

**ОПИСАНИЕ
ИЗОБРЕТЕНИЯ
К ПАТЕНТУ**

(12)

РЕСПУБЛИКА БЕЛАРУСЬ



НАЦИОНАЛЬНЫЙ ЦЕНТР
ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ
СОБСТВЕННОСТИ

(19) **ВУ** (11) **22881**

(13) **С1**

(46) **2020.02.28**

(51) МПК

A 01N 1/02 (2006.01)

A 61F 2/04 (2013.01)

(54)

**СПОСОБ ПРИГОТОВЛЕНИЯ ПЕРИКАРДИАЛЬНОГО
АЛЛОГРАФТА, ВЫДЕЛЕННОГО ОТ ДОНОРА ПРИ
МУЛЬТИОРГАННОМ ЗАБОРЕ, ДЛЯ ИМПЛАНТАЦИИ**

(21) Номер заявки: а 20170444

(22) 2017.11.27

(43) 2019.06.30

(71) Заявитель: Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр детской хирургии" (ВУ)

(72) Авторы: Дроздовский Константин Викентьевич; Линник Юрий Иванович; Дрык Светла Йорданова; Колбасина Мария Николаевна; Сахаров Иван Владимирович (ВУ)

(73) Патентообладатель: Государственное учреждение "Республиканский научно-практический центр детской хирургии" (ВУ)

(56) ВУ 20841 С 1, 2017.

RU 2197819 С2, 2003.

US 5632778 А, 1997.

ЛАВРЕШИН А.В. и др. Гены & Клетки. - 2014. - Т. IX. - № 1. - С. 64-71.

ВУ 14577 С 1, 2011.

ВУ 8118 С 1, 2006.

RU 2231997 С2, 2004.

US 5899936 А, 1999.

(57)

Способ приготовления перикардального аллогraftа, выделенного от донора при мультиорганном заборе, для имплантации, заключающийся в том, что аллогraft стерилизуют в среде RPMI 1640, дополнительно содержащей 3 мкг/мл ципрофлоксацина, 12 мкг/мл амикацина, 12 мкг/мл метронидазола, 12 мкг/мл ванкомицина и 100 мкг/мл флуконазола, в течение 24 ч при температуре 4-5 °С, затем аллогraft помещают в пакет с раствором для криоконсервации, содержащим 160 мл среды RPMI 1640, 20 мл диметилсульфоксида и 20 мл 10 %-ного человеческого альбумина, пакет запаивают и выдерживают при температуре 4-5 °С в течение 40 мин, после чего осуществляют криоконсервацию аллогraftа в криокамере программного замораживателя при следующем режиме: в течение 10 мин равномерно снижают температуру до -40 °С с последующим поддержанием ее на данном уровне в течение 15 мин, затем снижают температуру до -70 °С со скоростью -1,2 °С/мин и до -110 °С со скоростью -2 °С/мин, хранят пакет с криоконсервированным аллогraftом в парах жидкого азота при температуре от -140 до -160 °С, перед имплантацией пакет с криоконсервированным аллогraftом выдерживают при температуре 22-25 °С в течение 7 мин, а затем помещают на 10-15 мин на водяную баню с температурой воды 38 °С, после чего аллогraft извлекают из пакета и проводят его отмывание по следующей схеме: аллогraft помещают в стерильную емкость, содержащую 100 мл вышеуказанного раствора для криоконсервации, добавляют в емкость 33 мл физиологического раствора и осуществляют экспозицию аллогraftа в полученном растворе в течение 5 мин, после чего добавляют в емкость 66 мл физиологического раствора и осуществляют экспозицию аллогraftа в полученном растворе в течение 5 мин, затем добавляют в емкость 200 мл физиологиче-

ВУ 22881 С1 2020.02.28

ского раствора и осуществляют экспозицию аллогraftа в полученном растворе в течение 5 мин, после чего аллогraft помещают в емкость с 250 мл физиологического раствора.

Изобретение относится к медицине и может использоваться в кардиохирургии, а также торакальной и сосудистой хирургии для приготовления перикардального аллогraftа, выделенного от донора при мультиорганном заборе.

Заявителю не известен способ приготовления перикардального аллогraftа, выделенного от донора при мультиорганном заборе, для имплантации, в связи с чем не может быть указан ближайший аналог заявляемого способа.

Задачей заявляемого изобретения является создание способа приготовления перикардального аллогraftа, выделенного от донора при мультиорганном заборе, для имплантации.

Актуальность получения перикардального донорского аллогraftа обусловлена тем, что нативный перикард является одним из наиболее оптимальных пластических материалов, используемых при проведении хирургических коррекций врожденных пороков сердца, а также реконструктивных оперативных вмешательств в торакальной хирургии. При этом возможность использования аутоперикарда ограничена тем что в ряде случаев он подлежит удалению, например, при онкологических заболеваниях, а при осуществлении повторных либо этапных хирургических вмешательств непригоден для использования ввиду спаечного процесса тканей. В то же время применение при подобных операциях других материалов как синтетических, так и биологических может быть сопряжено с рядом проблем, достаточно часто приводящих к необходимости проведения повторного хирургического лечения из-за развивающихся в отдаленном периоде материалозависимых осложнений (дистрофического кальциноза, инфекционного эндокардита и пр.) [1, 2]. Кроме того, недостаточная биосовместимость данных материалов по отношению к человеческому организму способствует более интенсивной воспалительной реакции на границе ткань-трансплантат, что несомненно снижает потенциал роста органа (части органа) пациента в зоне проведения оперативного вмешательства за счет формирования более выраженного фиброзного рубца. Данная особенность чрезвычайно важна в детской хирургии и кардиохирургии, в частности. При этом донорский аллоперикард представляет собой пластический материал на основе человеческих тканей и, как следствие, обладает большей биосовместимостью, а использование технологии программной криоконсервации позволяет осуществлять долгосрочное хранение данного материала без существенного изменения его морфологической структуры и прочностно-эластических характеристик.

Поставленная задача достигается тем, что в способе приготовления перикардального аллогraftа, выделенного от донора при мультиорганном заборе, для имплантации, включающем его стерилизацию в растворе антибиотиков, криоконсервацию и последующую подготовку к имплантации путем постепенного размораживания, согласно изобретению перикардальный аллогraft стерилизуют в среде RPMI 1640, дополнительно содержащей 3 мкг/мл ципрофлоксацина, 12 мкг/мл амикацина, 12 мкг/мл метронидазола, 12 мкг/мл ванкомицина и 100 мкг/мл флуконазола, в течение 24 ч при температуре 4-5 °С, затем аллогraft помещают в пакет с раствором для криоконсервации, содержащим 160 мл среды RPMI 1640, 20 мл диметилсульфоксида и 20 мл 10 %-ного человеческого альбумина, пакет запаивают и выдерживают при температуре 4-5 °С в течение 40 мин, после чего осуществляют криоконсервацию аллогraftа в криокамере программного замораживателя при следующем режиме: в течение 10 мин равномерно снижают температуру до -40 °С с последующим поддержанием ее на данном уровне в течение 15 мин, затем снижают температуру до -70 °С со скоростью -1,2 °С/мин и до -110 °С со скоростью -2 °С/мин, хранят пакет с криоконсервированным аллогraftом в парах жидкого азота при температуре от -140 до -160 °С, перед имплантацией пакет с криоконсервированным аллогraftом выдерживают при температуре 22-25 °С в течение 7 мин, а затем помещают на 10-15 мин на во-

дьяную баню с температурой воды 38 °С, после чего аллографт извлекают из пакета и проводят его отмывание по следующей схеме: аллографт помещают в стерильную емкость, содержащую 100 мл вышеуказанного раствора для криоконсервации, добавляют в емкость 33 мл физиологического раствора и осуществляют экспозицию аллогرافта в полученном растворе в течение 5 мин, после чего в емкость добавляют 66 мл физиологического раствора и осуществляют экспозицию аллогرافта в полученном растворе в течение 5 мин, затем добавляют в емкость 200 мл физиологического раствора и осуществляют экспозицию аллогرافта в полученном растворе в течение 5 мин, после чего аллографт помещают в емкость с 250 мл физиологического раствора.

Технический результат изобретения - возможность получения биосовместимого пластического материала для проведения реконструктивных оперативных вмешательств в кардиохирургии и торакальной хирургии на основе донорского аллоперикарда благодаря предложенному способу его приготовления, позволяющему максимально сохранить нативные свойства аллоперикарда. На основании проведенных заявителем исследований создана технология, которая определяет источник получения материала, учитывает особенности стерилизации данного материала, параметры криоконсервации и хранения материала с использованием созданного для этого алгоритма программного замораживания, а также непосредственную подготовку криоконсервированного аллоперикарда к имплантации.

Пример.

Выделение перикардального аллогرافта осуществляют в стерильных условиях операционного блока при проведении мультиорганного забора у донора путем резекции участка париетальной пластинки перикарда в грудинно-реберном отделе на протяжении от правого до левого диафрагмальных нервов после предварительного тщательного препарирования аллогرافта от прилегающих тканей переднего средостения. Противопоказаниями к забору аллоперикарда у донора являются: 1) возраст донора старше 55 лет; 2) наличие травмы сердца либо дефектов перикарда; 3) наличие врожденной коллагено- или эластопатии (синдром Морфана и пр.); 4) установленный факт перенесенного ранее перикардита любой формы и этиологии; 5) наличие генерализованной инфекции любой этиологии (в том числе ВИЧ-инфекции, вирусного гепатита, сифилиса и пр.); 6) наличие злокачественных новообразований, кроме первичных злокачественных новообразований головного мозга; 7) наличие в анамнезе перенесенных операций на органах средостения и сердце в частности.

После завершения препарирования перикардальный аллографт помещают в стерильный контейнер с питательной средой RPMI 1640, содержащей ципрофлоксацин (3 мкг/мл), амикацин (12 мкг/мл), метронидазол (12 мкг/мл), ванкомицин (12 мкг/мл) и флуконазол (100 мкг/мл). Стерилизацию ткани в данном растворе осуществляют в течение 24 ч при температуре 4-5 °С. В стерилизующий раствор также помещают дополнительный фрагмент аллоперикарда (1-1,5 см²), который для проведения контроля эффективности стерилизации в дальнейшем направляют на микробиологическое исследование.

Затем в стерильном ламинарном боксе II класса защиты в условиях непрерывного потока стерильного воздуха перикардальный аллографт, предварительно подвергшийся процессу стерилизации, помещают в специальный пакет для криоконсервации и долгосрочного хранения в условиях сверхнизких температур со специальным раствором для криоконсервации. Раствор состоит из 160 мл питательной среды RPMI 1640, 20 мл диметилсульфоксида и 20 мл 10 %-ного человеческого альбумина. После предварительного удаления воздуха пакет для криоконсервации, содержащий перикардальный аллографт и раствор для криоконсервации, запаивают двойным швом с помощью специального термозапаивающего устройства. Каждый пакет маркируют специальным идентификационным номером, соответствующим номеру паспорта аллогرافта.

После этого перикардальный аллографт охлаждают в холодильнике в течение 40 мин для выравнивания температуры содержимого пакета до 4-5 °С, что максимально прибли-

жено к начальной температуре программы криоконсервации. Затем пакет помещают в криокамеру автоматического программно замораживателя. Далее для компенсации выделения латентного тепла при кристаллизации воды температуру в камере охлаждения в течение 10 мин снижают до -40°C с последующим поддержанием ее на данном уровне в течение 15 мин. После этого температуру в камере снижают со скоростью $-1,2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до отметки -70°C , а затем со скоростью $-2^{\circ}\text{C}/\text{мин}$ до отметки -110°C . При этом следует отметить, что изменение температуры содержимого пакета не соответствует изменению температуры охлаждающей камеры. В то же время данная программа криоконсервации позволяет ткани перикардального аллогraftа устойчиво охлаждаться со скоростью примерно $-1^{\circ}\text{C}/\text{мин}$, избегая эффекта колебания температуры, приводящего к повреждению клеток.

Долгосрочное хранение криоконсервированного перикардального аллогraftа до момента использования осуществляют в специальном криохранилище в парах жидкого азота на расстоянии 20 см над уровнем жидкой фазы азота при температуре от -140 до -160°C . Транспортировку криоконсервированного перикардального аллогraftа из криохранилища к месту его использования (операционный блок) осуществляют в сосуде Дьюара с жидким азотом. Предварительно, за 6-8 ч до транспортировки, сосуд Дьюара охлаждают с помощью жидкого азота с целью создания соответствующего температурного режима, необходимого для обеспечения сохранности перикардального аллогraftа.

После выдерживания замороженного перикардального аллогraftа при температуре $22-25^{\circ}\text{C}$ в течение 7 мин пакет помещают в наполненную водой емкость с температурой 38°C на 10-15 мин. При достижении момента полного размораживания перикардального аллогraftа, критерием чего является визуальное отсутствие льда в пакете, последний с соблюдением правил асептики и антисептики вскрывают, а перикардальный аллогraft извлекают в стерильную емкость.

Процесс удаления криопротектанта диметилсульфоксида из размороженного перикардального аллогraftа проводят в три этапа путем последовательного погружения ткани в отмывающие растворы с экспозицией в каждом из них в течение 5 мин. Раствор № 1 содержит 100 мл вышеуказанного раствора для криоконсервации (из размороженного пакета) и 33 мл физиологического раствора. Отмывающий раствор № 2 готовят из раствора № 1 путем добавления в него 66 мл физиологического раствора. В свою очередь, раствор № 3 готовят из раствора № 2 путем добавления в него 200 мл физиологического раствора. После завершения удаления криопротектанта диметилсульфоксида из размороженного перикардального аллогraftа последний визуально оценивают и помещают в стерильную емкость с чистым физиологическим раствором, в которой перикардальный аллогraft находится вплоть до момента осуществления имплантации.

Таким образом, достигаемый технический результат заявляемого способа благодаря предложенной технологии получения, криоконсервации и подготовки к использованию позволяет осуществить заготовку и длительное хранение соответствующего пластического материала на основе донорского аллоперикарда без существенного изменения его нативной морфологической структуры и прочностно-эластических характеристик с целью дальнейшего использования донорского аллоперикарда при проведении реконструктивных кардиохирургических, торакальных и сосудистых оперативных вмешательств.

Источники информации:

1. Tomazic B.B., Chow L.C., Carey C.M., Shapiro A.J. An in vitro diffusion model for the study of calcification of bovine pericardium tissue // J. Pharm. Sci. - 1997. - V. 86 (12). - P. 1432-1438.
2. Chen W., Schoen F.J., Levy R.J. Mechanism of efficacy of 2 amino oleic acid for inhibition of calcification of glutaraldehyde pretreated porcine bioprosthetic heart valves // Circulation. - 1994. - Vol. 90 (1). - P. 323-329.