



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **100467** (13) **U**
(51) МПК (2015.01)

A61P 19/00

A61P 31/00

A61K 35/14 (2015.01)

A61K 35/16 (2015.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 01208**

(22) Дата подання заявки: **13.02.2015**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **27.07.2015**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **27.07.2015, Бюл.№ 14**

(72) Винахідник(и):

Комісаренко Сергій Васильович (UA),
Луговської Едуард Віталійович (UA),
Рубленко Михайло Васильович (UA),
Андрієць Володимир Григорович (UA),
Корольова Дар'я Сергіївна (UA),
Чернишенко Тамара Мартинівна (UA),
Горницька Ольга Володимирівна (UA),
Платонова Тетяна Миколаївна (UA),
Макогоненко Євген Митрофанович (UA),
Чернишенко Володимир Олександрович (UA)

(73) Власник(и):

ІНСТИТУТ БІОХІМІЇ ІМ. О.В. ПАЛЛАДІНА
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК
УКРАЇНИ,
вул. Леонтовича, 9, м. Київ, 01601 (UA)

(54) СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ АУТОЛОГІЧНОГО ФІБРИНОВОГО ГЕЛЮ ДЛЯ СТИМУЛЯЦІЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ КІСТКОВИХ І М'ЯКИХ ТКАНИН І ЗНИЖЕННЯ ІНТЕНСИВНОСТІ ЗАПАЛЬНИХ ПРОЦЕСІВ

(57) Реферат:

Спосіб одержання аутологічного фібринового гелю шляхом взаємодії плазми крові з ферментом у присутності іонів кальцію. Проводять взаємодію аутологічної плазми крові з ферментом екамуліном.

UA 100467 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до ортопедії, травматології та хірургії і може бути використана для стимуляції регенерації кісткових і м'яких тканин і зниження інтенсивності прояву запальних процесів. Аутологічний фібриновий гель дозволяє знизити алерго- та імунотенність, що підвищує ефективність лікування. У контактну ділянку вводять аутологічний

5 фібриновий гель, утворений із плазми крові пацієнта та активатора протромбіну - ферменту екамуліну з отрути ефі багатолускової.

Відомо про використання в клінічній практиці композицій на основі біополімерів (желатину, колагену, фібрину та ін.) і полієфірів (етилового, н-бутилового, 2-октилового, 2-ціанакрилового), які мають гемостатичні та репараційні властивості. Однак у цих композитів є ряд недоліків:

10 значне зниження здатності до склеювання в середовищі черевної порожнини, подразливість тканин від окремих видів адгезивів, які містять формальдегідні компоненти [1-4].

Відомо про використання фібринового клею як хірургічного адгезиву чи гемостатичного агенту в вигляді спеціальних наборів, що містять концентрований фібриноген, отриманий з плазми крові донорів, у поєднанні з білковим активатором тваринного походження, таким як

15 тромбін чи батроксобін, для одержання гетерологічного фібринового клею [5-8].

Основними недоліками препаратів, виготовлених з плазми крові донорів, є можливість розвитку алергічних реакцій на чужорідні білки, небезпека передачі гематогенних інфекцій (гепатити В, С та ВІЧ-інфекція), складність виготовлення і використання: багатостадійність, багатокомпонентність, довготривала попередня підготовка білкового препарату можливість

20 спонтанної полімеризації фібриногену у флаконі.

Найближчим аналогом аутологічного фібринового гелю є фібриновий герметик, отриманий з аутологічної крові [9], виготовлення якого проводять шляхом отримання концентрату фібриногену з плазми крові пацієнта або карантинизованої плазми крові одного донора. В подальшому до отриманого концентрату додають необхідні компоненти (тромбін, кальцію хлорид, аprotинін) та отримують фібриновий герметик. Основними недоліками цього способу є

25 використання великих об'ємів крові (60-150 мл), що обмежує використання герметика у дітей та хворих із порушеннями системи гемостазу, складність виготовлення (багатостадійність),

можливість передачі гематогенних вірусних інфекцій з препаратом тромбіну (гепатит В, С та ВІЧ-інфекція), складність визначення виходу фібриногену, що пов'язано зі збереженням умов стерильності. Крім того, для нанесення фібринового герметика на контактну ділянку необхідний спеціальний пристрій - двосекційний шприц.

Відомо, що регенерація кісток при захворюванні та переломах кісток відбувається ефективніше за присутності біологічно активних низькомолекулярних білкових компонентів плазми крові [10].

35 Задачею корисної моделі, що заявляється, є: створити простий у виконанні одностадійний спосіб одержання аутологічного вірус-безпечного фібринового гелю (далі - фібринового гелю) для клінічного використання безпосередньо перед застосуванням в ортопедії, травматології й хірургії з використанням набору для одержання фібринового гелю.

Задачу корисної моделі, що заявляється, вирішують шляхом взаємодії плазми, крові пацієнта з ферментом екамуліном як (активатором протромбіну) в присутності іонів кальцію, що забезпечує утворення тромбіну в плазмі крові та, в свою чергу, приводить до перетворення

40 фібриногену на фібрин з утворенням фібринового гелю, який має адгезивні властивості; та включенням до набору для одержання фібринового гелю необхідних стерильних компонентів: ліофілізованого ферменту екамуліну, розчину кальцію хлориду та фізіологічного розчину.

45 Фібриновий гель з власної плазми крові пацієнта сприяє зупиненню кровотечі, регенерації кісткових і м'яких тканин, знижує інтенсивність запальних процесів, виключає небезпеку інфікування, відторгнення та загрозу алергічних реакцій, забезпечує неантигенність та відсутність подразнюючої дії, відзначається високим ступенем моделювання ураженої поверхні тканин та високою щільністю прилягання до них, простотою нанесення аплікації. Виконання способу одержання фібринового гелю потребує незначної кількості крові пацієнта - 5-20 мл; швидкість утворення фібринового гелю залежить від кількості ферменту екамуліну (0,10-1,00

50 мг), доданого до плазми крові, час його утворення триває від 50 до 100 с.

Екамулін - фермент, який виділяють з отрути змії ефі багатолускової *E. multisquamatus* [11]. Фермент екамулін - ліофілізована порошкоподібна речовина білого кольору, легко розчинна в

55 воді, є активатором протромбіну.

Для приготування аутологічної композиції фібринового гелю спочатку одержують плазму з крові пацієнта, до якої додають розчин ферменту екамуліну та розчин кальцію хлориду; суміш обережно перемішують та вносять безпосередньо на уражену поверхню.

Використовують набір для одержання фібринового гелю, який включає стерильні

60 компоненти: ліофілізований фермент екамулін; розчин кальцію хлориду; фізіологічний розчин.

Приклад 1. Спосіб одержання фібринового гелю.

Для отримання аутологічної плазми крові безпосередньо перед застосуванням фібринового гелю проводять забір крові пацієнта з вени вакутайнером у кількості 5-20 мл в залежності від розмірів ураженої зони; кров центрифугують на препаративній центрифугі загального призначення протягом 10 хв. з прискоренням 1200-1400 g, потім плазму крові, яка знаходиться в супернатанті, переносять у пластикову пробірку.

Для одержання фібринового гелю до стерильної пробірки, що містить 1 мл аутологічної плазми крові, при температурі $(20 \pm 5)^\circ\text{C}$ додають 0,1 мл розчину ферменту екамуліну в фізіологічному розчині концентрації 0,15 мг/мл та 0,1 мл розчину кальцію хлориду концентрації 5 %. Через 60 ± 5 с від моменту додавання ферменту екамуліну суміш переносять на уражену зону, розподіляючи її рівномірно, де час утворення фібринового гелю від моменту змішування компонентів складає (70 ± 10) с. За необхідності час утворення фібринового гелю може бути змінений шляхом використання іншої кількості ферменту екамуліну.

Вихід - кількісний: з 1,0 мл плазми крові отримують 1,2 мл фібринового гелю.

Приклад 2.

Одержання фібринового гелю проводять, як описано в Прикладі 1, але при цьому додають 0,1 мл розчину ферменту екамуліну в фізіологічному розчині концентрації 1,0 мг/мл. Через 40 ± 5 с від моменту додавання ферменту екамуліну суміш переносять на уражену зону, розподіляючи її рівномірно, де час утворення фібринового гелю при такій концентрації екамуліну від моменту змішування компонентів складає (50 ± 5) с.

Вихід - кількісний: з 1,0 мл плазми крові отримують 1,2 мл фібринового гелю.

Приклад 3.

Одержання фібринового гелю проводять, як описано в Прикладі 1, але при цьому додають іншу кількість ферменту екамуліну, а саме: 0,1 мл розчину ферменту екамуліну в фізіологічному розчині концентрації 0,10 мг/мл. Через 80 ± 10 с від моменту додавання ферменту екамуліну суміш переносять на уражену зону, розподіляючи її рівномірно, де час утворення фібринового гелю при такій концентрації ферменту екамуліну від моменту змішування компонентів складає (90 ± 10) с. Вихід - кількісний: з 1,0 мл плазми крові отримують 1,2 мл фібринового гелю.

Приклад 4. Стимуляція репаративного остеогенезу та зниження інтенсивності запальних процесів при застосуванні фібринового гелю.

Апробацію способу, що заявляється, проводять на кролях віком 7 місяців та вагою 2 кг. Досліди проводять на моделі перелому променевої кістки шляхом проведення остеотомії діафіза променевої кістки.

Всіх експериментальних тварин після моделювання перелому поділяють на дві групи: дослідну та контрольну. Тваринам дослідної групи після проведення остеосинтезу перед накладанням швів на м'які тканини в зону перелому наносять композицію для одержання фібринового гелю через 40-60 с після змішування компонентів. При нанесенні фібринового гелю на місце перелому відмічають його високу адгезивність та щільність прилягання до ураженої поверхні. Тварин контрольної групи залишають без нанесення фібринового гелю на область перелому.

Згідно з клінічними та рентгенологічними даними на 3-ю добу після остеотомії у всіх тварин спостерігають виражені ознаки запальної реакції операційних ран, зокрема набряк, почервоніння та болючість травмованих тканин. Тварини не опираються на травмовані кінцівки. Рентгенологічно констатують поперечні переломи з добре вираженою лінією фрактури (фіг. 1, 2). Лізису країв кісткових уламків не спостерігають. Реакції з боку ендо- та periosta відсутні.

На 18-у добу після остеотомії в тварин дослідної групи відмічають відсутність ознак запалення, рентгенологічно спостерігають помірну періостальну реакцію зони перелому, утворення сполучнотканинного мозолу з добре вираженими процесами остеосклерозу (мінералізації) (фіг. 3), тварини повністю опираються на кінцівку.

Натомість у тварин контрольної групи на цей термін після остеотомії відмічають виражену набряклість м'яких тканин (фіг. 4) та помірну їх болючість при пальпації. Рентгенологічно відмічають масивну, нерівномірну періостальну реакцію, локалізовану поза зоною дефекту. Спостерігають слабко виражені тканинно-специфічні структури в ділянці дефекту з початковими етапами їх мінералізації.

При застосуванні фібринового гелю на уражених тканинах живого організму відмічають його неантигенність, відсутність подразнюючої дії на прилеглі тканини, високий ступінь моделювання ураженої поверхні, простоту аплікації, швидке утворення водо- та повітронепроникного желеподібного гелю.

Інтенсивне зниження запального процесу в місці застосування аутолітичного фібринового гелю, порівняно з контролем, свідчить про відсутність подразнювальної та імуностимулюючої дії гелю, що заявляється.

Таким чином, показано, що застосування фібринового гелю, що заявляється, стимулює репаративні процеси остеогенезу та сприяє зниженню запального процесу.

Приклад 5. Стимуляція регенерації тканин печінки. Операцію проводять методом лапаротомії на безпородних собаках. На латеральній стороні правої долі печінки роблять розріз довжиною 4 см та глибиною 0,8-1 см. У контролі після зупинки кровотечі накладають вузлові шви з кетгуту (фіг. 5). У досліді собаки перед закриттям черевної порожнини на рану печінки наносять композицію для одержання фібринового гелю через 30-40 с після змішування компонентів (фіг. 6).

За тваринами ведуть спостереження та проводять релапаротомію на 6-у добу для аналізу стану швів. Головною відмінною ознакою рани печінки собаки в досліді на 6-у добу після операції є адгезія сальника до поверхні рани в випадку використання фібринового гелю (фіг. 7). Сальник зростається з капсулою печінки тонкою смужкою лише в ділянці розрізу та легко відпрепарується, залишаючи незначні ерозивні дефекти капсули печінки та капілярну кровотечу, яка зупиняється самостійно. Візуально паренхіма печінки в зоні поверхні рани суттєво не відрізняється від здорової. У даній ділянці на поверхні вже починає проглядатися типовий органний малюнок, а сама вона набуває темно-червоного кольору. Лише по лінії розрізу під самою капсулою проглядається тоненька (близько 1 мм) світла смужка, що свідчить про помірний розвиток сполучної тканини. Шви слабо візуалізуються, їх можна помітити лише за "втисненнями" на капсулі печінки.

У контролі адгезивних явищ з боку очеревини чи сальника собаки не спостерігається (фіг. 8). Проте відмічається більш потужна сполучнотканинна реакція, яка яскраво виражена з боку капсули печінки. Так, остання суттєво потовщена не тільки вздовж місця розрізу, а й виходить за межі накладених швів та повністю покриває їх зверху, у зв'язку з чим має випинання над поверхнею в місцях зав'язаних вузлів. Поряд з цим паренхіма печінки навколо травмованої ділянки має світліший колір, що свідчить про суттєвий розвиток післяопераційного запального процесу та пов'язані з ним дегенеративно-дистрофічні зміни гепатоцитів. Органний малюнок у цій ділянці не проглядається. Поряд з цим, добре візуалізуються й самі шви, які в даний період знаходяться лише на початковій стадії їх резорбції. При цьому навколо них відмічається потужна сполучнотканинна реакція.

Таким чином, макроморфологічна характеристика загоєння рани печінки свідчить, що застосування фібринового гелю сприяє швидкому загоєнню рани печінки, в основному, за рахунок активації паренхіматозного регенеративного потенціалу та, в меншій мірі, сполучнотканинного. При цьому фібриновий гель обмежує та помірно знижує розвиток посттравматичної запальної реакції, що візуально свідчить про значно меншу зону дистрофічних уражень.

Приклад 4. Набір для одержання фібринового гелю.

При виконанні способу, що заявляється, використовують набір для одержання фібринового гелю з 10 мл плазми крові, до якого входять наступні стерильні компоненти:

- ліофілізований фермент екамулін у флаконах - 0,10; 0,15; 1,00 мг;
- фізіологічний розчин в ампулі - 1,0 мл; 3 ампули;
- розчин кальцію хлориду концентрації 5 % в ампулі - 1,0 мл; 3 ампули.

У флакон з ліофільно висушеним ферментом екамуліном вносять 0,1 мл фізіологічного розчину; реагент готовий для використання через 20 хв. після розчинення.

Таким чином, створено новий оригінальний одностадійний спосіб одержання аутологічного фібринового гелю для стимуляції регенерації кісткових і м'яких тканин і зниження інтенсивності запальних процесів у людини і тварини з використанням набору для одержання аутологічного фібринового гелю.

Перевагами способу, що заявляється, є:

- одностадійність одержання фібринового гелю з плазми крові пацієнта безпосередньо перед клінічним застосуванням, що значно спрощує технологію та скорочує час його одержання порівняно з аналогами;
- невеликий за об'ємом відбір крові пацієнта - 10-20 мл (проти 60-150 мл, як у найближчого аналога);
- швидке утворення водо- та повітронепроникного аутологічного фібринового гелю на ураженій поверхні (45-100 с від моменту змішування компонентів);
- інфекційна безпечність завдяки використанню ферменту екамуліну як активатора протромбіну (замість тромбіну, як в аналогах);

- неантигенність та відсутність подразнюючої дії аутологічного фібринового гелю на прилеглі тканини;

- простота нанесення аплікації, високий ступінь моделювання ураженої поверхні, висока щільність прилягання до тканин фібринового гелю;

5 - стимулювання регенерації кісткових і м'яких тканин та зниження інтенсивності запальних процесів людини та тварини.

- використання набору для одержання аутологічного фібринового гелю.

Аутологічний фібриновий гель може бути рекомендований для застосування в ортопедії, травматології, хірургії.

10 Перелік використаних джерел:

1. Истратов Л.П., Абоянц Р.К., Истратова Е.В. Местные гемостатические средства на основе коллагена Хирургия - 2006.- Т. 08, № 2. - С. 4-8; Авторское свидетельство РФ № 725289 от 31.07.1975 г.; патент РФ № 2156140 от 17.11.1999 г.

15 2. Попов В.А., Сиротинкин Н.В., Головаченко В.А. Латексный тканевой клей и его применение в хирургии. - Полимеры и медицина. - 2006. - 1. - С. 25-26.

3. RU 2157243, опубл. 10.10.2000.

4. RU 2242987, опубл. 27.12.2004.

5. Pat. US 8491564, July 23, 2013.

6. App. US 20130299407 A1, Nov.14, 2013].

20 7. Пат. UA 10419, опубл. 25.12.1996.

8. RU 2193868, опубл. 10.12.2002 р.

9. Пат. RU 2143924, опубл. 10.01.2000.

25 10. Гребнева О.Л., Самусенко Д.В., Ковинька М.А., Лунева С.Н. Компоненты фракционированной плазмы крови и их роль в механизме оптимизации репаративного остеогенеза // Гений ортопедии. - 2013. - № 2. - С. 102-105].

11. Соловьев Д.А., Платонова Т.Н., Угарова Т.П., Выделение и характеристика экамулина - активатора протромбина из яда эфы многочешуйчатой Echis multisquamatus. // Биохимия. - 1996. - Т.61. - вып.6. - С. 1094-1105.

30

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб одержання аутологічного фібринового гелю шляхом взаємодії плазми крові з ферментом у присутності іонів кальцію, який **відрізняється** тим, що проводять взаємодію аутологічної плазми крові з ферментом екамуліном.

35 2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що аутологічну плазму крові людини чи тварини змішують із розчином ферменту екамуліну концентрації 0,10-1,00 мг/мл при об'ємному співвідношенні 1:0,1, додаючи 0,1 мл розчину кальцію хлориду концентрації 5 %.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що використовують набір для одержання аутологічного фібринового гелю, який містить стерильні компоненти:

40 ліофілізований фермент екамулін у флаконах, мг - 0,01; 0,15; 1,00;

розчин кальцію хлориду концентрації 5 % в ампулах, мл - 1,0;

фізіологічний розчин у ампулах, мл - 1,0.



Фіг. 1

Рентгенограма кінцівки кроля дослідної групи на 3 добу



Fig. 2

Рентгенограма кінцівки кроля контрольної групи на 3 добу



Fig. 3

Рентгенограма кінцівки кроля дослідної групи на 18 добу



Fig. 4

Рентгенограма кінцівки кроля контрольної групи на 18 добу

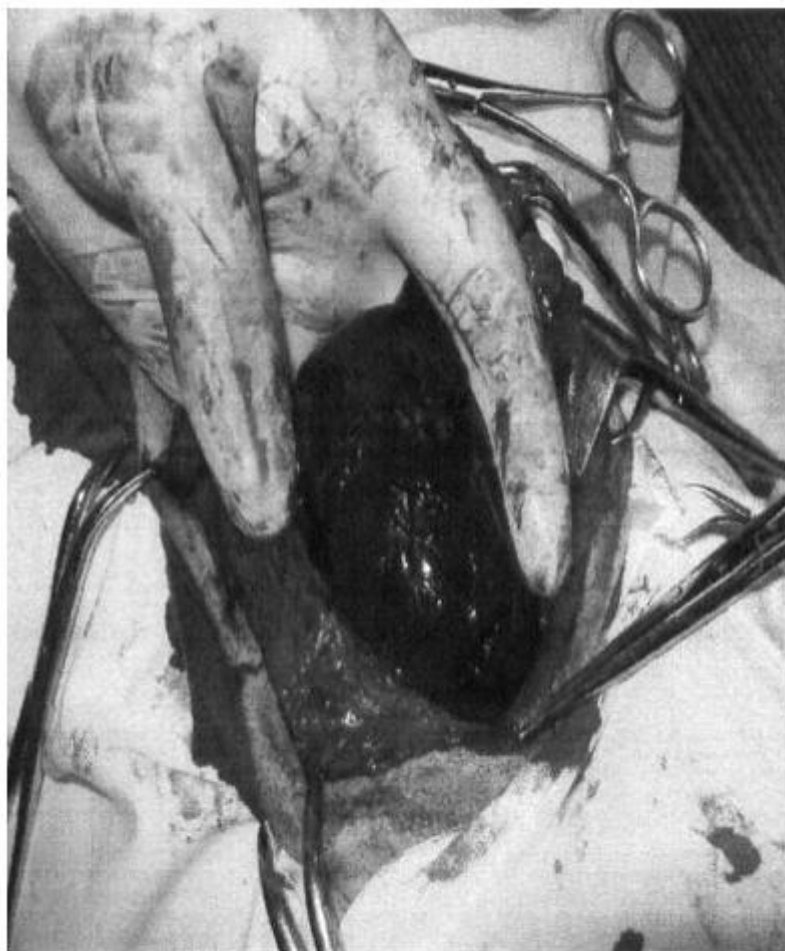


Fig. 5

Шви на печінці собаки до нанесення фібринового гелю



Фіг. 6

Шви на печінці після нанесення фібринового гелю

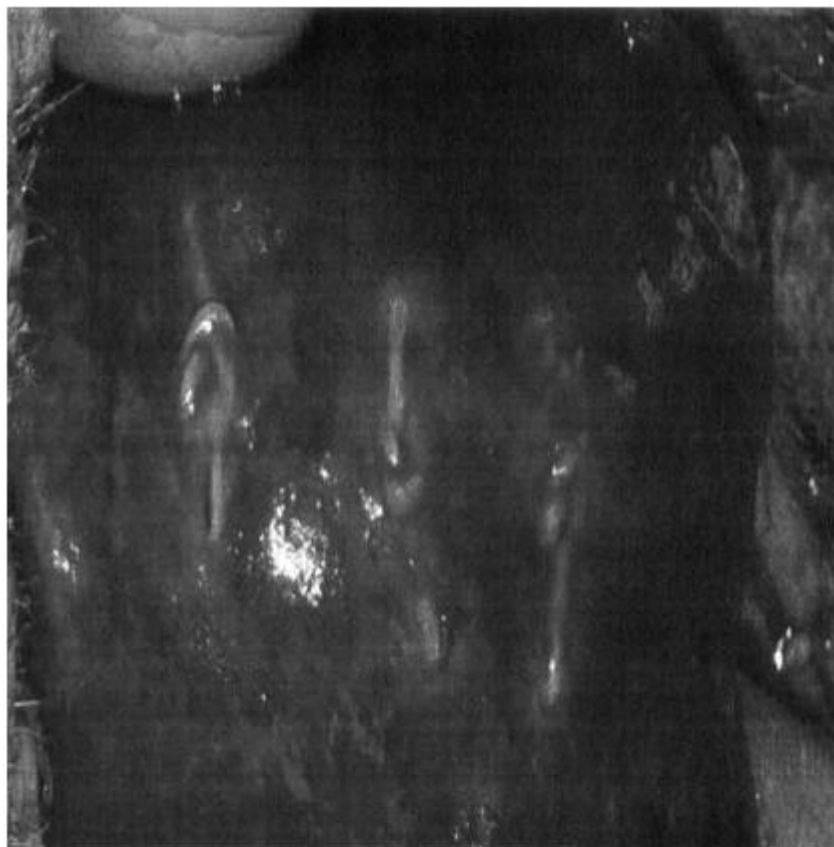


Fig. 7

Шви на рані печінки собаки у контролі на 6-у добу



Фіг. 8

Шви на рані печінки собаки у досліді на 6-у добу

Комп'ютерна верстка Д. Шеверун

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601