

**УКРАЇНА****(19) UA (11) 79708 (13) U**
(51) МПК**A61B 10/02 (2006.01)****G01N 33/483 (2006.01)****ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ****(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: u 2012 13453	(72) Винахідник(и): Корж Микола Олексійович (UA), Радченко Володимир Олександрович (UA), Дєдх Нінель Василівна (UA), Малишкіна Світлана Володимирівна (UA), Нікольченко Ольга Анатоліївна (UA), Побєл Євген Анатолійович (UA), Костєрін Сергій Борисович (UA), Чєпурний Віктор Андрійович (UA)
(22) Дата подання заявки: 26.11.2012	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.04.2013	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.04.2013, Бюл.№ 8	(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПАТОЛОГІЇ ХРЕБТА ТА СУГЛОБІВ ІМ. ПРОФ. М.І. СИТЕНКА НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ", вул. Пушкінська, 80, м. Харків-24, 61024 (UA)

(54) СПОСІБ ПРОГНОЗУВАННЯ ПЕРЕБІГУ РЕГЕНЕРАЦІЇ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ**(57) Реферат:**

Спосіб прогнозування перебігу регенерації кісткової тканини шляхом вилучення кісткового мозку, приготування суспензії клітин кісткового мозку, висівання клітин кісткового мозку та їх культивування у живильному середовищі до утворення колоній фібробластів, обчислення кількості колоній фібробластів та порівняння її з контрольною кількістю колоній фібробластів, утворених з ідентичної кількості висіяних клітин кісткового мозку. Кістковий мозок вилучають з інтактної кістки лабораторного щура, клітини кісткового мозку одночасно висівають у рівних кількостях, принаймні у шести окремих ємностях, у трьох з яких містять контрольні проби, а у трьох інших - дослідні проби, і культивують у живильному середовищі впродовж однакового періоду часу, принаймні шести діб, з утворенням в результаті контрольної культури клітин у ємностях з контрольними пробамі та дослідної культури клітин у ємностях з дослідними пробамі. Порівнюють кількість утворених колоній фібробластів у дослідній та контрольній культурах клітин обчисленням їх співвідношення і за його значенням оцінюють ступінь інтенсивності регенерації кісткової тканини.

UA 79708 U

Корисна модель належить до медицини, а саме до ортопедії та травматології, і може бути використана для прогнозування перебігу регенерації кісткової тканини у пацієнтів з ушкодженнями довгих кісток та хребта.

Незважаючи на те, що при репаративному остеогенезі є всі передумови для повного відновлення кісткових структур замість втрачених або ушкоджених, відсоток незрощень та тяжких ускладнень після травматичних ушкоджень на сьогодні залишається доволі високим. Для здійснення ефективної тактики медикаментозного лікування пацієнтів з переломами довгих кісток та ушкодженнями хребта після проведення реконструктивно-відновних операцій шляхом використання остеостимуляторів та регуляторів остеогенезу існує необхідність в прогнозуванні перебігу регенерації кісткової тканини.

Відомо прогнозування перебігу регенерації кісткової тканини при дистракційному остеосинтезі з використанням сироватки крові пацієнтів. Сироватка крові забезпечує системну регуляцію репаративного остеогенезу, оскільки в ній є різні біологічно активні речовини (гормони, фактори росту цитокіни та ін.), які здатні регулювати проліферацію, ріст, диференціацію остеогенних клітин-попередників кісткового мозку та впливати на перебіг регенерації кісткової тканини. Порушення метаболічного стану організму при травмах, захворюваннях та при старінні супроводжується зміною показників вмісту цих регуляторних факторів, що провокує розлад репаративного остеогенезу на різних його стадіях та призводить до затримання формування кісткового регенерату. Саме завдяки зазначеним властивостям сироватки крові її використання забезпечує можливість прогнозувати перебіг регенерації кісткової тканини.

Відомо спосіб прогнозування активності репаративного остеогенезу при дистракційному остеосинтезі, згідно з яким визначають вміст у сироватці крові пацієнта лактатдегідрогенази, піровіноградної кислоти, загального білка, сечовини, натрію, калію, фосфору, а у сечі - кальцію, фосфору до операції, перед початком дистракції та через 10 діб після початку дистракції і по співвідношенню величин цих показників до операції, перед початком дистракції та в процесі дистракції прогнозують перебіг регенерації кісткової тканини (а. с. СРСР № 1103851, М. кл. А61В 10/00, опубл. 23.07.1984).

Відомий спосіб має істотні недоліки. По-перше, його використання пов'язане з необхідністю триразового використання значної кількості показників, для яких потрібне спеціальне обладнання, придбання та приготування значної кількості різних хімічних реактивів, що затримує одержання результатів та спричиняє значні матеріальні витрати на реалізацію способу. По-друге, відомий спосіб не дає можливості прогнозувати перебіг регенерації кісткової тканини до початку дистракції, внаслідок чого лікар не може заздалегідь планувати застосування стимуляторів регенерації кісткової тканини. Це може призводити до затримки формування кісткового регенерату. Крім цього окремі показники, а саме концентрація у сироватці крові калію, натрію та лактату дегідрогенази не відображає специфічності процесу регенерації кісткової тканини, що обмежує застосування відомого способу за наявності супутньої (інтеркурентної) патології.

Відомо спосіб оцінювання перебігу остеогенезу під час хірургічного лікування незрощень кісток, згідно з яким через місяць після виконання закритого дистракційного остеосинтезу визначають у сироватці крові хворого шляхом біохімічного дослідження активність кісткових ізоферментів лужної та кислої фосфатази, обчислюють відношення активності кісткових ферментів лужної фосфатази до активності кісткових ферментів кислої фосфатази і при його значеннях, що дорівнюють 22 та менше перебіг остеогенезу вважають уповільненим, а при значеннях, що дорівнюють 28 та більше - нормальним (патент Російської Федерації № 2311644 (С1), М. кл. G01N 33/573, опубл. 27.11.2007).

Відомий спосіб дає можливість виявити уповільнення перебігу регенерації кісткової тканини та провести медикаментозне лікування для прискорення утворення кісткового регенерату, але має істотний недолік. Недоліком є те, що визначення ступеня інтенсивності перебігу регенерації кісткової тканини здійснюють на пізніх стадіях формування кісткового регенерату - через місяць після проведення операції, коли вже може сформуватися несправжній суглоб і подальша стимуляція остеогенезу вже не буде ефективною. Тобто у разі уповільнення регенерації кісткової тканини втрачається час для активного втручання у репаративний процес з метою стимуляції формування кісткового регенерату, що знижує ефективність використання відомого способу.

За найближчий аналог технічного рішення, що заявляється, вибрано спосіб прогнозування перебігу регенерації кісткової тканини, згідно з яким вилучають кістковий мозок, готують суспензію клітин кісткового мозку, висівають клітини кісткового мозку та культивують їх у живильному середовищі до утворення з них колоній фібробластів, обчислюють кількість колоній

фіброblastів та порівнюють її з контрольною кількістю колоній фіброblastів, утворених з ідентичної кількості висіяних клітин кісткового мозку. За результатом цього порівняння визначають інтенсивність остеогенезу кісткової тканини. Процедуру вилучення кісткового мозку, приготування суспензії клітин кісткового мозку, їх висівання та культивування, а також обчислення кількості сформованих колоній фіброblastів з метою визначення інтенсивності остеогенезу, наприклад в оперованій великогомілковій кістці при її подовженні апаратом Ілізарова, здійснюють кілька разів: до операції та після неї у різні терміни подовження кістки (через два тижні - один місяць дистракції, фіксації). При цьому кожного разу виконують біопсію кісткового мозку пункцією інтактної кістки, наприклад плечової кістки пацієнта, і при порівнянні за контрольну кількість сформованих колоній фіброblastів обирають її кількість одержану у попередній процедурі, що починалась з вилучення кісткового мозку та закінчувалась обчисленням кількості колоній фіброblastів (а. с. CPCP № 1176207, М. кл. G01N 1/28, A61B 10/00, опубл. 30.08.1985).

Недоліком відомого способу, вибраного за найближчий аналог технічного рішення, що заявляється, по-перше, є те, що його реалізація пов'язана з необхідністю вилучення кісткового мозку із здорової кістки пацієнта, що є для пацієнта болісною та травматичною процедурою. По-друге, реалізація способу займає доволі тривалий період часу, оскільки потрібне триразове вилучення кісткового мозку та культивування клітин кісткового мозку впродовж семи - чотирнадцяти діб, а його повне здійснення займає період часу від двадцять однієї доби до сорока двох діб. Це не дає можливості скоригувати порушення процесу репаративного остеогенезу на його ранніх стадіях так, щоб виправити порушення нормального перебігу, що істотно зменшує ефективність відомого способу і навіть ставить під загрозу можливість правильної корекції репаративного остеогенезу.

Задача корисної моделі, що заявляється, полягає у створенні такого способу прогнозування перебігу регенерації кісткової тканини, в якому б за рахунок зміни об'єкта, з якого вилучають кістковий мозок, проведення прогнозування на основі визначення впливу сироватки крові пацієнта, вибору певного порядку та певних термінів здійснення операцій способом, а також вибору іншої бази для порівняння одержаних результатів визначення кількості утворених колоній фіброblastів забезпечувалось скорочення періоду часу, потрібного для реалізації способу, при одночасному виключенні травматизації пацієнта.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі прогнозування перебігу регенерації кісткової тканини шляхом вилучення кісткового мозку, приготування суспензії клітин кісткового мозку, висівання клітин кісткового мозку та їх культивування у живильному середовищі до утворення колоній фіброblastів, обчислення кількості колоній фіброblastів та порівняння її з контрольною кількістю колоній фіброblastів, утворених з ідентичної кількості висіяних клітин кісткового мозку, згідно з корисною моделлю, кістковий мозок вилучають з інтактної кістки лабораторного щура, клітини кісткового мозку одночасно висівають у рівних кількостях, принаймні у шести окремих ємностях, у трьох з яких їх висівають як контрольні проби, а у трьох інших - як дослідні проби, і культивують у живильному середовищі впродовж однакового періоду часу, принаймні шести діб, з утворенням в результаті контрольної культури клітин у ємностях з контрольними пробамі та дослідної культури клітин у ємностях з дослідними пробамі, потім культивують впродовж однакового періоду часу, принаймні семи-десяти діб, контрольну культуру клітин у живильному середовищі з вмістом стандартної ембріональної сироватки крові телят і дослідну культуру клітин у живильному середовищі з вмістом сироватки крові обстежуваного пацієнта, порівнюють кількість утворених колоній фіброblastів у дослідній та контрольній культурах обчисленням їх співвідношення і за його значенням оцінюють ступінь інтенсивності регенерації кісткової тканини.

Вилучення кісткового мозку з інтактної кістки лабораторного щура дає можливість запобігти травматизації пацієнта при реалізації способу і здійснити прогнозування перебігу регенерації кісткової тканини на основі аналізу впливу складу сироватки крові обстежуваного пацієнта на інтенсивність процесу клонування клітин кісткового мозку. Висівання клітин кісткового мозку у рівних кількостях, принаймні у шести окремих ємностях, у трьох з яких містять контрольні проби, а у трьох інших - дослідні проби, дає можливість здійснити статистично вірогідне оцінювання і одночасно одержати порівнянні результати. Культивування клітин кісткового мозку впродовж однакового періоду часу, принаймні шести діб, з утворенням в результаті контрольної культури клітин у ємностях з контрольними пробамі та дослідної культури клітин у ємностях з дослідними пробамі забезпечує можливість подальшого виявлення реакції культивованих клітин на сироватку крові. Культивування впродовж однакового періоду часу, принаймні семи-десяти діб, контрольної культури клітин у живильному середовищі з вмістом стандартної ембріональної сироватки крові телят і дослідної культури клітин у живильному середовищі з

вмістом сироватки крові обстежуваного пацієнта забезпечує утворення достатньої кількості колоній фібробластів у контрольній та дослідній культурах. Порівняння кількості утворених колоній фібробластів у дослідній та контрольній культурах шляхом обчислення їх співвідношення забезпечує можливість кількісної оцінки ступеня відхилення інтенсивності

5 остеогенезу від норми в залежності від значення цього співвідношення в результаті одноразово проведеної процедури його визначення, що дає можливість скоротити період часу, потрібний для здійснення способу прогнозування перебігу регенерації кісткової тканини, та завдяки цьому визначити репаративний потенціал пацієнта до проведення хірургічної операції або у ранньому післяопераційному періоді.

10 Корисна модель пояснюється фігурами креслень, де фіг. 1 - фотовідбиток, на якому зображені колонії фібробластів, утворені у дослідній культурі на десяту добу їх культивування; фіг. 2 - фотовідбиток, на якому зображені колонії фібробластів, утворені у контрольній культурі на той же момент закінчення процесу культивування, що і для дослідної культури.

Спосіб прогнозування перебігу регенерації кісткової тканини здійснюють таким чином.

15 Вилучають кістковий мозок з інтактною кісткою лабораторного щура, зокрема молодого білого щура. Відомим способом готують живильне середовище для вирощування стромальних клітин кісткового мозку на основі стандартних живильних середовищ, наприклад DMEM та F12, антибіотиків, наприклад стрептоміцину і пеніциліну, та стандартної ембріональної сироватки крові телят. Одночасно висівають клітини вилученого кісткового мозку лабораторного щура у

20 рівних кількостях, принаймні, у шести окремих ємностях, у трьох з яких їх висівають як контрольні проби і у трьох інших - як дослідні проби, і культивують у живильному середовищі впродовж однакового періоду часу, принаймні шести діб. В результаті у ємностях з контрольною пробкою одержують контрольну культуру клітин, у ємностях з дослідною пробкою - дослідну культуру клітин. Далі культури клітин культивують впродовж принаймні семи - десяти діб, у

25 живильному середовищі з вмістом стандартної ембріональної сироватки крові телят у ємностях з контрольною культурою і сироватки крові досліджуваного пацієнта у ємностях з дослідною культурою. Сироватку крові пацієнта готують до проведення операції. Кров беруть з вени пацієнта. Сироватку крові завчасно дезактивують нагріванням до температури 56 °C впродовж 30 хвилин. Культивування дослідної та контрольної культур клітин закінчують одночасно. В

30 результаті одержують у дослідній та контрольній культурах клітин достатню кількість колоній фібробластів. Обчислюють кількість утворених колоній фібробластів окремо у дослідній та контрольній культурах та порівнюють між собою одержані результати. Якщо кількість колоній фібробластів, утворених у дослідній культурі, становить 95-100 % їх кількості, утвореної у контрольній культурі, роблять висновок, що у пацієнта, для якого проводилося прогнозування перебігу регенерації кісткової тканини, після проведення реконструктивно-відновної операції репаративний остеогенез буде перебігати активно, тобто цей пацієнт має достатньо високий

35 остеорепаративний потенціал.

3 фіг. 1 і фіг. 2 видно, що для даного конкретного обстеженого пацієнта кількості колоній фібробластів, утворених в результаті культивування стромальних клітин кісткового мозку щура

40 у дослідній культурі ($25,6 \pm 3,9$) та контрольній культурі ($22,5 \pm 3,2$), вірогідно не відрізняються одна від одної. Тобто цей пацієнт має доволі високий остеорепаративний потенціал.

Для експериментального підтвердження способу, згідно з корисною моделлю, що заявляється, були виконані дослідження з прогнозування перебігу регенерації кісткової тканини у 6 практично здорових пацієнтів молодого та старшого віку ($21 \pm 2,5$ і $65 \pm 2,5$ років), які

45 добровільно дали згоду на включення їх у дослідження. Спосіб прогнозування, згідно з корисною моделлю, було здійснено тричі для кожного пацієнта. Як показали результати дослідження, кількість колоній фібробластів, утворених у контрольній культурі, дорівнювала $24,2 \pm 2,7$; $25,9 \pm 3,2$; $23,9 \pm 2,5$. У пацієнтів молодшого віку у дослідній культурі було утворено відповідно $26,3 \pm 2,5$; $24,2 \pm 2,4$; $25,1 \pm 3,3$ колоній фібробластів, у пацієнтів старшого віку -

50 відповідно $14,6 \pm 1,9$; $15,8 \pm 1,5$; $13,7 \pm 1,7$ колоній. Одержані дані свідчать про те, що показники кількості утворених колоній фібробластів молодих пацієнтів мало відрізнялися від результатів, одержаних у контрольній культурі. Це свідчить про високий остеорепаративний потенціал у молодих пацієнтів. У пацієнтів старшого віку спостерігався знижений остеорепаративний потенціал, оскільки кількість утворених колоній фібробластів становила приблизно 59,7 %

55 відносно їх кількості, утвореної у контрольній культурі, що підтверджує наявність істотного зниження інтенсивності репаративного остеогенезу у пацієнтів старшого віку. Літературні дані свідчать про істотні зміни у складі компонентів сироватки крові у людей зі зміною віку та за наявності різних захворювань, що, як показало виконане дослідження, проявляється у вигляді негативного впливу у культурі клітин на активність стромальних клітин кісткового мозку,

60 відповідальних за остеогенну активність. Проведене дослідження підтверджує можливість

застосування пропонованого способу для прогнозування перебігу регенерації кісткової тканини з використанням сироватки крові пацієнта та клітин кісткового мозку дрібних лабораторних тварин, зокрема молодих білих щурів.

Таким чином, завдяки можливості визначення остеорепаративного потенціалу пацієнта згідно з запропонованою корисною моделлю забезпечується скорочення періоду часу, потрібного для реалізації способу, при одночасному виключенні травматизації пацієнта. Цим забезпечується можливість своєчасного проведення консервативного лікування медикаментозними препаратами у цілях скорочення періоду відновлення кісткової тканини і підвищення якості кісткового регенерату.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб прогнозування перебігу регенерації кісткової тканини шляхом вилучення кісткового мозку, приготування суспензії клітин кісткового мозку, висівання клітин кісткового мозку та їх культивування у живильному середовищі до утворення колоній фібробластів, обчислення кількості колоній фібробластів та порівняння її з контрольною кількістю колоній фібробластів, утворених з ідентичної кількості висіяних клітин кісткового мозку, який **відрізняється** тим, що кістковий мозок вилучають з інтактної кістки лабораторного щура, клітини кісткового мозку одночасно висівають у рівних кількостях, принаймні у шести окремих ємностях, у трьох з яких містять контрольні проби, а у трьох інших - дослідні проби, і культивують у живильному середовищі впродовж однакового періоду часу, принаймні шести діб, з утворенням в результаті контрольної культури клітин у ємностях з контрольними пробамі та дослідної культури клітин у ємностях з дослідними пробамі, потім культивують впродовж однакового періоду часу, принаймні семи-десяти діб, контрольну культуру клітин у живильному середовищі з вмістом стандартної ембріональної сироватки крові телят і дослідну культуру клітин у живильному середовищі з вмістом сироватки крові обстежуваного пацієнта, порівнюють кількість утворених колоній фібробластів у дослідній та контрольній культурах клітин обчисленням їх співвідношення і за його значенням оцінюють ступінь інтенсивності регенерації кісткової тканини.

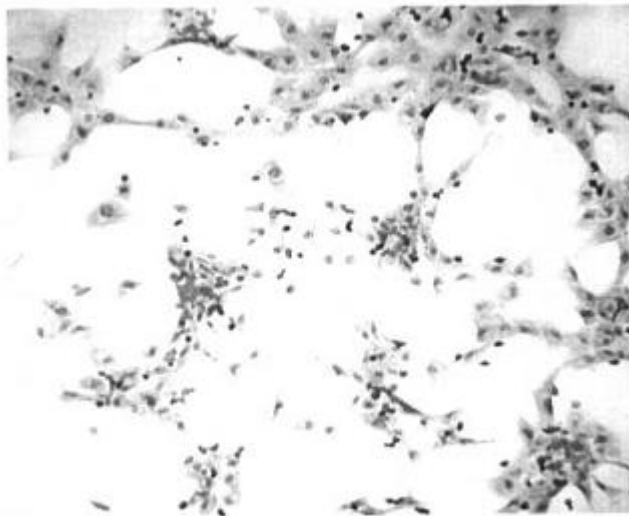


Fig. 1

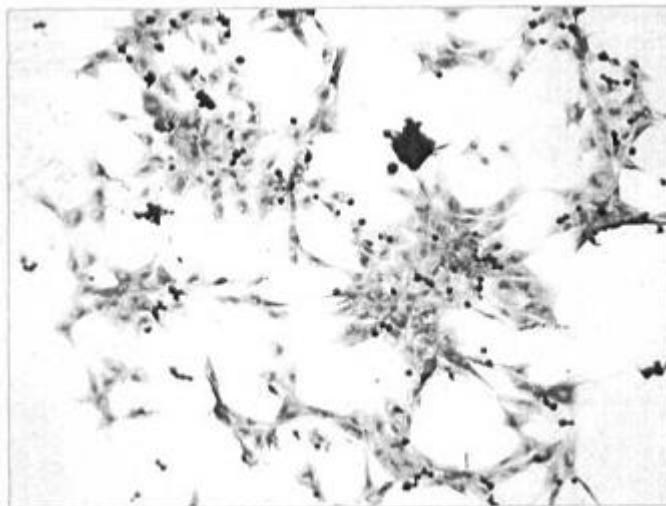


Fig. 2

Комп'ютерна верстка Л. Литвиненко

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

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