РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2336841

СПОСОБ КОСТНОЙ ПЛАСТИКИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Патентообладатель(ли): ***Карпюк Владимир Борисович (RU)***

Автор(ы): ***Карпюк Владимир Борисович (RU)***

Заявка № **2006137868**

Приоритет изобретения **26 октября 2006 г.**

Зарегистрировано в Государственном реестре изобретений Российской Федерации ***27 октября 2008 г.***

Срок действия патента истекает **26 октября 2026 г.**

Руководитель Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам

Б.П. Симонов

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

(19) **RU** (11) **2 336 841** (13) **C2**

(51) МПК
A61B 17/56 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: **2006137868/14, 26.10.2006**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
26.10.2006

(43) Дата публикации заявки: **27.05.2008**

(45) Опубликовано: **27.10.2008 Бюл. № 30**

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **ОСЕПЯН И.А. и др. Экспериментальное применение костномозговых фибробластов на основе пористого углерода при замещении дефектов костей. Экспериментальная и клиническая медицина. Том XXIX, №3, 1989, с. 277-279. RU 2089248 C1, 10.09.1997, реферат. RU 2183442 C2, 20.06.2002. CN 1451367, 29.10.2003, реферат. ШАРИФУЛЛИНА С.З. и др. Выделение** (см. прод.)

Адрес для переписки:
350063, г.Краснодар, ул. Седина, 4, КГМУ, зав. патентным отделом Т.А. Дорониной

(72) Автор(ы):
Карпюк Владимир Борисович (RU)

(73) Патентообладатель(и):
Карпюк Владимир Борисович (RU)

(54) СПОСОБ КОСТНОЙ ПЛАСТИКИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

(57) Реферат:

Изобретение относится к экспериментальной медицине в области пластической и реконструктивной хирургии, стоматологии, травматологии и ортопедии и может быть использовано в случае необходимости костной пластики для регенерации костей. Для этого предварительно из жировой ткани подкожно-жирового слоя путем аспирации, ферментативной обработки и центрифугирования получают фракцию фибробластоподобных клеток. Затем в полученную клеточную фракцию добавляют костную крошку в качестве индуктора остеогенной дифференцировки. При этом используют 1 объем крошки на 4 объема клеточной фракции. Непосредственно после приготовления смесь вводят в область дефекта. Способ позволяет качественно в короткие сроки полностью восстановить костную ткань и опорно-механические свойства кости за счет определенного соотношения компонентов в смеси, а также обеспечить иммунологическую безопасность манипуляции за счет использования аутологичного материала. 1 ил.

(56) (продолжение):
мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани человека и их характеристика. - СПб., Россия, 2004 Международный симпозиум по биологии клетки в культуре "Стволовые клетки, регенерация, клеточная терапия». KRZYMANSKI G. et al. The use of bone-marrow-derived fibroblastoid cells and fresh bone marrow in the treatment of bone defects: an experimental study., Int J Oral Maxillofac Surg. 1997 Feb; 26(1):55-60, реферат.

RU 2336841 C2

RU 2336841 C2

Предлагаемое изобретение относится к медицине и может быть использовано в остеологии, пластической и реконструктивной хирургии, стоматологии, травматологии и ортопедии.

К костно-пластическим операциям относятся вмешательства, при которых дефект кости одномоментно замещают участком другой кости, либо создают условия для постепенного замещения дефекта вновь образованной костной тканью. Показаниями к костной пластике чаще всего являются последствия переломов костей (ложные суставы, дефекты костей, травматический остеомиелит), врожденные и приобретенные деформации костей, дистрофические поражения скелета, дефекты костей после радикальных операций по поводу опухолей и туберкулеза костей. В зависимости от биологической характеристики различают ауто-, алло-, ксено- и брефогенные костные трансплантаты. По типу питания трансплантаты бывают кровоснабжаемые и некровоснабжаемые; по связи с донорским ложем - свободные и несвободные (на питающей ножке).

Недостатками пересадки некровоснабжаемых аутотрансплантатов являются нанесение больному дополнительной травмы в донорской зоне, ограниченный объем костно-пластического материала, его чувствительность к инфекции, а также относительно медленное вживление трансплантата в воспринимающее ложе из-за ограниченного участия его клеток в восстановительных процессах. Исключительная техническая сложность операции по пересадке кровоснабжаемых аутотрансплантатов ограничивает применение этого способа.

При пластике на питающей ножке область пересадки кости ограничена, а расширенный доступ для выделения и транспозиции такого лоскута сопряжен с дополнительной травмой. Несвободная костная пластика по Илизарову имеет достаточно широкий круг противопоказаний и ограничений: неудовлетворительное состояние кожных покровов в области дефекта, остсопороз и малые размеры костных отломков, размеры дефекта более 8-10 см, наличие остеомиелита, недисциплинированность и психологическая неподготовленность больного к длительному лечению данным способом.

Аллотрансплантаты используют обычно в виде костной стружки или щебенки при условии хорошего кровоснабжения воспринимающего ложа без раневой инфекции. В отличие от аутопластического материала, клеточные элементы чужеродной кости при пересадке всегда погибают. Мертвая кость фактически становится инородным телом, реакция на которое определяется различиями в антигенной структуре белков, образующих вещество трансплантата и ткани воспринимающего ложа, а также состоянием иммунной системы организма (Чаклин В.Д., 1971).

За ближайший аналог принят способ замещения костных дефектов путем аутотрансплантации остеогенных клеток костного мозга, выращенных вне организма (Осепян И.А. и соавт., 1987). Пластика костного дефекта данным способом предусматривает следующие этапы: 1) получение трепаната костного мозга из гребня тазовой кости и передача его в лабораторию; 2) выделение и размножение в культурах остеогенных клеток в течение 1-1,5 месяцев; 3) обратная трансплантация выращенных в культурах клеток в область дефекта кости больного, чей костный мозг был использован для культивирования.

Недостатки способа. Операционная травма и болезненность донорской зоны ограничивают количество костного мозга, которое может быть получено, это растягивает время культивирования для генерации терапевтической клеточной дозы. Традиционные способы культивирования ограничивают клиническую ценность клеток из-за постепенной потери ими в ходе размножения ex vivo пролиферативного потенциала и способности к дифференцировке. Имеются данные о том, что при пассировании появляются трансформированные клетки, способные к канцерогенезу in vivo.

Задачи изобретения: повышение качества регенерации кости с восстановлением ее опорно-механических свойств, снижение травматичности и безопасности способа, сокращение сроков реабилитации.

Сущностью изобретения является то, что жировую ткань, полученную из подкожно-

жирового слоя путем аспирации, подвергают ферментативной обработке раствором коллагеназы, центрифугируют, в полученную фракцию фибробластоподобных клеток в качестве индуктора остеогенной дифференцировки добавляют костную крошку в пропорции 1:4 и непосредственно после приготовления вводят аутологичную смесь в область костного дефекта.

Техническим результатом предлагаемого способа является устранение дефекта кости. При этом в качестве источника пластического материала - остеогенных клеток служит не костный мозг, а избыточная и легкодоступная жировая ткань. Известно, что стромально-васкулярная фракция жировой ткани содержит истинные «покоящиеся» мезенхимальные стволовые клетки, которые имеют характеристики, аналогичные свойствам стромальных клеток костного мозга: обладают высокой пролиферативной активностью, способны к самоподдержанию и мультилинейной (в том числе, остеогенной) дифференцировке (Zuk P.A. et al., 2002; Mizuno H., 2003). В предлагаемом способе остеогенная трансформация (пролиферация и дифференцировка) пересаженной клеточной фракции происходит in vivo под влиянием комплекса естественных остеоиндукторов, выделяемых костной крошкой. При осуществлении данного способа не проводят культивирование тканей, которое связано с риском инфицирования клеточной популяции, контаминации чужеродным материалом животного происхождения из питательной среды, непредсказуемого изменения свойств клеток (Wang Y. et al., 2005). Консистенция трансплантата в виде замазки обеспечивает максимальную площадь контакта с окружающими тканями, высокую скорость проникновения в него клеток воспринимающего ложа и создает условия для быстрой перестройки новообразованной кости в соответствии с условиями механической нагрузки (нет резорбируемого остова). Таким образом, использование способа позволяет снизить травматичность операции, риск осложнений, сроки реабилитации, повысить в более короткий период качество жизни больного.

Способ осуществляют следующим образом. Под местной анестезией выполняют шприцевую липоаспирацию. Жировую ткань интенсивно промывают стерильным физиологическим раствором от примеси крови и анестетика. Путем ферментативной диссоциации жировой ткани и центрифугирования выделяют стромальную фракцию с преобладанием фибробластоподобных клеток. Костную крошку получают при обработке края костного дефекта. В стромальную клеточную фракцию добавляют костную крошку в пропорции 1:4 и этой смесью заполняют дефект кости. Фиксацию "трансплантата" осуществляют с помощью окружающих мягких тканей, проницаемых нерезорбируемых и резорбируемых материалов.

Данный способ изучен экспериментально на модели дефекта нижнечелюстной кости у 8 морских свинок 8-10 месячного возраста с массой тела 600-800 грамм.

Пример 1. Вид и возраст животного: морская свинка, 8 месяцев. Вес до операции - 600 г. Описание операции: под внутрибрюшинным тиопенталовым наркозом (40 мг на кг массы животного) и местной анестезией 40 мл 0,25% раствором лидокаина с адреналином (1: 1000000) выполняли шприцевую липоаспирацию в области паховой жировой подушки в объеме 5 мл. Полученный липоаспират промывали физиологическим раствором и подвергали воздействию 0,075% раствора коллагеназы I типа (Collagenase Type I, EUROBIO Biotechnology, France) в стерильном фосфатном буфере (Dulbecco's phosphate buffered saline without Ca & Mg, 1X solution, sterile solution, EUROBIO Biotechnology, France) в течение 30 минут при 37°С. Для удаления остаточной активности фермента материал повторно промывали фосфатным буфером и центрифугировали до получения 0,4 мл плотного осадка. Под внутрибрюшинным тиопенталовым наркозом и местной анестезией 0,25% раствором лидокаина с адреналином (1:10000) после удаления шерсти в подчелюстной области и антисептической обработки операционного поля делали разрез по нижнему краю угла и тела нижней челюсти длиной 2,5 см. Послойно рассекали подлежащие ткани до кости и обнажали тело и угол нижней челюсти. С обеих сторон кости отслаивали мышцы и с помощью торцевой фрезы создавали сквозной дефект диаметром 5 мм. Справа дефект оставляли нетронутым (контроль). Слева в область дефекта имплантировали

полученную из липоаспирата клеточную фракцию, предварительно добавив в нее в качестве индуктора остеогенной дифференцировки крошку из 1/4 части резецированной кости (опыт). Рану ушивали послойно кетгутом 5-0 и полиамидом 4-0. Через 12 недель животное выводили из опыта путем введения летальной дозы тиопентала натрия. Костно-мышечный препарат нижней челюсти фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина и проводили сравнительное макроскопическое, рентгенологическое и гистологическое изучение. При осмотре дефект, в который были имплантированы аутологичные фибробластоподобные клетки, был заполнен твердой тканью, похожей на кость, в то время как контроль был заполнен фиброзной тканью. Рентгенологически на стороне опыта область дефекта имела практически одинаковую плотность с окружающей костью. При микроскопии в ткани имплантированных дефектов идентифицированы остеобласты, остеоциты, костные трабекулы и кровеносные сосуды.

Пример 2. Вид и возраст животного: морская свинка, 10 месяцев. Вес до операции - 800 г. Описание операции: под внутрибрюшинным тиопенталовым наркозом и местной анестезией 40 мл 0,25% раствором лидокаина с адреналином (1:1000000) выполняли шприцевую липоаспирацию в области паховой жировой подушки в объеме 5 мл. Полученный липоаспират промывали физиологическим раствором и подвергали воздействию 0,075% раствора коллагеназы I типа (Collagenase Type I, EUROBIO Biotechnology, France) в стерильном фосфатном буфере (Dulbecco's phosphate buffered saline without Ca & Mg, 1X solution, sterile solution, EUROBIO Biotechnology, France) в течение 30 минут при 37°С. Для удаления остаточной активности фермента материал повторно промывали фосфатным буфером и центрифугировали до получения 0,6 мл плотного осадка. Под внутрибрюшинным тиопенталовым наркозом и местной анестезией делали разрез по нижнему краю нижней челюсти длиной 2,5 см, послойно рассекали подлежащие ткани и в области угла нижней челюсти торцевой фрезой создавали сквозной дефект диаметром 5 мм. Справа дефект оставляли нетронутым (контроль). Слева в область дефекта имплантировали полученную из липоаспирата клеточную фракцию, предварительно добавив в нее в качестве индуктора остеогенной дифференцировки крошку из 1/4 части резецированной кости (опыт). Рану орошали антибиотиком и ушивали послойно кетгутом 5-0 и полиамидом 4-0. Через 10 недель животное выводили из опыта путем введения летальной дозы тиопентала натрия. При осмотре извлеченной нижнечелюстной кости на стороне опыта отмечалось формирование кости в виде тонкой пластины, полностью закрывающей дефект, в то время как на стороне контроля имелось сквозное отверстие со сглаженными краями диаметром 5 мм, заполненное подтянутой рубцом мышцей. На рентгенограмме уложенных рядом симметричных половин нижней челюсти видна более высокая плотность в области имплантированного дефекта, по сравнению с контролем. При микроскопии срезов, окрашенных гематоксилином и эозином, по Ван-Гизону и по Коссу область дефекта, где была выполнена имплантация, заполнена зрелой костью неравномерной толщины с надкостницей, костными трабекулами и кровеносными сосудами (см. чертеж, а). На стороне контроля кость представлена в виде двух лежащих на одной оси фрагментов, между которыми располагается фиброзная ткань (см. чертеж, б).

Таким образом, полученные результаты демонстрируют целесообразность применения предлагаемого способа костной пластики для устранения дефектов кости. Способ характеризуется малой травматичностью, иммунологической безупречностью, онкогенной безопасностью, не требует существенных материальных затрат и может быть применен в практической медицине.

Литература

1. Осепян И.А., Чайлахян Р.К., Гарибян Э.С., Айвазян В.П. Лечение несросшихся переломов, ложных суставов и дефектов длинных костей трансплантацией аутологичных костномозговых фибробластов, выращенных in vitro и имплантированных в АГМ // Ортопедия, травматология и протезирование. - 1987. - т.9. - С.59-61.

2. Чаклин В.Д. Костная пластика. - М.: Медицина, 1971. - 228 с.

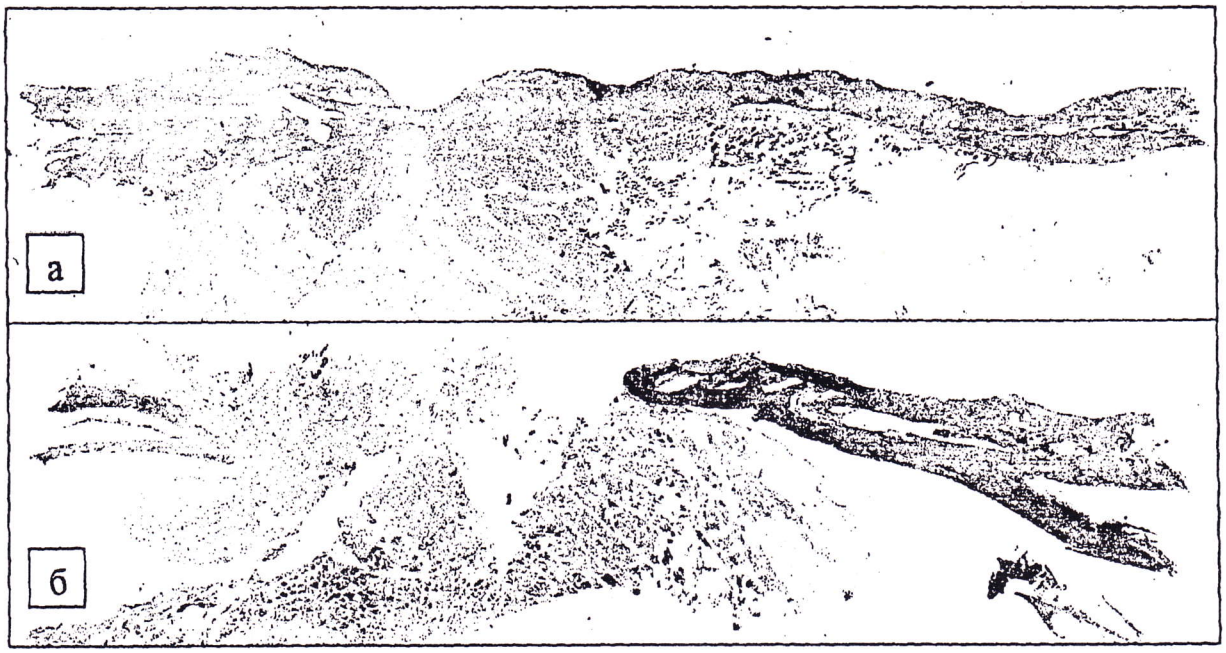
3. Mizuno H. Versatility of adipose tissue as a source of stem cells // J Nippon Med Sch. - 2003 - Vol.70(5) - P.428-431.

4. Wang Y., Huso D.L., Harrington J., Kellner J., Jeong D.K., Turney J., McNiece I.K. Outgrowth of a transformed cell population derived from normal human BM mesenchymal stem cell culture // Cytotherapy - 2005 - Vol 7(6) - P.509-519.

5. Zuk P.A., Zhu M., Ashjan P. et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells // Mol. Biol. Cell - 2002 - Vol.13 - P.4279-4295.

Формула изобретения

Способ костной пластики в эксперименте, включающий имплантацию фибробластоподобных клеток, отличающийся тем, что жировую ткань, полученную из подкожно-жирового слоя путем аспирации, подвергают ферментативной обработке раствором коллагеназы, центрифугируют, в полученную фракцию фибробластоподобных клеток в качестве индуктора остеогенной дифференцировки добавляют костную крошку в пропорции 1 объем крошки на 4 объема клеточной фракции и непосредственно после приготовления вводят аутологичную смесь в область костного дефекта.


а
б