml** mediu OS.

7. Evidențierea diferențierii pADSCs spre linia osoasă

Prediferențierea spre linia osoasă a pADSCs s-a observat la microscopia optică prin modificarea **fenotipului celular** și prezența **nodurilor de osteogeneză**, iar la imunocitochimie și citometria în flux prin exprimarea antigenelor pentru **osteopontin** și **fosfataza alcalină**.

După cum se poate observa în figura 17 fenotipul inițial al pADSCs s-a modificat, de la aspectul de celule alungite "fibroblast like" la celule poliedrice. De asemenea celulele stem s-au conglomerat și au format noduli de osteogeneză (aspect de "soare").

În mediile de cultură martor (DF₁₂ 10% și DF₁₂ 15%) se observă aspectul celular alungit al pADSCs. În mediul OS se observă aspectul celular de tip poliedric și conglomerarea celulară. Inițierea formării nodurilor de osteogeneză, cu conglomerare celulară și aspect poliedric se observă în mediul OS + TGF- β_1 . Cele mai bune rezultate pentru prediferențierea spre linie osoasă a pADSCs s-a obținut în mediile de cultură care au conținut BMP₂.

Prin imunocitochimie s-a observat expresia antigenelor pentru osteopontin (OP) și fosfataza alcalină (FA) pentru pADSCs prediferențiate spre linia osoasă, așa cum se poate observa în Fig. 18.

La citometria în flux s-a evidențiat pozitivitatea pentru expresia antigenului OP al pADSCs prediferențiate spre linia osoasă sub acțiunea BMP₂ în procente variabile (a se vedea Fig. 19).

8. Marcarea pADSCs prediferențiate spre linia osoasă cu PKH₂₆

Pentru a putea vizualiza migrarea, multiplicarea în interiorul matricelor de PLA și formarea nodurilor de osteogeneză a pADSCs prediferențiate spre linia osoasă, acestea au fost marcate cu un fluorocrom roșu PKH₂₆ (colorează membrana celulară și se transmite după diviziunea celulară și celulelor fiice, pentru mai multe săptămâni).

9. Cultivarea pe matricea de PLA a celulelor stem derivate din țesutul adipos prediferențiate spre linia osoasă

Însămânțarea pADSCs prediferențiate spre linia osoasă și marcate cu PKH₂₆ pe matricile de PLA s-a realizat prin injectare cu ajutorul unei seringi de 2ml. Matricile au fost în prealabil sterilizate la etilen oxid. Celulele stem suspendate în mediul de cultură OS au fost injectate în canalul central al matricii, iar mai apoi au fost depuse prin picurare și pe suprafețele lor externe. Matricile au fost puse în godeuri de culturi celulare și au fost acoperite în totalitate cu mediul OS.

S-a urmărit prin microscopie optică migrarea, multiplicarea în interiorul matricelor de PLA și formarea nodurilor de osteogeneză a pADSCs prediferențiate spre linia osoasă. Imaginile obținute la microscopia optică s-au realizat comparativ cu cele obținute prin fluorescență (a se vedea Fig. 20). Imagini de microscopie optică (10X) comparativă (figura 20) pentru ziua 7, respectiv ziua 11: imaginile din stânga evidențiază aspectul matricelor, iar cele din dreapta evidențiază în fluorescență pe aceeași matrice modul de migrare, multiplicare și formare a nodurilor de osteogeneză a pADSCs prediferențiate spre linia osoasă, pe suprafața și în interiorul matricelor de PLA. Aceste rădăcini dentare artificiale grefate cu pADSCs prediferențiate spre linia osoasă se pot implanta în alveolele postextractionale având în vedere că macheta rădăcinii este una anatomoformă și este grefată cu celule stem autologe fiecărui subiect.

Protocolul de lucru pentru realizarea unor rădăcini dentare porcine poate fi vizualizat în Fig. 21. Acest procedeu de obținere a unei rădăcini dentare artificiale, hibride din PLA și celule stem vii autologe are aplicabilitate și la om. Ca surse de celule stem mezenchimale adulte pot fi utilizate atât țesutul adipos, dar și țesuturile de la nivelul cavității orale. Țesutul adipos este bine reprezentat la fiecare individ mai ales în regiunea periombilicală. Metoda de recoltare a țesutului adipos este facilă, prin aspirație, în anestezie locală. Putem utiliza ca surse de celule stem mezenchimale adulte și țesuturile din caviata orală, care în urma unor proceduri chirurgicale altfel ar fi risipite. Ilea A, Sorișău O, Boșca BA și Câmpian RS au izolat celule stem mezenchimale adulte din: țesutul osos tuberozitar, foliculul dentar, papila apicală și pulpa dentară a dinților incluși extrași în scop ortodontic; ligamentul circular, ligamentul parodontal și țesutul osos alveolar după extracția în scop

ortodontic a dinților erupți în cavitatea orală; țesut gingival post extracției alveoloplastice. Astfel că celule stem mezenchimale adulte derivate din țesuturile osoase, cum sunt cel tuberozitar și cel alveolar pot fi însămânțate pe matricea de PLA fără a necesita o prediferențiere spre linia osoasă.

Prin aplicarea invenției se obțin următoarele avantaje:

- Se prezervă dimensiunea alveolelor postextractionale prin implantarea în aceste situsuri a unor rădăcini dentare artificiale
- Resorbția osoasă postextractională este redusă
- Risc de rejet al grefei din alveolelor postextractionale este redus având în vedere că se utilizează celule stem mezenchimale autologe ale pacientului în cauză, iar matricea utilizată este biocompatibilă și este resoarbabilă în timp
- Se crează condițiile optime locale pentru realizarea viitoarelor implante dentare sau a lucrărilor protetice adjuncte

REVENDICĂRI

1. Rădăcină dentară artificială din acid polilactic grefat cu celule stem mezenchimale alcătuită dintr-o matrice poroasă (1), anatoformă, particularizată după forma alveolei și grefată cu material osos (2), **caracterizată prin aceea că**, matricea (1) este realizată prin printare 3D din acid polilactic (PLA), iar porozitatea matricei (1) este formată dintr-o rețea de canale alcătuită dintr-un canal central (3) care se întinde pe întreaga lungime a rădăcinii și din mai multe canale radiale (4), în formă de roată cu spițe (6), dispuse în fiecare secțiune (5) paralelă cu baza (1a) a rădăcinii, la distanța (p), canalele (3) și (4) fiind umplute, pe un mediu de cultură, cu material osos (2), obținut din celule stem mezenchimale.
2. Rădăcină dentară artificială, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, în două secțiuni (5) succesive, roțile cu spițe (6) pot fi suprapuse cu canalele (4) aliniat în plan vertical, sau intercalate la jumătatea unghiului dintre două canale (4) alăturate.
3. Rădăcină dentară artificială, conform revendicării 1, **caracterizată prin aceea că**, matricea poroasă (1) are formă tronconică, având baza mare (1a) cu diametrul de 3,5 mm, baza mică (1b) cu diametrul de 2,5 mm, înălțimea de 8 mm, având 4 roți cu spițe (6) situate la distanța $p=1,5$ mm, iar canalele (3) și (4) având diametrul de 0,5 mm.
4. Procedeu de realizare a rădăcinii dentare artificiale, **caracterizat prin aceea că**, constă într-o primă etapă se realizează matricea poroasă (1), din acid polilactic (PLA) prin printare 3D, iar în etapa a doua, aceasta este grefată *in vitro* cu celule stem mezenchimale adulte autologe derivate din țesutul adipos (pADSCs).
5. Procedeu de realizare a rădăcinii dentare artificiale, conform revendicării 4, **caracterizat prin aceea că**, grefarea *in vitro* a matricei poroase (1) constă în parcurgerea următoarelor faze:
 - i. Recoltarea țesutului adipos
 - ii. Izolarea pADSCs
 - iii. Cultivarea și multiplicarea pADSCs nediferențiate

- iv. Caracterizarea pADSCs
 - v. Diferențierea pADSCs spre linia osoasă
 - vi. Evidențierea diferențierii pADSCs spre linia osoasă
 - vii. Marcarea pADSCs prediferențiate spre linia osoasă cu PKH₂₆
 - viii. Cultivarea pe matricea de PLA a celulelor stem derivate din țesutul adipos prediferențiate spre linia osoasă.
6. Procedeu de realizare a rădăcinii dentare artificiale, conform revendicării 4, **caracterizat prin aceea că**, prediferențierea *in vitro* spre linia osoasă a celulelor stem mezenchimale adulte autologe porcine derivate din țesutul adipos s-a realizat sub acțiunea factorilor de creștere administrați într-o singură priză, în doze mici, iar factorii de creștere utilizați au fost BMP2 (bone morphogenic protein) în doză de 10ng/ml de mediu osteogenic simplu și β -TGF (β -transforming growth factor) în doză de 5ng/ml de mediu osteogenic simplu sau combinație între aceștia, mediul osteogenic simplu (OS) conține: DMEM/F12 10%, 50 mM acid ascorbic, 10 mM β -glicerofosfat, 0.1 mM dexametazonă.
7. Procedeu de realizare a rădăcinii dentare artificiale, conform revendicării 4, **caracterizat prin aceea că**, sistemul hibrid de rădăcină dentară obținut din matricea poroasă (1) greafată cu celule stem vii – pADSCs, prediferențiate spre linia osoasă este inserat în alveolele postextractionale pentru a prezerva dimensiunea alveolelor postextractionale cu scopul de a produce matrice osoasă care să se depună atât în canalele pre-existente din rădăcina dentară artificială, dar și în zonele în care PLA-ul se resoarbe lent și progresiv, de asemenea să interacționeze cu celulele stem rezidente la nivelul patului receptor

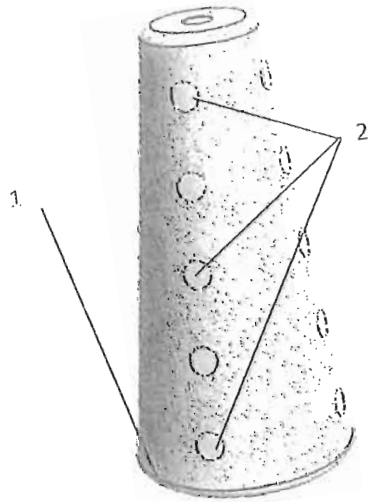


Figura 1

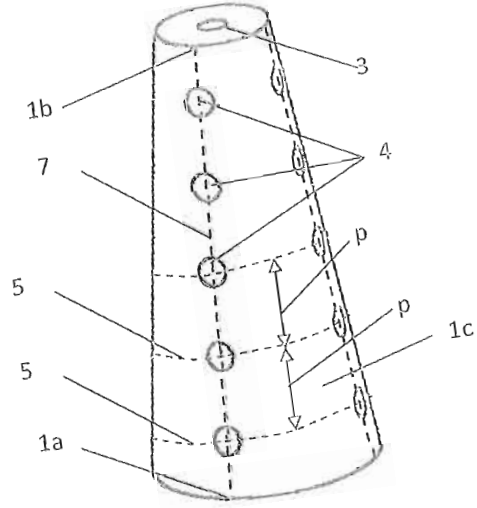


Figura 2

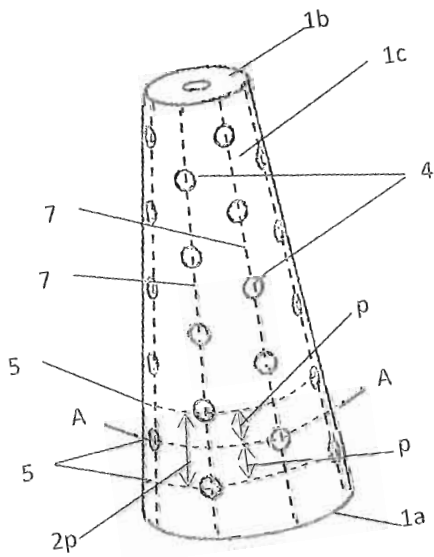


Figura 3

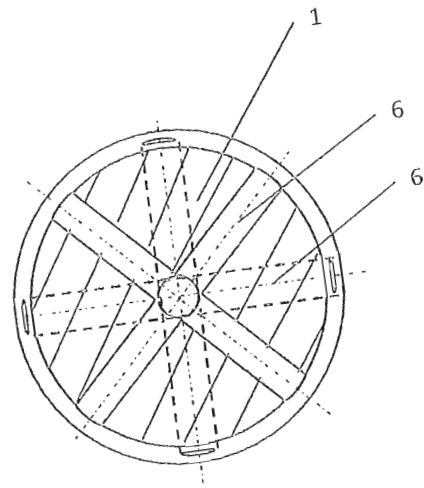


Figura 4

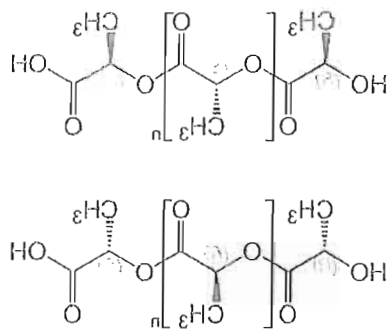


Figura 5

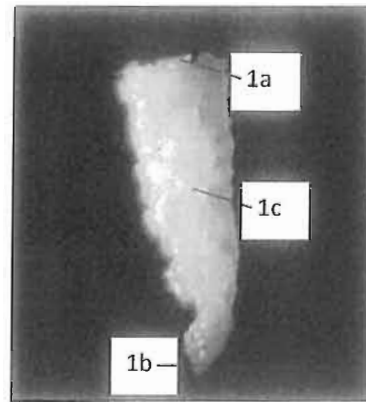


Figura 6

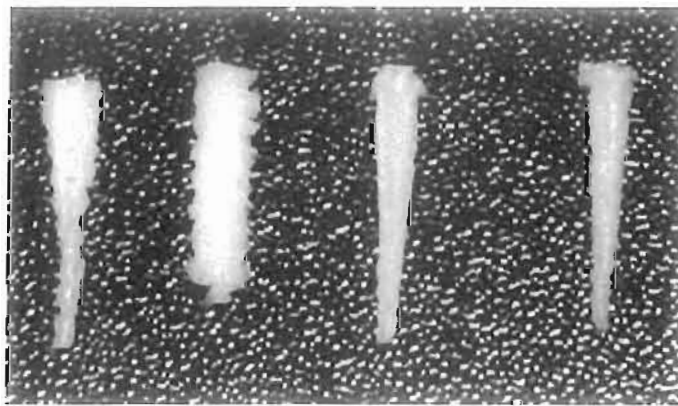


Figura 7

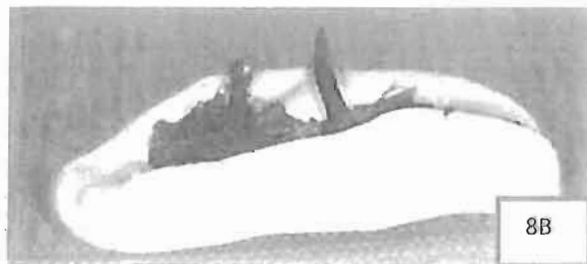
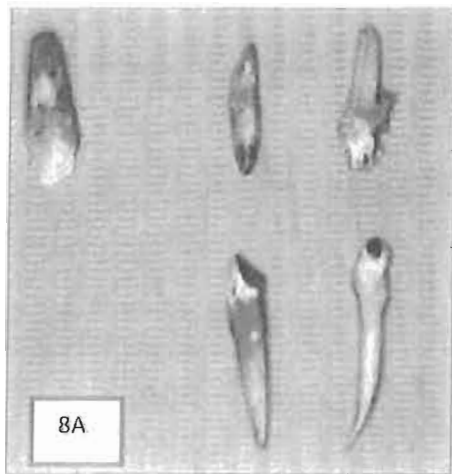


Figura 8

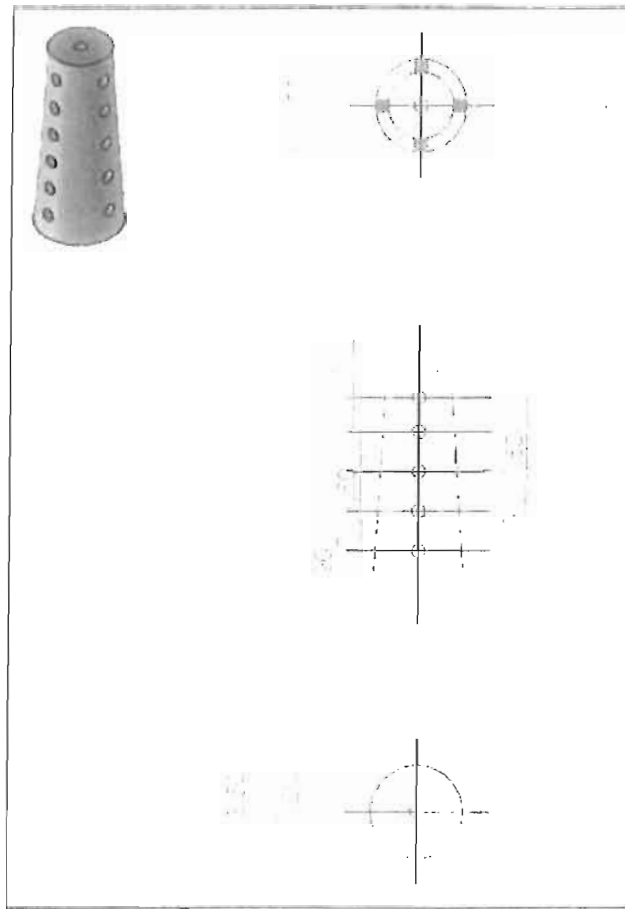


Figura 9

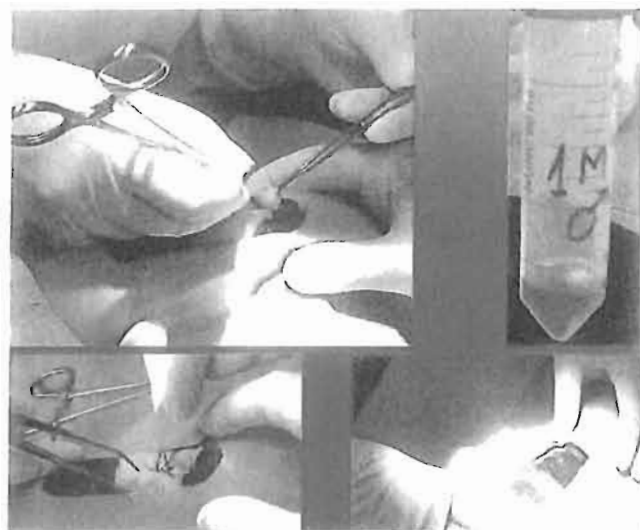


Figura 10

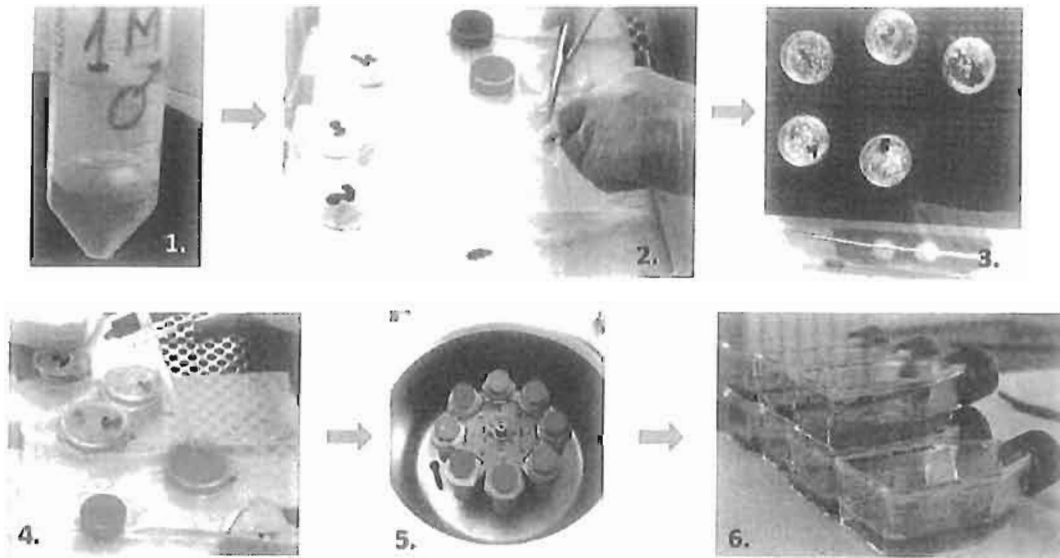


Figura 11

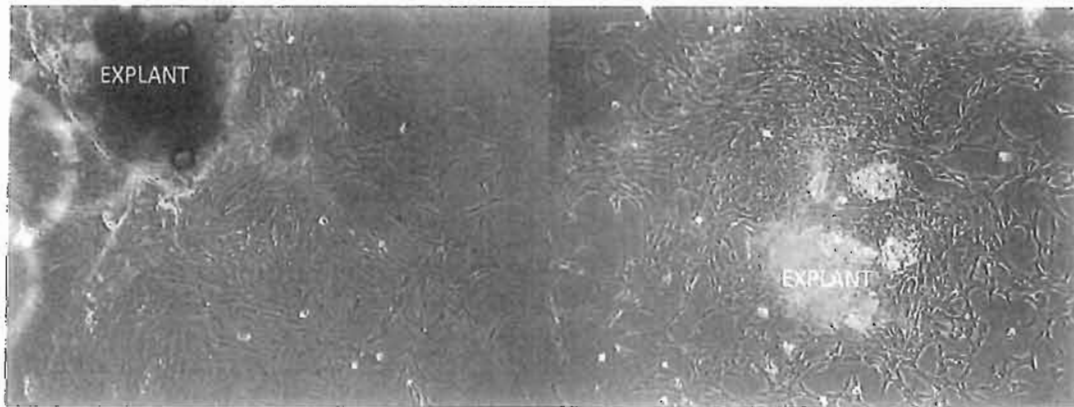


Figura 12

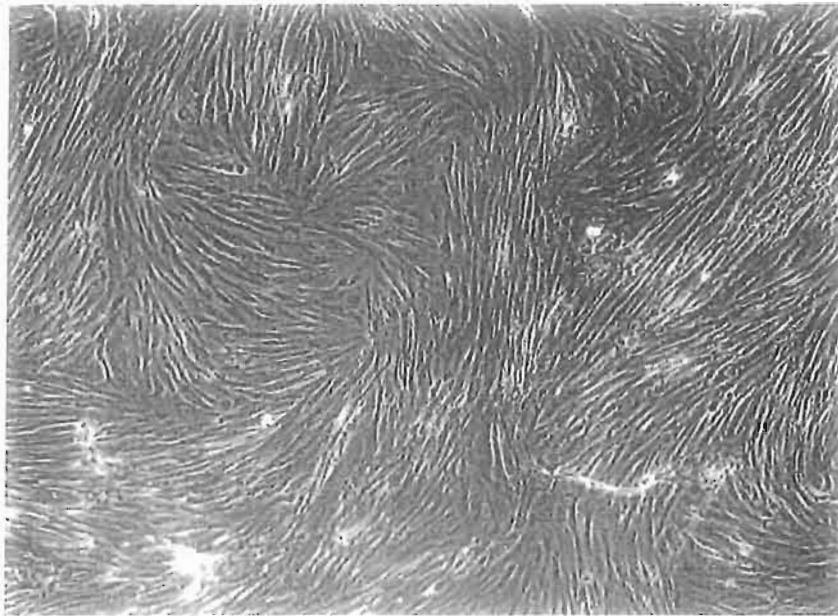


Figura 13

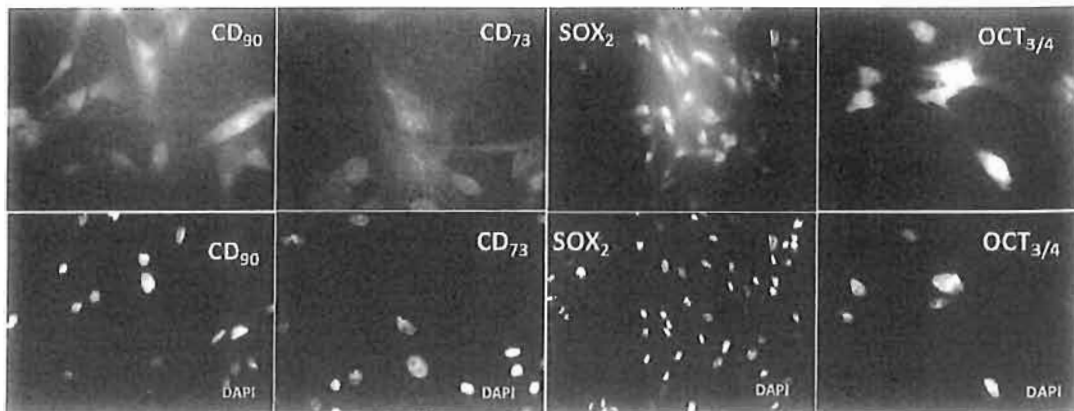
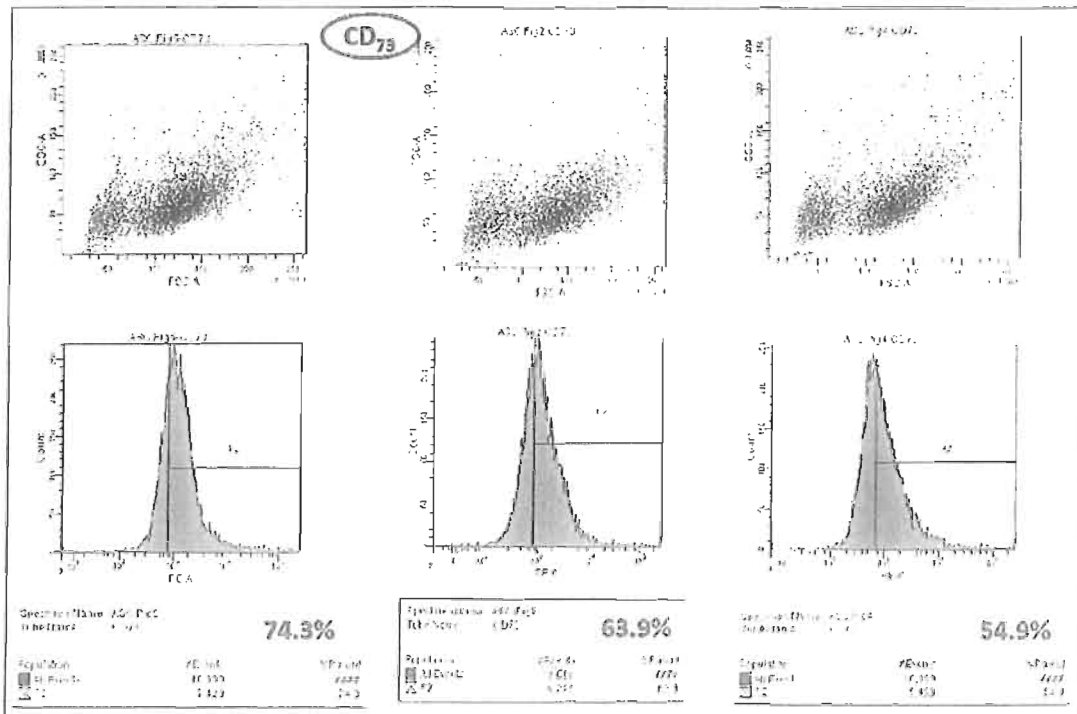
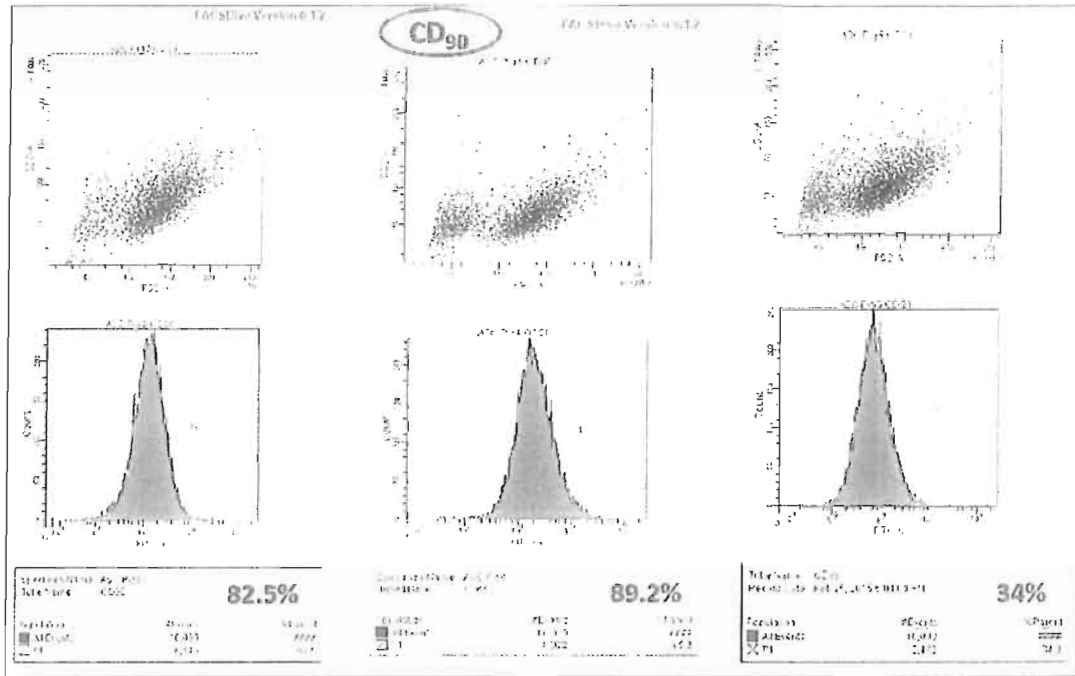


Figura 14



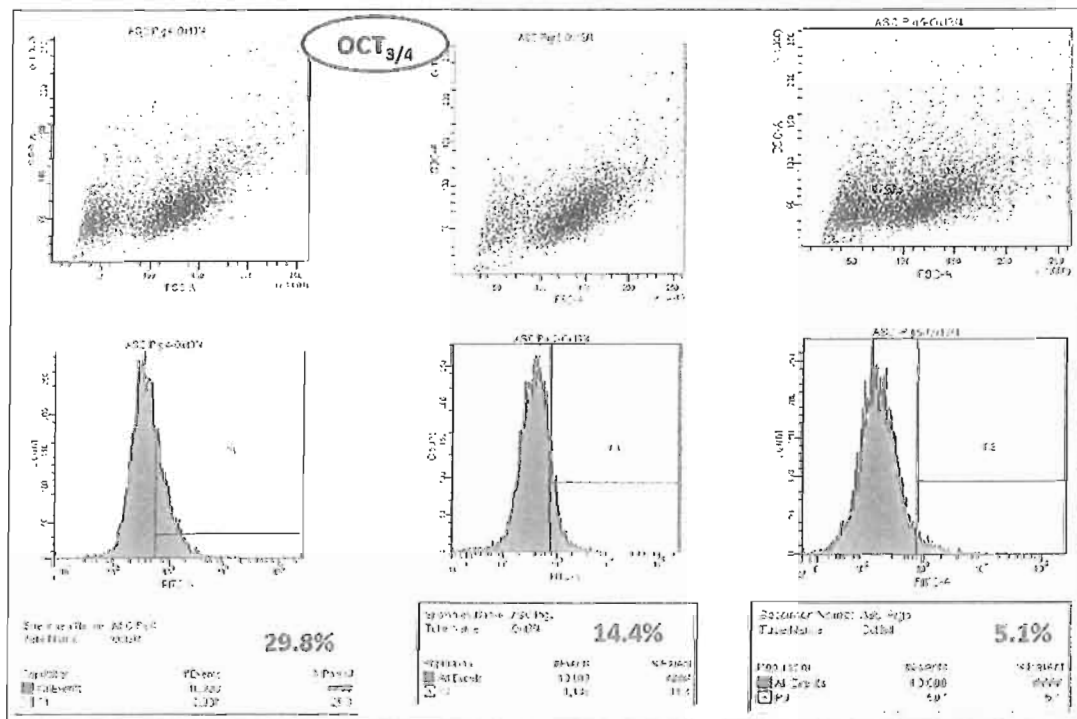
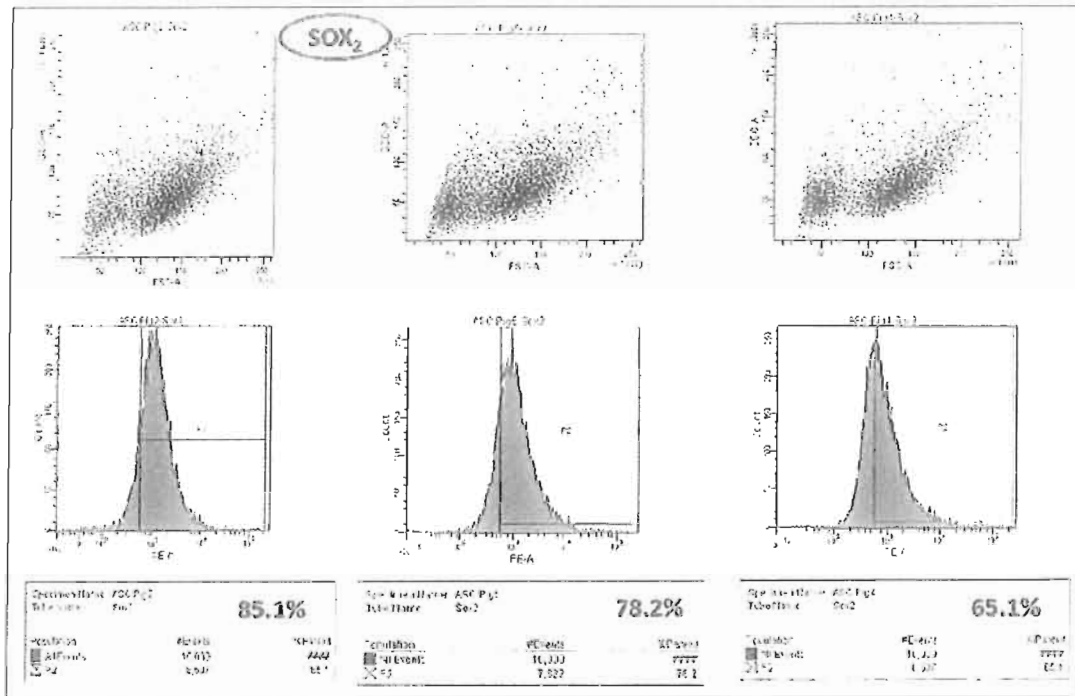


Figura 15

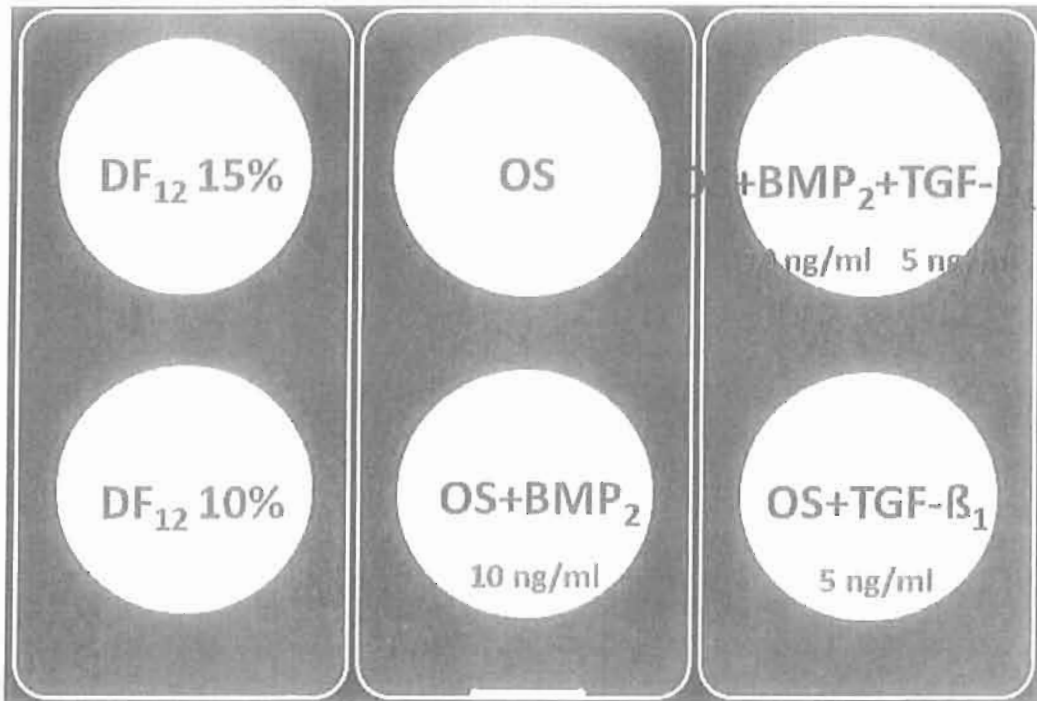


Figura 16

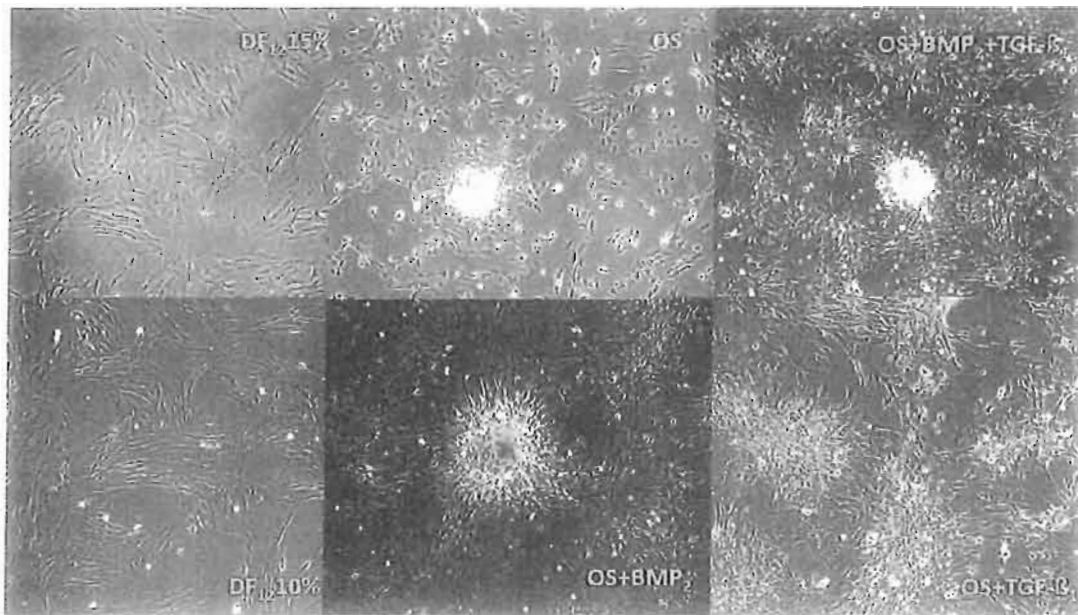


Figura 17

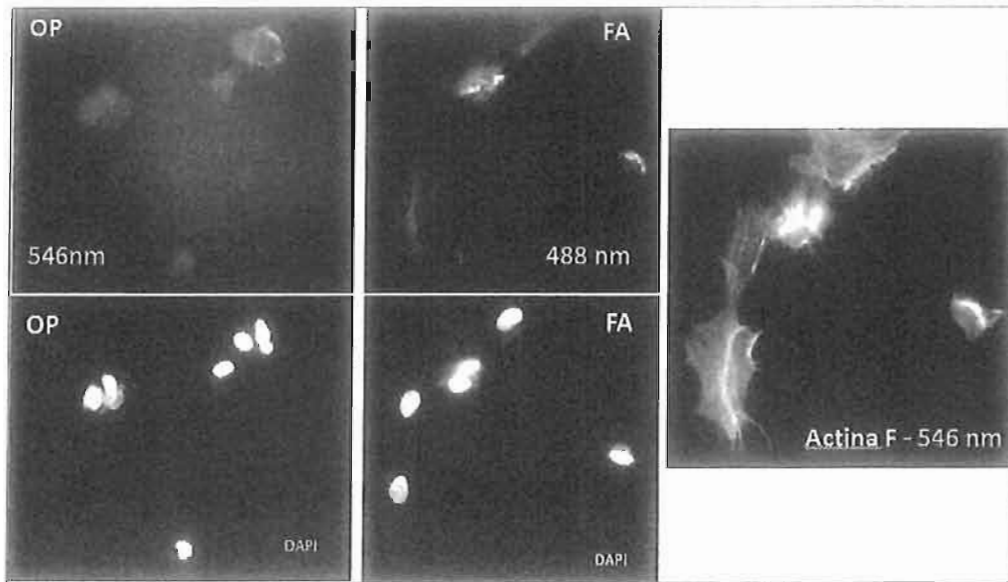


Figura 18

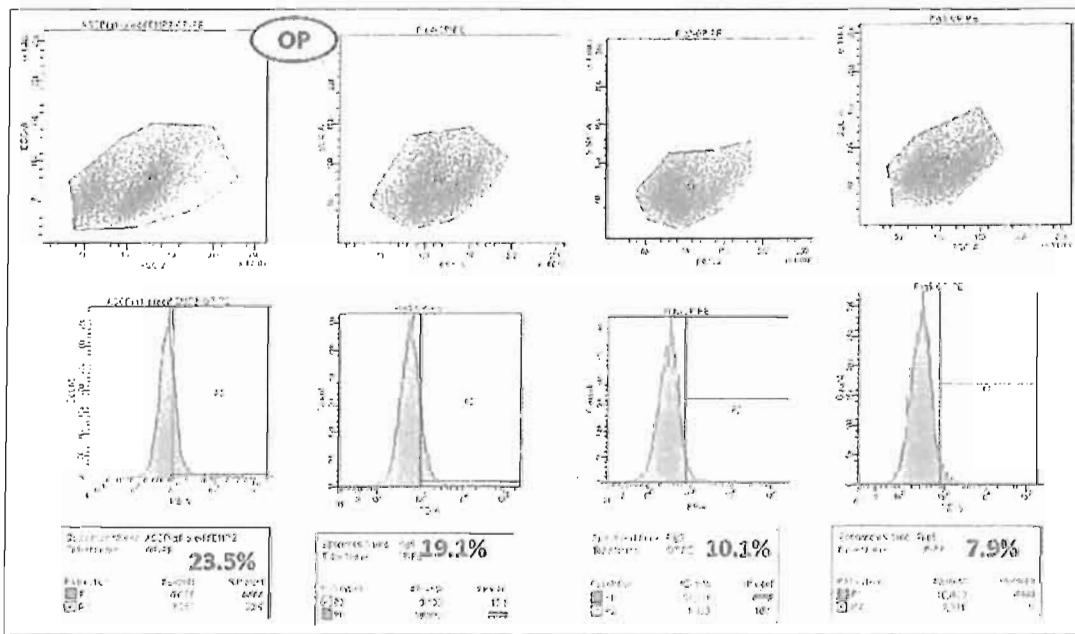


Figura 19

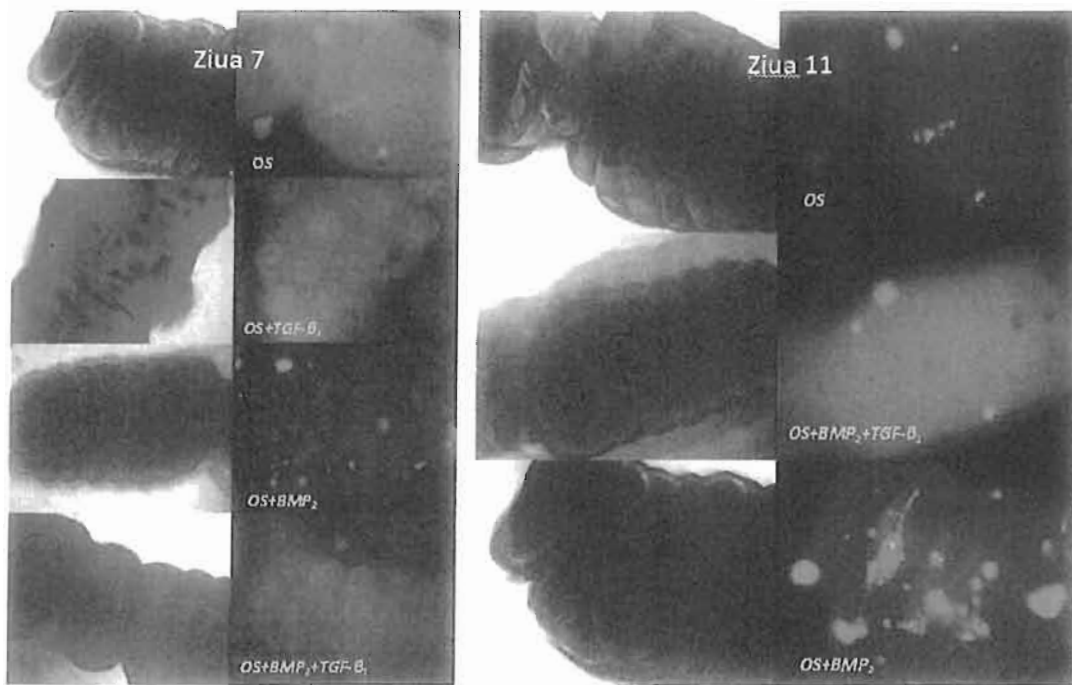


Figura 20

56

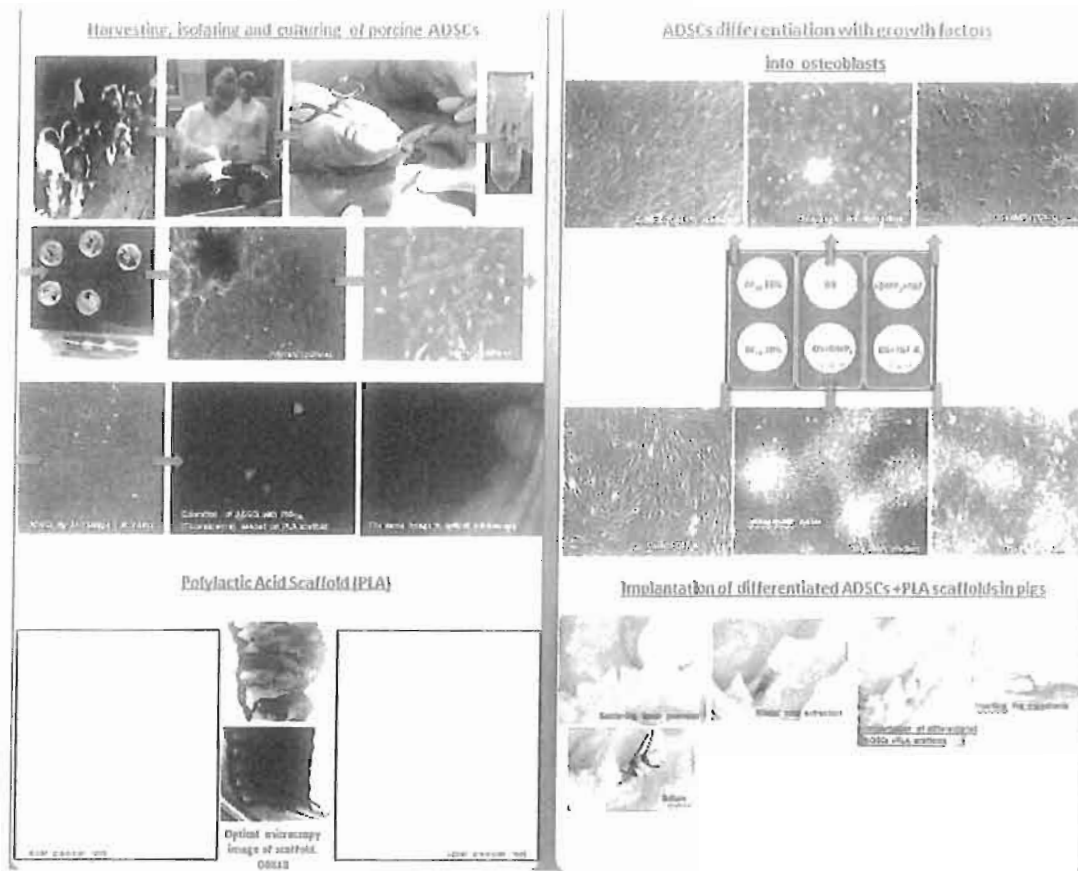


Figura 21