



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **101707** (13) **U**
(51) МПК
A61F 9/01 (2006.01)
A61P 27/02 (2006.01)
A61N 7/02 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

<p>(21) Номер заявки: u 2015 03215</p> <p>(22) Дата подання заявки: 06.04.2015</p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.09.2015</p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.09.2015, Бюл.№ 18</p>	<p>(72) Винахідник(и): Коган Борис Михайлович (UA), Пасєчнікова Наталія Володимирівна (UA), Насінник Ілля Олегович (UA), Коломійчук Сергій Григорович (UA)</p> <p>(73) Власник(и): ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ОЧНИХ ХВОРОБ І ТКАНИННОЇ ТЕРАПІЇ ІМ. В.П. ФІЛАНОВА НАМН УКРАЇНИ", Французький б-р, 49/51, м. Одеса, 65061 (UA)</p>
--	---

(54) СПОСІБ ОТРИМАННЯ ЕКВІВАЛЕНТА СТРОМИ РОГІВКИ ДЛЯ КЕРАТОПЛАСТИКИ

(57) Реферат:

Спосіб отримання еквівалента строми рогівки для кератопластики, за яким рогівкову оболонку, отриману з видалених очей свиней, розміщують в середовищі для культивування тканини. Проводять децелюляризацію наступним чином: обробляють 0,5 % розчином додецилсульфату натрію в умовах постійного струшування при температурі не вище 4 °С, потім обробляють ультразвуком (CD 3800 А, 50 Вт) протягом 5 хвилин. Здійснюють інкубацію в присутності ферментного 0,1 % розчину папаїну (рН 6,5) протягом 2,5 годин при 30 °С, промивають в калій-фосфатному 0,1 м буфері (рН 6,5) трьохкратно по 5 хвили. Обробляють ультразвуком (CD 3800 А, 50 Вт) протягом 5 хвилин, знову обробляють 0,5 % розчином додецилсульфату натрію двічі протягом 3 годин, промивають в калій-фосфатному 0,1 м буфері (рН 6,5) трикратно по 5 хвилин. Знову обробляють ультразвуком (CD 3800 А, 50 Вт) протягом 5 хвилин, промивають в калій-фосфатному буфері (рН 6,5) п'ятикратно по 5 хвилин, центрифугують при 3000 g 15 хвилин з декантацією трикратно і переносять в середовище для зберігання - у 2 % розчин полівінілпіролідону при температурі 0 °С.

UA 101707 U

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

В багатьох випадках при тяжких клінічних формах ураження рогівки хірургічний метод лікування, а саме кератопластика, є на сьогодні єдиним ефективним методом лікування (Cox A & R Zhong. Current advances in xenotransplantation. Hepatobiliary Pancreat Dis Int.2005, 4, 490-494).

За нашого часу при кератопластиці за умови патології рогівки (опіки, при виразках та запаленні у випадку глибоких дефектів при спадкових дистрофіях рогівки, епітеліальних та ендотеліальних дистрофіях після хірургічного втручання) використовують амніотичну мембрану, особливо людську нативну та ліофілізовану рогівку і т. п. (John P. Whitcher, M. Srinivasan, Madan P. Upadhyay. Corneal blindness: a global perspective. Bulletin of the World Health Organization.-2001. - V. 79. - P. 214-221).

Треба зауважити, що застосування людської рогівки як донорського трансплантата при кератопластиці спричинює деякі труднощі, пов'язані, по-перше, з нестачею придатного матеріалу та правовими аспектами, а по-друге, з умовами, які були затверджені Європейською конференцією по банках рогівки в 1990 році, при яких не можливо її використовувати, тобто наявність ризику інфікування (гепатит, ВІЧ, венеричні захворювання тощо) та інші причини (Душин Н.В., Фролов М.А., Гончар П.А. Кератопластика в лечении заболеваний глаз (оптическая, рефракционная, лечебная, косметическая): Учеб. пособие. - М: РУДН, 2008.-168 с).

Крім того, випадки негативних наслідків після проведення трансплантації людської нативної рогівки, пов'язані з приживлюванністю, особливо низькою при повторних пересадках (Thompson R.W.Jr., Price M.O., Bowers P.J., Price F.W. Long-term graft survival after penetrating keratoplasty. Ophthalmology. - 2003. - V. 110. - p. 1396-1402; Kaminsky S.L., Biowski R., Lucas J.R., Koyuncu D., Grabner G. Corneal sensitivity 10 years after epikeratoplasty. J. Refract. Surg.-2002. - V. 18. - P. 731-736), які можуть бути обумовлені загрозою відторгнення трансплантата за умови антигенної несумісності, спонукають до пошуку і розробки альтернативних варіантів донорської рогівки (Gilbert TW, Sellaro TL, Badylak SF. Decellularization of tissues and organs. Biomaterials.2006; 27:3675-3683).

Отримання модуля рогівки шляхом ліофілізації має такі ж недоліки, в першу чергу недостатня кількість людської рогівки та певна ймовірність виникнення імунної відповіді.

Найбільш перспективним напрямком розробки альтернативних варіантів донорської рогівки сьогодні є створення колагенових модулів за рахунок полімеризації ателоколагену (Yuwen Liu, Lisha Gan, David J. Carlsson, Per Fagerholm, Neil Lagali, Mitchel A. Watsky, Rejcan Munger, William G. Hodge, David Priest, and May. A Simple, Cross-linked Collagen Tissue Substitute for Corneal Implantation. Grifeth Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.-2006. - V. 47. - P. 1869-1875; Пасечникова Н.В., Вит В.В., Леус Н.Ф. и др. Результаты клинико-морфологического применения имплантов на основе поперечно-сшитого коллагена в качестве аналога донорской роговицы. Офтальмол. журнал.-2011. - № 4. - С. 58-60; Pasychnikova N., Vit V., Leus N. et al. Collagen-Based Bioengineered Substitutes of Donor Corneal Allograft Implantation: Assessment and Hypotheses. MENDI Ophthalmology Journal.-2012. - V. 1, № 1. - P. 10-13). Але, висока вартість ателоколагену, а також особливості полімеризації та невирішені ще питання щодо підвищення міцності колагенового модуля, тобто за біомеханічними властивостями штучний модуль поступається перед нативною рогівкою, в значній мірі обмежують його використання (Duan X., Sheardown H. Dendrimer crosslinked collagen as a corneal tissue engineering scaffold: mechanical properties and corneal epithelial cell interaction. Biomaterials.-2006. - V. 27. - P. 4608-4617; Rafat M., Li F., Fagerholm P. et al. PEG-stabilized carbodiimide crosslinked collagen-chitosan hydrogels for corneal tissue engineering. Biomaterials.-2008. -V. 29. - P. 3960-3972).

Тому, на сьогоднішній день певні досягнення ксенотрансплантації дають можливість вирішити актуальне питання трансплантології - отримання донорського матеріалу для проведення пошарової та інтраламелярної кератопластики. Враховуючи, що антигенний склад і структурно-функціональні властивості рогівки свиней найбільш близькі до людського організму, їх використання як трансплантата при кератопластиці у людини є перспективним напрямком (Griffith M, Osborne R, Munger R, et al. Functional human corneal equivalents constructed from cell lines. Science 1999; 286(5447):2169e72. Kruse FE, Cursiefen C Surgery of the cornea: corneal, limbal stem cell and amniotic membrane transplantation. Dev.Ophthalmol.2008;41:159-170).

Зупиняючись на структурних властивостях рогівки, слід зазначити, що рогівкова оболонка складається з п'яти шарів - переднього епітелію, передньої прикордонної пластинки, строми, задньої прикордонної пластинки і заднього епітелію рогівки. Передній епітелій рогівкової оболонки являє собою багатошаровий плоский неорогіваючий епітелій. Боуменова оболонка

складається з колагенових фібрил діаметром 14-27 нм і довжиною 240-270 нм I типу, який є основним структурним компонентом рогівки та склери, V, VI, III і VII типів.

Основний шар - це строма (90 % товщини рогівкової оболонки, приблизно 450 нм), яка складається з колагенових пластин, клітин і основної речовини. Керацити складають 2,4-5,0 % від загального об'єму строми.

Стромальні пластини складаються з пучка паралельних колагенових волокон, які належать в першу чергу до колагену I типу. Стромальні пластини знаходяться в основній речовині, до складу якої входять протеоглікани. Гідрофільна частина глікозаміногліканів, в якій містяться колагенові волокна, ковалентно з'єднуються з білками, набуває форми протеогліканів. У стромі рогівкової оболонки виявлені такі глікозаміноглікани: кератан сульфат, дерматан сульфат, хондроїтин-4-сульфат та хондроїтин-6-сульфат. Глікозаміноглікани орієнтовані перпендикулярно колагеновому волокну, а зв'язок між волокнами та протеогліканами зумовлює прозорість рогівки. Десцеметова оболонка (Pas-позитивна) складається з тонких і коротких фібрил (10 нм), які занурені в глікопротеїнову основну речовину, і до складу яких входить колаген IV типу. Слід відмітити, що трансплантати повинні по своїх імунологічних характеристиках, механічній міцності та оптичній прозорості відповідати нативній людській рогівці та забезпечувати оптимальне мікросередовище для стромальних і епітеліальних клітин, які можуть мігрувати в тканини трансплантата (Lin XC, Hui YN, Wang YS, et al. Lamellar keratoplasty with a graft of lyophilized acellular porcine corneal stroma in the rabbit. *Vet Ophthalmol.* 2008; 11:61-66; Zheng Wu, Yang Zhou, Naiyang Li et al. The use of phospholipase A₂ to prepare acellular porcine corneal stroma as a tissue engineering scaffold. *Biomaterials.*-2009. - V. 30. - P. 3513-3522; S. Ponce Marquez, V. Saez Martinez, W. McIntosh Ambrose et al. Decellularization of bovine corneas for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia.*-2009. - V. 5. - P. 1839-1847; J. S. Choi, J. K. Williams, M. Greven et al. Bioengineering endothelialized neo-corneas using donor-derived corneal endothelial cells and decellularized corneal stroma. *Biomaterials.*-2010. - V. 31. - P. 6738-6745).

В основу корисної моделі поставлена задача розробки способу отримання еквівалента строми рогівки для кератопластики шляхом децелюляризації (видаленням клітинних і неклітинних складових рогівки, а також ділянок колагенових молекул) рогівкової оболонки з видалених свинячих очей, за рахунок чого стає можливим отримання трансплантату - еквіваленту строми рогівки з ксенотрансплантатів у достатній кількості без антигенних властивостей, який по своїх імунологічних характеристиках, механічній міцності та оптичній прозорості відповідає нативній людській рогівці та забезпечує оптимальне мікросередовище для стромальних і епітеліальних клітин, що дозволить використовувати отриманий трансплантат для проведення пошарової та інтраламелярної кератопластики хворим з дистрофією рогівки.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі отримання еквівалента строми рогівки для кератопластики, згідно з корисною моделлю рогівкову оболонку, отриману з видалених очей свиней, розміщують в середовищі для культивування тканини, після чого проводять її децелюляризацію наступним чином: обробляють 0,5 % розчином додецилсульфату натрію в умовах постійного струшування при температурі не вище 4 °С, потім обробляють ультразвуком (CD 3800 A, 50 Вт) протягом 5 хвилин, здійснюють інкубацію в присутності ферментного 0,1 % розчину папаїну (рН 6,5) протягом 2,5 годин при 30 °С, промивають в калій-фосфатному 0,1м буфері (рН 6,5) трьохкратно по 5 хвилин, обробляють ультразвуком (CD 3800 A, 50 Вт) протягом 5 хвилин, знову обробляють 0,5 % розчином додецилсульфату натрію двічі протягом 3 годин, промивають в калій-фосфатному 0,1 м буфері (рН 6,5) трьохкратно по 5 хвилин, знову обробляють ультразвуком (CD 3800 A, 50 Вт) протягом 5 хвилин, промивають в калій-фосфатному буфері (рН 6,5) п'ятикратно по 5 хвилин, центрифугують при 3000 g 15 хвилин з декантацією трьохкратно і переносять в середовище для зберігання - у 2 % розчин полівінілпіролідону при температурі 0 °С.

Причинно-наслідкові зв'язки

Причина	Наслідок
Обробка 0,5 % розчином додецилсульфата натрія	Деструкція клітинних стінок. Солюбілізує білки. Проявляє бактерицидну активність.
Обробка ультразвуком (CD 3800 A, 50 Вт)	Деструкція клітинних стінок.
Інкубація в присутності ферментного 0,1 % розчину папаїну (рН 6,5)	Гідроліз пептидів, білків, амідів та ефірів основних амінокислот
Використання 0,1 м калій-фосфатного буфера (рН 6,5)	Відмивання та видалення деструктивного матеріалу.
Використання центрифугування (3000 g, 15 хвилин) з декантацією	Відмивання та видалення деструктивного матеріалу.
Використання 2 % розчину полівінілпіролідону	Зберігання (має абсорбційні властивості) еквівалентів строми рогівки для підвищення стабільності

Спосіб виконується таким чином:

5 Рогівкову оболонку, отриману з видалених очей свиней, розміщують у середовищі для культивування тканини (фізіологічний розчин), після чого для отримання безклітинних еквівалентів строми рогівки здійснюють її децелюляризацію, а саме:

1. Обробка 0,5 % розчином додецилсульфату натрію в умовах постійного струшування при температурі не вище 4 °С.
- 10 2. Обробка ультразвуком (CD 3800 A, 50 Вт) протягом 5 хвилин.
3. Інкубація в присутності ферментного 0,1 % розчину папаїну (рН 6,5) протягом 2,5 годин при 30 °С.
4. Промивання в 0,1м калій-фосфатному буфері (рН 6,5), трьохкратно по 5 хвилин. Обробка ультразвуком (CD 3800 A, 50 Вт) протягом 5 хвилин.
- 15 5. Обробка 0,5 % розчином додецилсульфату натрію, двічі протягом 3 годин.
6. Промивання в 0,1 м калій-фосфатному буфері (рН 6,5), трьохкратно по 5 хвилин.
7. Обробка ультразвуком (CD 3800 A, 50 Вт) протягом 5 хвилин.
8. Промивання в 0,1м калій-фосфатному буфері (рН 6,5), п'ятикратно по 5 хвилин. На останній стадії промивання використовували центрифугування (3000 g, 15 хвилин) з декантацією трьохкратно.
- 20 9. Перенесення в середовище для зберігання - 2 % розчин полівінілпіролідону при температурі 0 °С.

Перевагами розробленого способу є можливість використання ксенотрансплантантів та простота отримання еквівалентів строми рогівки.

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

30 Запропонована обробка є простою у виконанні і дозволяє отримати еквівалент строми рогівки для кератопластики з ксенотрансплантантів в достатній кількості без антигенних властивостей, який по своїх імунологічних характеристиках, механічній міцності та оптичній прозорості відповідає нативній людській рогівці та забезпечує оптимальне мікросередовище для стромальних і епітеліальних клітин, і який можливо використовувати для проведення поширової та інтраламелярної кератопластики для лікування хворих з дистрофією рогівки.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

35 Спосіб отримання еквівалента строми рогівки для кератопластики, за яким рогівкову оболонку, отриману з видалених очей свиней, розміщують в середовищі для культивування тканини, після чого проводять її децелюляризацію наступним чином: обробляють 0,5 % розчином додецилсульфату натрію в умовах постійного струшування при температурі не вище 4 °С, потім обробляють ультразвуком (CD 3800 A, 50 Вт) протягом 5 хвилин, здійснюють інкубацію в присутності ферментного 0,1 % розчину папаїну (рН 6,5) протягом 2,5 годин при 30 °С, промивають в калій-фосфатному 0,1м буфері (рН 6,5) трьохкратно по 5 хвилин, обробляють ультразвуком (CD 3800 A, 50 Вт) протягом 5 хвилин, знову обробляють 0,5 % розчином додецилсульфату натрію двічі протягом 3 годин, промивають в калій-фосфатному 0,1 м буфері (рН 6,5) трикратно по 5 хвилин, знову обробляють ультразвуком (CD 3800 A, 50 Вт) протягом 5 хвилин, промивають в калій-фосфатному буфері (рН 6,5) п'ятикратно по 5 хвилин,

центрифугують при 3000 g 15 хвилин з декантацією трикратно і переносять в середовище для зберігання - у 2 % розчин полівінілпіролідону при температурі 0 °С.

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

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