



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **44128** (13) **U**
(51) МПК (2009)
A61B 17/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ КОЛАГЕНОВОГО МОДУЛЯ СТРОМИ РОГІВКИ

1

2

(21) u200901804

(22) 02.03.2009

(24) 25.09.2009

(46) 25.09.2009, Бюл.№ 18, 2009 р.

(72) ПАСЕЧНИКОВА НАТАЛІЯ ВОЛОДИМИРІВНА,
ЛЕУС МИКОЛАЙ ФЕДОРОВИЧ, НАСИННИК ІЛЛЯ
ОЛЕГОВИЧ, БУЗНИК ОЛЕКСІЙ ІГОРОВИЧ, ЯКО-
ВЕНКО ТАРАС ОЛЕКСАНДРОВИЧ

(73) ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ОЧНИХ
ХВОРОБ І ТКАНИННОЇ ТЕРАПІЇ ІМ. В.П. ФІЛАТО-
ВА" АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ

(57) Спосіб отримання колагенового модуля стро-
ми рогівки, який полягає в обробці ділянки рогівко-
вої оболонки, отриманої з видалених очей тварин,
яку розміщують в середовищі для культивування

тканини і обробляють: 10 % розчином трипсину у
присутності 1 % фтористого натрію при рН 7,6
протягом 3 годин при температурі 25 °С, 3-кратно
промивають протягом 30 хв. фізіологічним розчи-
ном, на 24 години розміщують в 2 % розчині три-
тону Х-100 при 0 °С, 5-кратно промивають фізіоло-
гічним розчином з 3-кратною заміною розчину,
обробляють 1 % гіалуронідазою протягом 5 годин,
промивають фізіологічним розчином, обробляють
фосфоліназою 1 ОД в 1 мл протягом 12 годин,
одноразово промивають фізіологічним розчином,
3-кратно промивають диметилсульфоксидом, 2-
кратно промивають фізіологічним розчином і пе-
реносять в середовище Ігла для зберігання при
температурі 0 °С.

Корисна модель відноситься до медицини, а
саме до офтальмології і може бути використана
для лікування помутнінь рогівки.

Для реконструкції рогівкової оболонки, як ста-
ну лікування її захворювань, а також більм і помут-
нінь рогівки, різних дефектів - наслідків травми,
опіків, виразки (після бактеріальних і вірусних ке-
ратитів) використовується не тільки нативна рогів-
кова оболонка і ліофілізована рогівка, але і інші
тканини, зокрема амніотична мембрана і т. н.

Необхідно відзначити, що помутніння рогівки в
результаті захворювання або травми виникають
приблизно у 10 млн. пацієнтів і, як правило, ліку-
ються шляхом трансплантації донорською людсь-
кою рогівкою [Whitcher JP, Srinivasan M, Upadhyay
MP. Corneal blindness: a global perspective. Bull
World Health Org. 2001;79:214-221]. Існує нестача
придатної для трансплантації рогівки, що пов'язана
з демографічними проблемами, збільшенням
випадків інфекційних захворювань (ВІЧ, гепатит) і
збільшенням використання ексимерної лазерної
корекції.

Найбільш поширеним методом в клініці очних
хвороб є спосіб пересадки нативної рогівкової
оболонки.

Не зважаючи на гарні результати, що відзна-
чаються після первинної пересадки рогівки (при-
живлюваність складає 90 % протягом 5 років і 82
% протягом 10 років), результати при повторних
пересадках приблизно в два рази нижче (прижив-

люваність складає 53 % протягом 5 років і 41 %
протягом 10 років). Зазначені проблеми, пов'язані
з негативними наслідками проведених пересадок
нативної рогівки, а також труднощі, що виникають
при заборі матеріалу для пересадок, спонукають
до пошуку нових шляхів забезпечення реконструк-
тивних операцій рогової оболонки [Thompson RW
Jr, Price MO, Bowers PJ, Price FW Jr. Long-term
graft survival after penetrating keratoplasty. Ophthal-
mology. 2003; 110:1396-1402. Kaminski SL, Biowski
R, Lucas JR, Koyuncu D, Grabner G. Corneal sensi-
tivity 10 years after epikeratoplasty. J Refract Surg.
2002; 18: 731-736].

Тому створюються колагенові модулі для про-
ведення пошарових або наскрізних кератопластик.

В зв'язку з цим слід докладніше зупинитися на
структурних особливостях рогівкової оболонки.

Рогівкова оболонка складається з п'яти шарів -
переднього епітелію рогівки, передньої прикор-
донної пластинки, власної речовини рогівки -
строми, задньої прикордонної пластинки і заднього
епітелію рогівки.

Передній епітелій рогівкової оболонки відно-
ситься до багатшарового плоского неороговіваю-
чого епітелію.

Ультраструктурно боуменова оболонка скла-
дається з безладно розташованих і щільно упакো-
ваних колагенових фібрил діаметром 14-27 нм і
довжиною 240-270 нм. Боуменова оболонка скла-
дається з колагену I типу, основного структурного

(13) **U**
(11) **44128**
(19) **UA**

компоненту рогівки і склери, а також колагену V, VI, III і VII типів.

Строма складає 90 % товщини рогівкової оболонки (450 мкм в центральних ділянках) і складається з трьох компонентів: колагенових пластин, клітин і основної речовини.

Кожна стромальна пластина складається з пучка колагенових волокон, орієнтованих паралельно один одному. Фібрили володіють типовою зчрченістю, рівною 64 нм і характерною для колагенових волокон інших типів сполучної тканини. Колагенові волокна полягають, в основному, з колагену 1 типу.

Стромальні пластини занурені в основну речовину, представлену різними типами протеогліканів. Гідрофільна частина основної речовини глікозаміногліканів, в яку занурені колагенові волокна, набуває форми протеогліканів шляхом ковалентного з'єднання глікозаміногліканів з білками. Протеоглікани мають досить різноманітну хімічну будову. У стромі рогівкової оболонки з глікозаміногліканів виявлені кератан сульфат, хондроїтин-4-сульфат, хондроїтин-6-сульфат, дерматан сульфат.

Молекули глікозаміногліканів огортають волокна і орієнтуються перпендикулярно колагеновому волокну. Саме зв'язок між волокнами і протеогліканами забезпечує прозорість тканини рогівки.

Основним клітинним елементом строми рогівкової оболонки є кератоцит. Кератоцити складають 2,4 - 5,0 % об'єму строми.

Десцеметова оболонка Pas-позитивна і складається з коротких і тонких фібрил (10 нм). Фібрили, у свою чергу, утворені колагеном 4 типу і занурені в глікопротеїнову основну речовину.

Відомий спосіб отримання модуля рогівки полягає в ліофілізації рогівки. Недоліком цього способу є:

1. Відсутність людської донорської рогівки.
2. При використанні ксенотрансплантанта виникає імунна відповідь.

Найбільш перспективними представляються спроби створення колагенових модулів шляхом полімеризації різних видів колагену. Найбільш вивченим є спосіб отримання колагенового модуля шляхом полімеризації ателоколлагена [A Simple,

Cross-linked Collagen Tissue Substitute for Corneal Implantation Yuwen Liu, Lisha Gan, David J. Carlsson, Per Fagerholm, Neil Lagali, Mitchell A. Watsky, Rejean Munger, William G. Hodge, David Priest, and May Grifeth Invest Ophthalmol Vis Sci. 2006;47:1869-1875].

Проте, висока вартість ателоколагена і труднощі пов'язані з його полімеризацією, призводять до обмеження його використання.

Завданням цього дослідження є створення колагенового модуля з ксенотрансплантанта рогівкової оболонки.

Результат, який може бути отриманий при виконанні запропонованого методу, лежить в отриманні колагенового модуля, який можливо використовувати для пошарових пересадок рогівки.

Поставлене завдання вирішується шляхом видалення за допомогою вимивання клітинних і неклітинних елементів рогівки, відщеплення кінцевих пепетідних ділянок колагенових молекул, що обумовлюють їх антигенні властивості.

Спосіб виконується таким чином.

Ділянку рогівкової оболонки, отриману з видалених очей тварин, розміщують в середовище для культивування тканини (фіз. р-чин) і обробляється таким чином:

1. 10 % розчин трипсину у присутності 1 % фтористого натрію при рН 7,6 протягом 3 годин при температурі 25°C.
2. 3-х кратне промивання протягом 30 хв. фіз. розчином.
3. Інкубація в 2 % розчині тритона X-100 при 0°C протягом 24 годин.
4. 3-х кратна заміна розчину, промивка 5 кратним фіз. розчином.
5. Обробка 1 % гіалуронідазою протягом 5 годин.
6. Промити фіз. розчином.
7. Обробити фосфоліпазою 1 ЕД в 1 мл протягом 12 годин.
8. Одноразова промивка фіз. розчином.
9. 3-х кратна промивка диметилсульфоксидом.
10. 2-х кратна промивка фіз. розчином.
11. Перенесення в середовище Ігла і зберігання при температурі 0°C.

Причинно-наслідкові зв'язки

Причина	Наслідок
Обробка 10 % розчином трипсину	Деструкція епітеліального шару клітин, відщеплення кінцевих фрагментів колагену
Обробка 10 % розчином тритону X-100	Розщеплення мембранних структур клітин
Обробка 10 % розчином гіалуронідазою	Розщеплення мукополісахаридів
Обробка 10 % розчином фосфоліпази	Розщеплення ліпідних компонентів
Обробка 10 % розчином пепсину	Відщеплення кінцевих фрагментів колагена
Обробка 10 % розчином диметилсульфоксидом	Видалення деструктивного матеріалу
Використання середовища Ігла	Відмивання й зберігання модуля

Перевагами розробленого способу є можливість використання ксенотрансплантантів, простота отримання колагенового модуля.

Таким чином, як видно із проведеного аналізу, кінцева мета корисної моделі забезпечується сукупністю істотних відмітних ознак.

