



УКРАЇНА

(19) UA (11) 60872 (13) A

(51) 7 A61F2/28, A61F2/02,
A61L24/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВІНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ВІДНОВЛЕННЯ ТА ЗАПОВНЕННЯ ДЕФЕКТІВ ХРЯЩА

1

2

(21) 2003032503

(22) 24 03 2003

(24) 15 10 2003

(46) 15 10 2003, Бюл. № 10, 2003 р.

(72) Герус Галина Борисівна, Головка Валерій
Олексійович(73) ХАРКІВСЬКА ДЕРЖАВНА ЗООВЕТЕРИНАР-
НА АКАДЕМІЯ(57) Спосіб відновлення та заповнення дефектів
хряща, який включає застосування тканинних клі-
тин, який відрізняється тим, що як клітинну бла-
стему використовують мезенхімальні клітини, куль-
тивовані в агарі, які фіксують у дефекті хряща ме-
дичним клеєм

Винахід відноситься до біотехнології, а саме до культивування клітинних культур і тканин, і може бути використаний в клінічній експериментальній ортопедії та травматології.

Відомий "Спосіб виготовлення протеза для заміщення суглобового хряща з алогенного або ксеногенного матеріалу", патент Великобританії, заявка №2175506, ICM, 1986, 16, С 42, A61F1/00 УДК 615 47, опубл. 08 12 1986, №49

Відомий також "Спосіб заповнення дефектів хряща у тварин за допомогою складу, до якого входить матриця, що біологічно розкладається", патент США №5206023, ICM, 1994, 22-24, С 105 A61F2/02, A61L37/22, C07L15/06, C09H3/02, опубл. 27 04 93 T1149 №4

Проте ефективність даного способу низька, тому що ксеногенний матеріал відторгається організмом тварин.

Найбільш близьким за технічною сутністю є "Спосіб заповнення дефектів хряща за допомогою фібрино-клітинної суспензії", WO9603160A1 (US) 26 07 95, 08 02 96 A61L25/00, ICM, 1996, 24, С 13 E Vacant Charles A, Randolph Mork A, Sims C Derek Butler Peter E M

Для регенерації використовують хрящові клітини в суміші з фібриногеном, який утворює згустки при контакті з тромбіном або іншою сериною естеразою. У кращому варіанті хрящові клітини і фібриноген є аутологічними, отриманими за допомогою біопсії і криогенної обробки плазми. Проте ефективність даного способу низька, тому що необхідно проводити біопсію аутологічної тканини даного виду тварини.

В основу винаходу поставлена задача - удосконалити спосіб відновлення та заповнення де-

фектів хряща, який дозволив би оптимізувати регенерацію дефектів суглобового хряща, що дасть можливість підвищити ефективність лікування.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі відновлення та заповнення дефектів хряща, який включає застосування тканинних клітин, згідно винаходу, в якості клітинної бластери використовують мезенхімальні клітини, культивовані в агарі, і фіксують у дефекті хряща медичним клеєм.

Мезенхімальні клітини, культивовані в агарі, отримані з зачатків кінцівок курячих ембріонів, можуть бути використані в якості клітинної бластери для регенерації поверхневих дефектів суглобного хряща.

Істотними відмінностями запропонованого способу є вибір спеціальних клітин для одержання культури клітин із хрящовою цитодеференціровкою. У якості субстрату для культивування використано (обрано) агаровий гель, що дозволило одержати об'ємну культуру. При культивуванні ж мезенхімальних клітин зачатків кінцівок та ізольованих хондроцитів у вигляді моношару на склі, останні втрачають здатність до хрящової цитодеференціровки, а хондроцити метаболізують у фібропласти.

Приклад конкретного виконання

Спосіб здійснюється таким чином

Клітини з зачатків кінцівок ембріонів курки виділяють за методикою Handhary G. Суспензію клітини (кінцева концентрація 200000кл/мл середовища) змішують у співвідношенні 1:1 із 0,6% агаром і наносять на приготовлену агарову підложку в 60мл чашках Петрі. Після загуснення агару з клітинами до чашки Петрі вносять 1,5-2см³ живильного середовища 199, що містить 20% ембріона-

(19) UA (11) 60872 (13) A

льної сироватки телят, яка містить антибіотики (пеніцилін і стрептоміцин). Інкубацію проводять при температурі 37° в атмосфері 5% CO₂ і 95% повітря (на відміну від звичайного культивування клітин) протягом 5 днів.

При культивуванні в агарі хондроцити формують скупчення округлих клітин - колоній.

При мікроскопічному дослідженні кількість клітин у колоніях на 5-й день культивування складає від 30 до 50. Характерним було виражене диференціювання клітин у напрямку мезенхімальні → хондробластоподібні → хондроцит. Навколо хондроцитів виявляються капсули, клітини мають площі гіперхромні ядра і бувають оточені невеликою кількістю базofilної цитоплазми. Між клітинами виявляють матрикс, який складається з волокон і альцанпозитивного субстрату.

Отриману структуру мезенхімальних клітин із хрящовою цитодиференціювкою використовують при вивченні можливості її застосування в якості клітинної бластени, для репаративної регенерації суглобового хряща.

Експерименти по вивченню регенерації хрящової тканини були проведені на 30 статевозрілих кроликах породи Шиншила річного віку в двох серіях експерименту. Тваринам в умовах операційної під анестезією тіопенталу натрію за допомогою зуболікарського бура (діаметр 1 мм) відтворювали дефекти (на 1/2 товщини суглобового хряща) у міжвиростковій зоні дистального відділу стегнової кістки.

У дослідній серії у дефект суглобового хряща імплантували агарові блоки з мезенхімальними клітинами нирок кінцівок курячих ембріонів, які культивували протягом 5 діб. Агаровий блок попередньо обробляли в середовищі, що містить тромбін. Для закріплення агарового блока в дефекті поверх наносили медичний клей КМ-3, що складається з 2,7 частини клейової субстанції і 0,3 частини отверджувача.

У контрольній групі №1 - дефект у суглобовому хрящі нічим не заповнювали.

У контрольній групі №2 - дефект у суглобовому хрящі заповнювали агаром без клітин.

Про результати регенерації судили через 3 і 6 місяців після операції. Тварини були виведені з дослідження шляхом введення повітря до вушної вени.

Використано гістологічні методи дослідження з морфометричною оцінкою зони регенерату. Голівки стегнових кісток кролів фіксували в суміші спирт +10% нейтральний формалін (4:1), зневоднювали в спиртах зростаючої міцності й укладали у парафін. Зрізи товщиною 3-5 мкм були пофарбовані гематоксиліном і еозин, толудидиновим синім і пікросіріусом червоним і досліджені у світловому мікроскопі "Rathenov".

При вивченні головок стегнових кісток тварин контрольної серії №1 і №2 встановлено, що через 3 місяці після операції зона дефекту чітко визначалася і була заповнена бурими масами.

Мікроскопічно у зоні дефекту виявили поля пухкої сполучної волокнистої тканини. Краї суглобового хряща, звернені до дефекту, були нерівними, узурованими з осередками фібриляції. У суглобовому хрящі поблизу дефекту визначали безклітинні ділянки, осередки демаскованих колагенових волокон. Суглобовий хрящ віддалених від дефекту ділянок характеризувався вираженим порушенням цитоархитектоніки, великими безклітинними полями, осередками розволокнення матрикса і гіперплазією хондроцитів у крайових відділах.

У дослідній серії при макроскопічному дослідженні голівки стегнової кістки дефект у суглобовому хрящі визначали з трудом у вигляді невеличкої поглиблення, заповненого білястою тканиною. Мікроскопічно зона дефекту була виконана гіаліновою хрящовою тканиною, що не має характерної позиційної специфічності.

Використання способу відновлення та заповнення дефектів хряща дозволяє реставрувати дефекти суглобового хряща різного генезу посттравматичних, дистрофічних (остеоартричних і кістозних порожнин) і тим самим підвищує ефективність лікування.