

Oblasť techniky

Predložený vynález sa týka oblasti transplantácie chondrocytov (zrelých buniek chrupky), transplantácie kostí a chrupiek, liečby, náprav kĺbov a prevencie artritických chorôb. Osobitne sa týka metód prípravy polohy štepov, zariadenia na túto prípravu a autológnych transplantácií buniek na pripravené vrúbľové miesta.

Doterajší stav techniky

Každý rok sa uskutočňuje v Spojených štátoch amerických viac ako 500 000 artroplastických zákrokov a úplných kĺbných náhrad. Približne rovnaký počet podobných postupov sa uskutočňuje v Európe. V týchto číslach je zahrnutých približne 90 000 celkových kolenných náhrad a okolo 50 000 postupov na nápravu poškodenia kolien za rok v Európe. Počet zákrokov je v podstate rovnaký v USA. (V: Praemer A., Furner S., Rice, D. P., Musculoskeletal conditions in the United States, American Academy of Orthopaedic Surgeons, Park Ridge, Ill., 1992, 125). Spôsob regenerácie-liečby chrupky by mal byť čo najvýhodnejší, a mal by sa vykonávať v najskoršom stave poškodenia kĺbu, čím sa zníži počet pacientov, ktorí potrebujú umelé kĺbne náhrady. Týmto preventívnymi postupmi liečenia by sa tiež znížoval počet pacientov s rozvinutou osteo-artritídou.

Techniky používané na vyrovnávanie povrchu chrupkovej štruktúry kĺbov sa pokúšali hlavne o vykonanie nápravy chrupky použitím subchondrálneho vŕtania, abrázie a iných metód, pričom excízia nemocnej chrupky a subchondrálnej kosti zanechávali vaskularizovanú pórovitú kosť obnaženú (Insall, J., Clin. Orthop. 1974, 101, 61; Ficat R. P. a kol., Clin Orthop. 1979, 144, 74; Johnson L. L., In: *Operative Arthroscopy*, McGinty J. B., Ed., Raven Press, New York, 1991, 341).

Coon a Cahn (Science 1966, 153, 1116) opísali techniku kultivácie chrupky syntetizovanými bunkami somitov kuracieho embrya. Neskoršie Cahn a Lasher (PNAS USA 1967, 58, 1131) použili systém na analýzu postihnutí syntéz DNA ako predpokladu na diferenciáciu chrupky. Chondrocyty reagujú na obidva EFG a FGF rastom (Gospodarowicz a Mescher, J. Cell Physiology 1977, 93, 117), ale hlavne stratou svojej rozlišujúcej funkcie (Benya a kol., Cell 1978, 15, 1313). Metódy kultivácie chondrocytov boli opísané a v podstate sú používané s menšími úpravami Brittbergom, M. a kol. (New Engl. J. Med. 1994, 331, 889). Bunky kultivované týmito postupmi boli použité ako autológne transplantáty do kolenných kĺbov pacientov. Ďalej, Kolettas a kol. (J. Cell Science 1995, 108, 1991) skúmali expresiu špecifických molekúl chrupky, ako sú kolagény a proteoglykány, pri predĺženej bunkovej kultivácii. Zistili, že napriek morfológickým zmenám počas kultivácie monovrstvových kultúr (Aulthouse, A. a kol., In Vitro Cell Dev. Biol., 1989, 25, 659; Archer, C. a kol., J. Cell Sci. 1990, 97, 361; Hänselmann, H. a kol., J. Cell Sci. 1994, 107, 17; Bonaventure, J. a kol., Exp. Cell Res. 1994, 212, 97), v porovnaní so suspenziou kultúr rastúcich nad agarózovými géľmi, alginátovými lôžkami alebo ako spinner kultúry (zachovávané si kruhovú bunkovú morfológiu) testovaných rôznymi vedcami, sa nezmenili chondrocytmi exprimované markéry ako typy II a IX kolagény a nezmenili sa veľké zhluknuté proteoglykány, agrekan, versikan a spojený proteín (Kolettas, E. a kol., J. Cell Science 1995, 108, 1991).

Artikulárne chondrocyty sú špecializované mezenchymálne odvodené bunky nájdené iba v chrupke. Chrupka je avaskulárne tkanivo, ktorého fyzikálne vlastnosti závisia od

extracelulárnej matrice produkovanej chondrocytmi. Počas endochondrálnej osifikácie sa chondrocyty podrobujú maturácii vedúcej k bunkovej hypertrofii, charakterizovanej počiatkom expresie kolagénu typu X (Upholt, W. B. a Olsen, R. R., V: *Cartilage Molecular Aspects* (Hall, B. & Newman, S., Eds.) CRC Boca Raton 1991, 43; Reichenberger, E. a kol., Dev. Biol. 1991, 148, 562; Kirsch, T. a kol., Differentiation, 1992, 52, 89; Stephens, M. a kol., J. Cell Sci. 1993, 103, 1111).

Prebytočná degradácia kolagénu typu II vo vonkajších vrstvách artikulárnych povrchov kĺbov je tiež spôsobená osteo-artritídou. Kolagénová sieť je preto zoslabovaná a následne sa rozvíja fibrilácia, čím sa substancie matrice, ako proteoglykány, strácajú a prípadne sa úplne premiestňujú. Taká fibrilácia oslabenej osteoartritickéj chrupky môže dosiahnuť dole na kalcifikovanú chrupku a na subchondrálnu kosť (Kempson, G. E. a kol., Biochim. Biophys. Acta 1976, 428, 741; Roth, V. a Mow, V.C., J. Bone Joint Surgery, 1980, 62A, 1102; Woo, S. L.-Y. a kol., v *Handbook of Bioengineering* (R. Skalak a S. Cien eds.), McGraw-Hill, New York, 1987, str. 4,1 - 4,44).

Opis základného výskumu, histologickej a mikroskopkej anatómie kosti, chrupky a iných takých spojivových tkanív, je možné nájsť napríklad vo Wheeler, Burkitt a Daniels, *Functional Histology*, 2. vyd., (Churchill Livingstone, London, 1987, Kap. 4). Opisy základnej histologickej anatómie defektov v kosti, chrupke a iných spojivových tkanivách je možné nájsť napríklad vo Wheeler, Burkitt, Stevens a Lowe, *Basic Histopathology*, (Churchill Livingstone, London, 1985, Kap. 21).

Cez výhody kultivácie chondrocytov a manipulácií s kosťou a chrupkou neboli dosiahnuté väčšie úspechy pri pokusoch transplantovať chrupku alebo chondrocyty na nápravu poškodených kĺbných povrchov. Opis predloženého vynálezu poskytuje účinné a výkonné prostriedky na promotovanie transplantácie chrupky a/alebo chondrocytov na miesto poškodenia v kĺbe alebo inom chrupkou krytom kosťovým povrchu, pričom chrupka je regenerovaná na fixáciu poškodenia. Predložený vynález rovnako poskytuje chirurgické nástroje, ktoré sú určené na prípravu miesta štepu, aby účinná integrácia transplantovaného materiálu na miesto štepu dopadla úspešne.

Podstata vynálezu

Predmetom vynálezu je súprava (kit) na transplantáciu chondrocytov na povrch kĺbu, ktorá obsahuje hemostatickú bariéru vopred spracovanú na odolanie resorpcii, na uloženie na uvedený povrch, kryciu náplasť vopred spracovanú na odolanie resorpcii, na prekrytie daného povrchu, a organickú glejovinu, na prilepenie uvedenej hemostatickej bariéry a/alebo uvedenej krycej náplasti na daný povrch. Súprava prípadne ďalej obsahuje chirurgický nástroj na tvarovanie stien miesta štepu a matricový materiál vhodný ako nosič chondrocytov.

Predložený vynález poskytuje spôsob účinného liečenia spojivového chrupkového povrchu kĺbu transplantáciou chondrocytov na vhodnej matrici, na povrch, ktorý má byť liečený, s hemostatickou bariérou a krycou bezbunkovou náplasťou, zahrňajúci najskôr vloženie hemostatickej bariéry blízko povrchu, ktorý má byť liečený, vloženie chondrocytov na vhodnej matrici na povrch, ktorý má byť liečený, vzdialene od hemostatickej bariéry, prekrytie povrchu, ktorý má byť liečený, bezbunkovou krycou náplasťou.

Hemostatická bariéra, ako bude ďalej opísaná, je bariéra, ktorá inhibuje alebo bráni prenikaniu vaskularizujúcich

buniek a tkaniva do transplantovaného materiálu. Konkrétne poskytuje predložený vynález hemostatickú bariéru, ktorou je resorbovateľný, semipermeabilný materiál, ktorý inhibuje alebo zabraňuje vaskulárnej infiltrácii bariérou. V jednom rozpracovaní obsahuje hemostatická bariéra kolagén.

Bez bunkový, alebo buniek prostý, ako sa používa tu ako v stave techniky, znamená materiál, ktorý je v podstate bez intaktných buniek, ktoré sú schopné ďalšieho bunkového delenia, promulgácie alebo biologickej aktivity. Vo výhodnom rozpracovaní je buniek prostý materiál bez všetkých intaktných, jadro tvoriacich buniek. V jednom rozpracovaní zahŕňa predložený vynález použitie buniek prostej krycej náplasti, ktorá obsahuje semipermeabilnú kolagénovú maticu. V inom výhodnom rozpracovaní postupu je porézny povrch buniek prostej krycej náplasti priamo na implantovanom materiáli.

Predložený vynález ďalej poskytuje autológnu transplantáciu kolagénu alebo chondrocytov na miesto štepu, pričom miesto štepu bolo najskôr pripravené chirurgickou úpravou na lepší príjem materiálu štepu. V jednom rozpracovaní je miesto štepu modelované tak, že stený štepového miesta sú tvarované v zvlnenom vzore tak, že materiál štepu, keď sa uloží na miesto štepu a rozťahne sa, až sa uvedie do kontaktu so stenou miesta štepu, bude odolný proti odobraniu alebo vypudeniu celého štepu z miesta štepu. Predložený vynález ďalej poskytuje chirurgické nástroje určené na modelovanie miesta štepu, ako je uvažované podľa postupu podľa vynálezu.

Prehľad obrázkov na výkresoch

Predložený vynález bude lepšie vysvetlený na základe nasledujúcich obrázkov, ktoré ilustrujú niektoré vlastnosti predloženého vynálezu, kde:

obr. 1 A je znázornenie typického kĺbneho zakončenia kosti. Typicky je materiál kosti pokrytý na kĺbe chrupkovitým povrchom.

Obr. 1 B ukazuje príklad, keď nastalo poškodenie alebo zranenie na chrupkovitom prekrytí (medzera v chrupke), a tento defekt môže byť liečený priamo, nepatrne rozšírený alebo tvarovaný, aby prijal materiál štepu chirurgickými postupmi pred liečením.

Obr. 1 C ukazuje, ako je hemostatická bariéra (očíslovaná ako 1) vložená na poškodené miesto chrupkovitého prekrytia, aby inhibovala alebo bránila vaskularizáciu na regenerovanej chrupke, od kosti, na ktorej leží. Chondrocyty, ktoré majú byť implantované na dutinu defektu, sú potom uložené navrch hemostatickej bariéry.

Obr. 2 je znázornenie liečeného poškodenia (medzery v chrupke) chrupkovitého prekrytia potiahnutím semipermeabilným bezbunkovým materiálom (označeným ako č. 2), ktorý je použitý, aby tvoril prekrytie/ náplast' alebo bandáž cez poškodené miesto. Toto prekrytie je fixované na mieste, buď zošitím na okraji dutiny v liečenej chrupke, alebo pripojením iným spôsobom. Toto prekrytie pokrýva poškodenú plochu kĺbu, kam je umiestnený transplantát s kultivovanými chondrocytmi/chrupkou, alebo je umiestnený pod čiastočne pripojené prekrytie.

Obr. 3A je schéma znázorňujúca rôznu reakciu na stlačenie a strižné sily tvrdšej a mäkšej chrupky s následnou oblasťou ohraničenia.

Obr. 3B znázorňuje miesto štepu potom, čo bolo vytvorené poškodenie so zvlnenými stenami.

Obr. 3C znázorňuje vytvorené miesto štepu s hemostatickou bariérou (1), transplantovaným materiálom (3), bez-

bunkovou krycou náplast'ou (2) na mieste s artikulárnym chrupkovým povrchom (4).

Obr. 4A znázorňuje jedno rozpracovanie chirurgického prostriedku podľa predloženého vynálezu, vykazujúceho rezacie zuby (5) a dopredu vyčnievajúci vkladací klinec (6). Znázornenie priečneho rezu napravo znázorňuje dve možné konfigurácie rezacích nožov.

Obr. 4B znázorňuje druhé rozpracovanie chirurgického prostriedku podľa predloženého vynálezu.

Obr. 5 je schéma ilustrujúca rôzne modifikované reakcie na stlačenie a strižné sily tvrdšej chrupky a mäkšej chrupky po modelovaní miesta štepu.

Obr. 6A je obraz MRI kolena prasiatka vykazujúceho poškodenie chrupky v ľavom (mediálnom) kĺbnom hrbole.

Obr. 6B je obraz MRI rovnakého kolena prasiatka tri mesiace po liečbe.

Príklady uskutočnenia vynálezu

Tento vynález sa týka použitia určitých výrobkov, ktoré inhibujú tvorbu vaskulárneho tkaniva, napríklad ako sú vytvorené kapilárne kľučky vyčnievajúce do chrupky, počas postupu autológnej transplantácie chondrocytov na postihnuté miesto chrupky. Tvorba vaskulárneho tkaniva zo spodnej kosti má snahu sa premietat' do novotvorenej chrupky, čo vedie k objaveniu sa iných buniek, ako požadovali mezenchymálne špecializované chondrocyty.

Kontaminujúce bunky zavádzané vaskularizáciou môžu viesť k zvýšeniu zásahu a prerastaniu do chrupky tvorenej implantovanými chondrocytmi. Jedným z typov komerčných produktov, ktoré môžu byť použité v tomto vynáleze, je Surgicel^(R) (Ethicon Ltd., UK), ktorý sa absorbuje po 7 až 14 dňoch. Použitie tohto materiálu v postupe podľa predloženého vynálezu je opakom bežného použitia hemostatického prostriedku, ako je Surgicel^(R), ako je to opísané vo vloženom letáku od Ethicon Ltd.

Prekvapivo sme zistili, že v situácii, keď si prajete inhibovať revaskularizáciu v chrupke, pôsobí hemostatický materiál ako gélu podobný umelý koagulát. Pokiaľ by boli prítomné bunky červených krviniek v plnej hrúbke poškodenia artikulárnej chrupky, ktorá je pokrytá takou hemostatickou bariérou, budú tieto červené krvinky premenované na hematín, a takto sa urobia neschopnými indukovať vaskulárny rast. Preto hemostatický produkt použitý ako revaskularizačná inhibičná bariéra s, alebo bez fibrínových adhezív, ako je napríklad Surgicel^(R), je účinný pre predložený postup, ako je mienený predloženým vynálezom. Inou časťou tohto vynálezu je použitie komponenty bez buniek, ktorá je použitá ako náplast' pokrývajúca poškodenú plochu kĺbu, na ktorej sú transplantované kultivované chondrocyty/chrupka, použitím na transplantáciu autológnych chondrocytov. Postup podľa vynálezu sa tiež týka použitia vhodných alogenických chondrocytov alebo xenogenických chondrocytov na opravu chrupkových defektov.

Preto predložený postup opisuje metódu účinnej opravy alebo liečby poškodenia chrupky v artikulárnych kĺbných kost'ových prekrytiach, ktorá zahŕňa podávanie činidla alebo prostriedku na blokovanie vaskulárnej invázie do miesta chrupky, ktoré má byť opravené, a tiež poskytnutie buniek prostej bariéry, ktorá bude izolovať opravené miesto a udržovať: transplantované bunky na mieste. Preto predložený vynález tiež poskytuje kit obsahujúci hemostatický bariérový komponent na vloženie na miesto, ktoré má byť liečené tak, že dôjde k účinnej inhibícii vaskularizácie na mieste, ktoré je opravované; a chondrocyty, ktoré majú byť transplantované, sú uložené na miesto, ktoré sa opravuje, semi-

permeabilná buniek prostá bariéra je prekrytá cez opravené miesto tak, že transplantované chondrocyty sú udržované na mieste, ale sú ešte schopné zvyšovať prístup živín.

Niektoré aspekty vynálezu boli doložené príkladmi použitia in vitro systému pri štúdiu správania chondrocytov, keď sú v kontakte s určitým produktom alebo kombináciou určitých produktov, ktoré inhibujú tvorbu vaskulárneho tkaniva. Tento in vitro test predpovedá schopnosť určitých testovaných materiálov inhibovať vaskularizáciu, ktorá nastane in vivo, keď sa vytvoria kapilárne kľučky prenikajúce do chrupky počas autológnej transplantácie chondrocytov do defektov chrupky.

Vhodné hemostatické produkty sú charakterizované tým, že majú schopnosť inhibovať rast alebo inváziu vaskulárneho tkaniva, osteocytov, fibroplastov a pod. do rozvíjajúcej sa chrupky. Vhodný hemostatický materiál dosiahne cieľ metódy podľa predloženého vynálezu tým, že bude zabránené vaskulárnej alebo celulárnej invázii do rozvíjajúcej sa chrupky, aby sa optimalizovala tvorba chrupky a dosiahla sa oprava plnej hrúbky poškodenia artikulárnej chrupky. V ideálnom stave bude hemostatická bariéra stabilná po široké časové obdobie, postačujúce k úplnej oprave chrupky, a potom schopná resorbovať alebo inak sa zničiť v priebehu času. Jeden materiál identifikovaný ako vhodný sa nazýva Surgicel^(R) W1912 (absorbovateľný hemostat obsahujúci oxidovanú regenerovanú sterilnú celulózu; Lot GG3DH, Ethicon Ltd, UK). Iným príkladom vhodného materiálu je BioGide^(R) (podložka komerčne dostupného typu I kolagénovej matrice; Geistlich Söhne, Švajčiarsko).

Vhodný organický glejový materiál môže byť zaistený komerčne, ako je napríklad Tisseel^(R) alebo Tissucol^(R) (adhezívum na báze fibrínu; Immuno AG, Rakusko), Adhesive Protein (Cat. #A-2707, Sigma Chemical, USA) a Dow Corning Medical Adhesive B (Cat.#895-3, Dow Corning, USA).

Chirurgické nástroje uvažované podľa predloženého vynálezu môžu byť vyrobené z kovu a/alebo plastu vhodného na chirurgické instrumenty na jednorazové alebo na viacnásobné použitia. Rezacie nástroje obsahujú rezacie zuby, ktoré sú plne kruhové alebo ploché, alebo niečo medzi tým. Pretože je chrupka relatívne mäkký materiál, môže byť výhodné vyrobiť tvrdené plastové rezacie okraje, ktoré budú schopné formovať chrupku bez toho, že by boli schopné poškodiť kosť. Tieto rezacie nástroje môžu byť vyrobené na vytvorenie otvorov na podávanie tekutiny, odoberanie odrezaných zvyškov a tekutiny odsátím, na optické vlákna na osvetlenie a objasnenie defektného miesta.

Niektoré aspekty predloženého vynálezu budú lepšie zrozumiteľné na základe nasledujúcich príkladov, ktoré sú uvedené na ilustráciu, nie však akékoľvek obmedzenie.

Príklad 1

Aby mohol byť Surgicel^(R) použitý podľa predloženého vynálezu na prevenciu vzniku krvných ciev v autológnej implantovanej chrupke alebo chondrocytoch, bol Surgicel^(R) najskôr spracovaný s fixačným prostriedkom, ako je glutaraldehyd. Krátko, Surgicel^(R) bol spracovaný s 0,6 % glytar-aldehydom počas 1 minúty, nasledovalo niekoľkokrát premytie pre elimináciu zvyškov glutar-aldehydu, ktoré sú inak pre tkanivo toxické. Alebo môže byť Surgicel^(R) spracovaný s fibrínovým adhezívom označovaným Tisseel^(R) pred spracovaním s glutaraldehydom, ako je opísané v príklade 2. Bolo zistené, že Surgicel^(R) fixovaný napríklad fixačným prostriedkom, ako je glutaraldehyd, premytý ste-

rilným fyziologickým roztokom (0,9 %) a uložený v mrazničke, sa nerozpúšťa počas 1 až 2 mesiacov. Všeobecne je Surgicel resorbovaný v čase medzi 7 a 14 dňami. Tento čas je príliš krátky, pretože je potrebný dlhší čas na bránenie vzniku krvných ciev alebo vaskularizácii samotnej z kostrovej štruktúry do implantovanej chrupky predtým, ako dorastú implantované chondrocyty na pevnú chrupkovú vrstvu, ktorá dostáva svoje nutričné požiadavky z najbližšej chrupky. Inými slovami, postačujúca inhibícia vaskularizácie je potrebná po dlhší čas, ako je napríklad jeden mesiac. Preto by nemal byť produkt absorbovaný výrazne pred týmto časom. Na druhú stranu, resorpcia je nakoniec potrebná. Preto by mal mať organický materiál, použitý ako inhibičná bariéra, tieto schopnosti, a bolo zistené, že Surgicel^(R), spracovaný týmto spôsobom, túto funkciu poskytne.

Príklad 2

Surgicel^(R) bol tiež potiahnutý organickou glejovinou, v tomto prípade bol použitou glejovinou Tisseel^(R) ale iné môžu byť použité tiež. Tento produkt, spoločne so Surgicelom^(R), produkuje použiteľnú bariéru na konkrétny účel vynálezu. Akákoľvek hemostatická alebo vaskulárna inhibičná bariéra môže byť použitá. Tisseel^(R) bol miešaný, ako je opísané ďalej. Potom bol Surgicel^(R) potiahnutý prostriedkom Tisseel^(R) sprejovým nanosením na materiál Surgicel^(R) na oboch stranách, až do namočenia. Potom bol Tisseel^(R) (fibrínová glejovina) ponechaný stuhnúť pri teplote miestnosti. Bezprostredne pred ukončením tuhnutia bol potiahnutý Surgicel^(R) vložený do 0,6 % glutaraldehydu na 1 minútu a potom bol premytý sterilným fyziologickým (0,9 %) roztokom. Potom bolo pH upravené PBS a/alebo NaOH, až bolo pH stabilné pri 7,2 až 7,4. Neskoršie bol takto spracovaný Surgicel premytý 15 mM Hepes tlmivým roztokom v tkanivovom kultivačnom médiu, ako je minimálne základné médium/F12.

Ako bolo uvedené, použili sme v tomto prípade Tisseel^(R) ako fibrínové adhezívum na potiahnutie Surgicelu^(R). Ďalej tiež môže byť fibrínové adhezívum alebo glejovina aplikované priamo na dno poškodenia smerom ku kosti, na ktorej je Surgicel^(R) nalepený. Použitý systém in vitro, namiesto testovania in vivo, sa skladal z NUNCTM Delta 6-priehľadovej sterilnej likvidovateľnej dosky pre výskumné práce buniek (NUNC, InterMed, Roskilde, Dánsko). Každá priehľadná merala v priemere približne 4 cm.

Podľa vynálezu môže byť fibrínovým adhezívom akékoľvek adhezívum, ktoré spoločne s fibrínovou zložkou produkuje glejovinu, ktorá je ľuďmi tolerovaná (Ihara, N, a kol., Bums Incl. Therm. Inj., 1984, 10, 396). Vynález tiež anticipuje inú ďalšiu fázovú zložku, ktorá môže byť použitá namiesto fibrínového adhezíva. V tomto vynáleze sme použili Tisseel^(R) alebo Tissucol^(R) (Immuno AG, Viedeň, Rakúsko). Kit Tisseel^(R) sa skladá z nasledujúcich zložiek:

Tisseel^(R), lyofilizovaný, vírusovo inaktivovaný Sealer, obsahujúci proteín schopný zrážania, z toho: fibrinogén, Plazmový fibronektín (CIG) a Faktor XIII, a Plazminogén.

Roztok aprotinínu (hovädzieho)

Trombín 4 (hovädzí)

Trombín 500 (hovädzí)

Roztok chloridu vápenatého

Kit Tisseel^(R) obsahuje aplikačný systém DUPLOJECT^(R). Fibrínové adhezívum alebo dvojzložkové tesnivo používajúce kit Tisseel^(R) je spojené spôsobom podľa vložného listu Immuno AG produktu.

Príklad 3

Chondrocyty boli kultivované v minimálnom základnom kultivačnom médiu obsahujúcom HAM F12 a 15 mM Hepes tlmivého roztoku a 4 až 7,5 % autológneho séra v inkubátore s CO₂ pri 37 °C a uchované v laboratóriu Triedy 100 vo Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Kodaň, Dánsko. Na kultivácie chondrocytov môžu byť použité aj iné zloženia kultivačného média. Bunky boli trypsinované použitím trypsinu EDTA počas 5 až 10 minút a sčítané pomocou farbenia životaschopnosti Trypanovou modrosťou v Bürker-Türk komore. Počet buniek bol upravený na 7,5 x 10⁵ buniek na ml. Jedna doska NUNCLON™ bola nezakrytá v laboratóriu Triedy 100.

Surgicelová^(R) hemostatická bariéra bola rozrezaná na veľkosť vhodnú na dno priehlbne v NUNCLON™ tkanivovej kultivačnej miske. V tomto prípade sú kruhové, s veľkosťou približne 4 cm (ale môžu byť akejkolvek vhodnej veľkosti) a sú vložené za aseptických podmienok na dno v priehlbni NUNCLON™ Delta 6-priehlbňovej sterilnej likvidovateľnej dosky na výskumné práce buniek (NUNC, InterMed, Roskilde, Dánsko). Hemostatická bariéra, ktorá má byť vložená na dno priehlbne, bola vopred ošetrovaná, ako je uvedené v príklade 1. Toto ošetrovanie zdržiava výrazne absorpciu Surgicelu. Potom bola hemostatická bariéra niekoľkokrát premytá v destilovanej vode a postupne toľkokrát, až bol vymytý nezreagovaný glutaraldehyd. Malé množstvo bunkového kultivačného média obsahujúceho sérum bolo aplikované na absorpciu hemostatickou bariérou a súčasne na udržanie hemostatickej bariéry vlhkom na dne priehlbne.

Približne 10⁶ buniek v 1 ml kultivačného média bolo vložených priamo navrch hemostatickej bariéry, rozptýlených cez celý povrch hemostatickej bariéry vopred ošetrovanej 0,4 % glutaraldehydom, ako bolo opísané. Potom boli misky inkubované v CO₂ inkubátore pri 37 °C počas 60 min. Množstvo 2 až 5 ml tkanivového kultivačného média obsahujúceho 5 až 7,5 % séra bolo opatrne pridávané do priehlbni obsahujúcich bunky a na zabránenie postriekania buniek sa držala pri vypúšťaní média špička pipety tangenciálne k stene priehlbne. Ukázalo sa, že pH média bolo príliš nízke (pH okolo 6,8). Potom bolo pH upravené na 7,4 až 7,5. Ďalší deň začali niektoré z chondrocytov rásť na hemostatickej bariére a vytvárať zhluky. Niektoré z buniek zahynuli vzhľadom na pôsobenie nízkeho pH pred úpravou pH. Dosky boli inkubované počas 3 až 7 dní, so zmenou prostredia v deň 3.

Na konci inkubačnej periódy bolo prostredie dekantované a bol pridaný studený zmrznutý 2,5 % glutaraldehyd obsahujúci 0,1M sodnú soľ dimetylarsínovej kyseliny (tiež označovaný kakodylát sodný, pH upravené pomocou HCl na 7,4) ako fixačný prostriedok na prípravu buniek a nosiča (hemostatická bariéra) na neskoršiu prípravu na elektrónovú mikroskopiu.

Príklad 4

Chondrocyty boli kultivované v minimálnom základnom kultivačnom médiu obsahujúcom HAM F12 a 15 mM Hepes tlmivého roztoku a 5 až 7,5 % autológneho séra v CO₂ inkubátore pri 37 °C a uchované v laboratóriu Triedy 100 vo Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Kodaň, Dánsko. Na kultivácie chondrocytov môžu byť použité aj iné zloženia kultivačného média. Bunky boli trypsinované použitím trypsinu EDTA počas 5 až 10 minút a sčítané pomocou farbenia životaschopnosti Trypanovou modrosťou v Bürker-Türk komore. Počet buniek bol upravený na 7,5 x 10⁵ buniek na ml. Jedna doska NUNCLON™ bola odkrytá v laboratóriu Triedy 100.

Surgicel^(R) (na použitie ako hemostatická bariéra) bol ošetrovaný 0,6 % glutaraldehydom počas 1 minúty, ako je opísané v príklade 1, a premytý 0,9 % sterilným roztokom chloridu sodného alebo, výhodne, tlmivým roztokom, ako je PBS tlmivý roztok alebo kultivačné médium, ako je MEM/F12, pretože pH je po ošetrovaní glutaraldehydom 6,8 a malo by byť prednostne 7,0 až 7,5. Tisseel^(R) bol aplikovaný na obidvoch stranách Surgicelu^(R) použitím DUPLOJECT^(R) systému, a takto vytvoril poťah na obidvoch stranách Surgicelu^(R), keď sa uvažuje o použití náplasti, s fibrinovým adhezivom. Glejovina sa ponechá uschnúť za aseptických podmienok počas aspoň 3 až 5 minút. „Potiahnutá“ hemostatická bariéra sa vloží na dno priehlbne v NUNCLON™ Delta 6ti priehlbňovej sterilnej likvidovateľnej dosky na výskumnú prácu. Malé množstvo kultivačného média tkaniva obsahujúceho sérum bolo použité na absorpciu do hemostatickej bariéry. Približne 10⁶ buniek v 1 ml tkanivového kultivačného média obsahujúceho sérum bolo vložených priamo navrch Hemostatu, dispergované na povrch hemostatickej bariéry. Potom boli dosky inkubované v CO₂ inkubátore pri 37°C počas 60 minút. Množstvo 2 až 5 ml tkanivového kultivačného média obsahujúceho 5 až 7,5 % séra bolo opatrne pridávané do priehlbni obsahujúcich bunky a na zabránenie postriekania buniek sa držala pri vypúšťaní média špička pipety tangenciálne k stene priehlbne. Po 3 až 6 dňoch prieskum mikroskopom ukázal, že bunky prilipli a rástli na Surgicel^(R) vyhovujúcim postupom, čo svedčí o tom, že Surgicel^(R) nevykazoval toxicitu k chondrocytom a že chondrocyty rástli uspokojivo na Surgicel^(R).

Dosky boli inkubované počas 3 až 7 dní, so zmenou prostredia v deň 3. Na konci inkubačnej periódy bolo prostredie dekantované a bol pridaný studený zmrznutý 2,5 % glutaraldehyd obsahujúci 0,1M sodnú soľ dimetylarsínovej kyseliny, tiež označovaný kakodylát sodný, pH upravené pomocou HCl na 7,4, ako fixačný prostriedok na prípravu buniek a nosiča (hemostatická bariéra) na neskoršiu prípravu na elektrónovú mikroskopiu.

Príklad 5

Chondrocyty boli kultivované v minimálnom základnom kultivačnom médiu obsahujúcom HAM F12 a 15 mM Hepes tlmivého roztoku a 5 až 7,5 % autológneho séra v CO₂ inkubátore pri 37 °C a uchované v laboratóriu Triedy 100 vo Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Kodaň, Dánsko. Bunky boli trypsinované použitím trypsinu EDTA počas 5 až 10 minút a sčítané pomocou farbenia životaschopnosti Trypanovou modrosťou v Bürker-Türk komore. Počet buniek bol upravený na 7,5 x 10⁵ až 2 x 10⁶ buniek na ml. Jedna doska NUNCLON™ bola odkrytá v laboratóriu Triedy 100.

Bolo zistené, že Bio-Gide^(R) môže byť použitý ako resorbovateľná dvojvrstvá membrána, ktorá sa použije ako náplast alebo bandáž pokrývajúca poškodenú plochu kĺbu, kam budú kultivované chondrocyty, rovnako ako hemostatická bariéra, transplantovaná. Bio-Gide^(R) je membrána z čistého kolagénu získaná štandardizovaným riadeným výrobným postupom (od E. D. Geistlich Söhne AG, CH-6110 Wolhusen). Kolagén je vyrezaný z veterinárne overených osípaných a je opatrne purifikovaný, aby sa zabránilo antigénnym reakciám, a sterilizovaný v dvojitéch blistroch T-ožiarovaním. Dvojvrstvá membrána má porézny povrch a hustý povrch. Membrána je vyrobená z kolagénu typu I a typu III bez ďalšieho sitovania alebo chemického ošetrovania. Kolagén je resorbovaný 24 týždňov. Membrána si ponecháva svoju štruktúrnu integritu dokonca za vlhka a môže byť upevnená prišíťím alebo klincom. Membrána

môže byť rovnako „zlepená“ použitím fibrínového adhezíva, ako je Tisseel^(R) k najbližšie rastúcej chrupke alebo tkanivu, buď miesto šitia ihlou, alebo spoločne so šitím.

Bio-Gide^(R) bol nepotiahnutý v laboratóriu Triedy 100 a vložený za aseptických podmienok na dno priehlbni v NUNCLONTM Delta 6ti priehlbňovej sterilnej likvidovateľnej dosky na výskumnú prácu - buď s poréznym povrchom dvojvrstvovej membrány lícom hore, alebo so stranou s hustým povrchom hore. Približne 10^6 buniek v 1 ml tkanivového kultivačného média obsahujúceho sérum bolo vložených priamo navrch Bio-Gide^(R), dispergovaných na povrchu porézneho alebo hustého povrchu Bio-Gide^(R). Potom bola doska inkubovaná v CO₂ inkubátore pri 37 °C počas 60 minút. Množstvo 2 až 5 ml tkanivového kultivačného média obsahujúceho 5 až 7,5 % séra bolo opatrne pridávaných do priehlbne obsahujúcej bunky a na zabránenie postriekania buniek sa držala pri vypúšťaní média špička pipety tangenciálne k stene priehlbne.

Druhý deň potom boli chondrocyty vložené do priehlbne obsahujúcej Bio-Gide^(R) a bunky boli skúmané Nikon Inverted mikroskopom. Bolo zaznamenané, že niektoré chondrocyty prilipli k okraju Bio-Gide. Samozrejme nebolo možné pozerat' sa cez Bio-Gide samotný použitím tohto mikroskopu.

Dosky boli inkubované počas 3 až 7 dní so zmenou prostredia v deň 3. Na konci inkubačnej periódy bolo prostredie dekantované a bol pridaný studený zmrznutý 2,5 % glutaraldehyd obsahujúci 0,1M sodnú soľ dimetylarsínovej kyseliny, tiež označovaný kakodylát sodný, pH upravené pomocou HCl na 7,4, ako fixačný prostriedok na prípravu buniek a Bio-Gide^(R) nosiče s bunkami kultivovanými buď na poréznom povrchu, alebo na hustom povrchu. Potom boli Bio-Gide^(R) náplasti zaslané na elektrónovú mikroskopiu do Oddelenia patológie, Herlev nemocnice, Dánsko.

Elektrónová mikroskopia ukázala, že chondrocyty kultivované na hustom povrchu Bio-Gide^(R) nerástli na kolagénovej štruktúre Bio-Gide^(R), zatiaľ čo bunky kultivované na poréznom povrchu naozaj rástli na kolagénovej štruktúre a ďalej vykazovali prítomnosť proteoglykánov a žiadne známky fibroblastových štruktúr. Tento výsledok ukazuje, že keď je kolagénová náplast', ako napríklad náplast' Bio-Gide^(R), prísť ako náplast' kryjúca poškodenie chrupky, porézny povrch má byť lícom dole smerom k poškodeniu, kam budú kultivované chondrocyty injektované. Ty potom budú schopné preniknúť kolagénom a produkovať hladký chrupkový povrch v zhode s neporušeným povrchom, na tejto ploche bude vystavená hladká vrstva proteoglykánov. Naproti tomu, keď hustý povrch kolagénu je lícom dole na poškodenie, chondrocyty, ktoré majú byť implantované, sa nezjednotia s kolagénom, a bunky nebudú produkovať rovnaký hladký povrch, ako to bolo opísané.

Priklad 6

Chondrocyty boli kultivované v minimálnom základnom kultivačnom médiu obsahujúcom HAM F12 a 15 mM Hepes tlmivého roztoku a 5 až 7,5 % autológneho séra v CO₂ inkubátore pri 37 °C a uchované v laboratóriu Triedy 100 vo Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Kodaň, Dánsko. Bunky boli trypsinované použitím trypsinu EDTA počas 5 až 10 minút a sčítané pomocou farbenia životaschopnosti Trypanovou modrosťou v Bürker-Türk komore. Počet buniek bol upravený na $7,5 \times 10^5$ až 2×10^6 buniek na ml. Jedna doska NUNCLONTM bola nekrytá v laboratóriu Triedy 100.

Bio-Gide^(R), použitá ako resorbovateľná dvojvrstvová membrána, môže byť tiež použitá spoločne s organickou glejovinou, ako je Tisseel^(R) s ďalším, výrazne vyšším ob-

sahom aprotinínu, ako sa normálne v Tisseel^(R) nachádza, ako je opísané v produktovom letáku. Zvýšením obsahu aprotinínu na asi 25 000 KIU/ml bude resorpcia materiálu odložená o týždeň, namiesto normálneho rozpätia dní.

Na testovanie tohto znaku in vitro je Tisseel^(R) aplikovaný na dno priehlbne NUNCLONTM dosky, a ponechaný úplne stuhnúť. Kolagénová náplast', ako je Bio-Gide^(R), je potom aplikovaná cez Tisseel^(R) a prilipnutá na dno priehlbne. Táto kombinácia Bio-Gide^(R) a Tisseel^(R) je označená ako hemostatická bariéra, ktorá bude inhibovať alebo brániť rozvoju infiltrácie krvných ciev do plochy transplantácie chondrocytov. Táto hybridná kolagénová náplast' môže byť teraz použitá pre obidva, ako hemostatická bariéra na spodku lézie (najbližšie k povrchu, ktorý sa opravuje), ale tiež ako podložka (nosič) na tvorbu chrupky, pretože distálny povrch môže byť porézna strana kolagénovej náplasti, a tak podporuje infiltráciu chondrocytov a chrupkovej matrice. Preto môže byť táto hybridná kolagénová náplast' použitá tiež na prekrytie vrchu implantátu s kolagénovým poréznym povrchom smerom dole k implantovaným chondrocytom a tvoriacim bariéru navrchu. Hybridná kolagénová náplast', so zvýšeným obsahom aprotinínu, môže tiež byť použitá bez organickej glejoviny, ako je Tisseel^(R), a uložená na poškodenie priamo, prilipnutím prirodzenou silou. Preto môže byť kolagénová náplast' použitá ako hemostatická bariéra a buniek prosté zakrytí opravovaného/transplantovaného miesta, s poréznym povrchom náplasti orientovaným smerom k transplantovaným chondrocytom/chrupke. Iný variant môže použiť kolagénovú náplast', ktorá sa skladá z kolagénu typu II (ako od Geistlich Sohne AG, CH-6110 Wolhusen).

Predložený vynález teda poskytuje hybridnú kolagénovú náplast', kde je uvedenou náplast'ou kolagénová matrica so zvýšenou hladinou obsahu aprotinínu, prednostne okolo 25 000 KIU/ml, v spojení s organickou matricovou glejovinou, kde je kolagénová zložka podobná Bio-Gide^(R) resorbovateľnému dvojvrstvomému materiálu kolagénu typu II, a organická glejovina je podobná materiálu Tisseel^(R). V inom rozpracovaní nepoužíva hybridná kolagénová náplast' žiadne organické glejoviny na prilepenie na opravované miesto.

Priklad 7

Vzhľadom na oslabenú štruktúru osteoartritickej chrupky môže byť prilipavosť kultivovaných autológnych chondrocytov transplantovaných na vrúbľové miesto poškodennej chrupky obmedzená, tvorí sa marginálna zóna (zóna ohraničenia) medzi novoimplantovanou chrupkou/chondrocytmi a susednou tvorenou chrupkou. Táto marginálna zóna bude najzreteľnejšia, keď je vrúbľovacie miesto pripravené na štep vytvorením rovných hladkých stien vyrezaných v lineárnom tvare. Strižné sily a sily stlačenia cez takú marginálnu zónu (ako je znázornené na obr. 3A) budú uplatňovať veľkú silu na posunutie štepu, keď je miesto štepu rozrezané v lineárnom tvare. Marginálna zóna a rozdielny pohyb materiálov pozdĺž tejto zóny budú inhibovať súbežné liečenie medzi materiálom štepu a okolitým materiálom. Trhanie marginálnej zóny je vyvolávané, pokiaľ je tvrdosť priliehajúceho materiálu rôzna. V mnohých prípadoch je materiál štepu mäkkší ako okolitý materiál, ale v niektorých prípadoch osteoartritickej choroby môže byť okolitá chrupka v skutočnosti mäkkšia ako implantované chondrocyty/chrupka.

Preto, na vyriešenie tohto problému, uvádza postup podľa vynálezu použitie chirurgických nástrojov na tvarovanie stien miesta štepu tak, že sú steny nelineárne, a takto tvorí zvlnené povrchy, ktoré znižujú trhanie marginálnej

zóny a zaisťujú zakotvenie materiálu štetu. Rovnako je možné tvarovať miesto štetu tak, že priemer miesta bližšieho k povrchu kosti má väčší rozmer, ako otvor vzdialenejší od kosti a povrchu chrupky, ktorá sa má opraviť, takže dôjde k efektu „reverzného lievika“. Zúžený otvor na povrchu bráni redukciou trhania marginálnej zóny a vypudenia materiálu štetu z miesta štetu. Výhodné rozpracovanie opisuje tvarovanie stien miesta štetu v tvare podobnom vsunutému otvoru na príjem upevnenia alebo skrutky (ako je znázornené na obr. 3B), a takto poskytuje mechanickú odolnosť proti stlačeniu a/alebo vypudeniu materiálu štetu z miesta štetu, čo je možné opísať ako „mužské“ alebo „ženské“ vsunutie.

Chirurgické nástroje uvažované podľa predloženého vynálezu môžu byť vyrobené z kovu a/alebo plastu vhodného na prípravu chirurgických nástrojov na jedno použitie alebo viacnásobné opätovné použitie. Pretože je chrupka relatívne mäkký materiál, je výhodné vyrábať vytvrdené plastické rezacie okraje, ktoré budú schopné tvarovať chrupku bez toho, že by poškodili kosť. Tieto prerezávacie nástroje môžu byť vyrobené na vytváranie otvorov na podávanie tekutiny, odsávanie odrezaných zlomkov a tekutiny, a vedenie optických vlákien na osvetlenie a zviditeľnenie poškodeného miesta. V niektorých rozpracovaniach nástrojov môže mať základ nástroja dopredu vystupujúci bod alebo špendlíku podobnú štruktúru, ktorá napomáha vo vedení a uložení nástroja na miesto štetu. Samozrejme by mal byť taký hrot tvarovaný tak, aby bolo minimálne poškodenie kosti ležiacej pod ním.

Zatiaľ čo vyrezávacím povrchom nástroja môže byť jednotlivý zub, alebo niekoľké zuby, alebo opísaný skrutke podobný vzor, ako je ten v kovovom závitníku použitom na tvorbu závitových otvorov v kovových častiach. Charakteristika požadovaná pre vyrezávací nástroj je taká, aby vytvorené vytvarované miesta boli vlnité, a nie lineárne. V niektorých rozpracovaniach napríklad môžu byť rezacie okraje nástroja tvarované podobne, ako je znázornené na obr. 4A alebo ako je na obr. 4B. Rezacie okraje môžu byť rovné, alebo kruhové tak, že obaľujú vókol priemer rezacieho nástroja. Môže byť navrhnutých veľa iných tvarov na účely postupu podľa predloženého vynálezu, aby bolo vytvorené rozhranie, ktoré poskytuje mechanickú odolnosť proti rôznym reakciám na stlačenie a pôsobenie strihových síl na transplantovaný materiál a okolitý materiál.

Príklad 8

Štyri mesiace staré prasiatko Yorkshirského plemena bolo podrobené úplnej anestézii a uložené na chrbát. Prasiatko bolo omyté a zakryté na chirurgickej súprave v „Harrington Arthritis Research Center“, vo Phoenixe v Arizone. Celý chirurgický zákrok bol vykonaný asepticky. Ľavá zadná noha a priliehajúce brucho a plocha slabiny boli očistené jódom. Kolenný kĺb bol lokalizovaný, a jabĺčko bolo lokalizované. Stredný rez bol uskutočnený približne 3 cm od posteriornej časti jabĺčka a približne bolo odrezaných niekoľko subkutis, svalových vrstiev a ligamentov, aby sa získal prístup k strednej femorálnej kondyle. Použitím kruhového dláta bola pripravená lézia v bielej chrupke na strednej časti mediálnej kondyly, pri zanechaní 0,5 až 1 cm okraja ku koncu chrupkovitého prekrytia posterior-mediálnej časti kondyly (ľavá kondyla, obr. 6A). 0,5 až 1 cm defekt bol umiestnený na kaudálnu hmotnosť nesúcu časť mediálnej kondyly. Celý chirurgický zákrok bol vykonaný bez stlačenia na ľavý femur. Rôzne vrstvy a koža boli príslušným spôsobom zošité.

Tretí deň bolo zviera opäť prenesené na chirurgické miesto a uložené ako prv na chirurgický stôl a uvedené do

celkovej anestézie. Ľavá zadná noha, brucho a oblasť slabiny boli ionizované, ako bolo uvedené. Stehy by rozstrihnuté a plocha otvorená. Bolo zaznamenané, že v kolennom kĺbe je prítomný mierny hematóm. Krvná zrazenina bola odstránená a defekt vyšetrený pohľadom. Bola tu krvná zrazenina, ktorá bola odstránená. Sterilný chirurgický nástroj vybavený „mužským“ závitovým rezacím okrajom, s veľkosťou zodpovedajúcou, alebo mierne väčšou, ako je obvod lézie, bol opatrne naskrutkovaný dole na defekt. Vložka z Bio-Gide^(R) bola rozrezaná na veľkosť zodpovedajúcej spodnej časti defektu. Prvá použitá glejovina, nazvaná Adhesive Protein (A-2707, Sigma Chemical, USA) bola nanesená na hustú stranu upravenej vložky hemostatickej bariéry, a vložka bola vložená hustou stranou dole na dno lézie, a použitá ako bariéra, ako je opísané. Bolo pozorované, že glejovina neschne veľmi rýchlo. Mierne krvácanie od spodku defektu sa okamžite zastavilo. Druhý Bio-Gide(R) bol urezaný s o niečo väčším priemerom, ako lézia, a bol vložený hustou stranou navrch (takže porézna strana bola dole smerom k štetu), ako bolo opísané.

Táto nebunková krycia vložka potom bola prišitá na dutinu s ponechaným jedným koncom otvoreným, kde môžu byť chondrocyty, ktoré majú byť implantované, injektované do miesta štetu. Priliehajúce časti ku koncu vložky boli prekryté druhou glejovinou, Dow Corning Medical Adhesive B (Cat.#895-3, Dow Corning, USA). Táto druhá glejovina sa sušila oveľa rýchlejšie a oveľa účinnejšie ako prvá glejovina. Bolo zistené, že počas tohto osobitného postupu nebola prvá glejovina usušená dostatočne na to, aby pri skúške zošitia pokrytia udržala hemostatickú bariéru na mieste. Hlavná bariéra vytvorená na proximálnom povrchu miesta štetu bola glejovinou samotnou.

Použitím 1 ml striekačky a ihly 16 bola bunková suspenzia chondrocytov (okolo 0,6 ml) natiagnutá do zásobníka striekačky. Krátka ihla miery 23 bola prepojená na ihlu miery 16, a bunková suspenzia bola injektovaná pod prišitú kryciu náplasť na miesto štetu (okolo 10 x 10⁶ buniek). Potom bol otvorený kraj vložky prilpený, pred vyberaním ihly, a ihla bola opatrne vytiahnutá. Nebolo pozorované žiadne presakovanie buniek. Rana bola zošitá, žiadny turniket nebol použitý, žiadne krvácanie nebolo pozorované. Konečné kožné vrstvy boli prišité. Po prišití neboli pozorované žiadne protrezy kože, čo značí, že tam nebol žiadny hematóm. Postoperačné vyliečenie bolo bez mimoriadnych udalostí.

Ako sa predpokladalo, transplantované chondrocyty produkovali chrupkovú maticu dostatočnú na to, aby bol opravený defekt vytvorený v artikulárnom chrupkovom povrchu kolenného kĺbu testovaného zvieraťa. Obr. 6A je MRI obraz kolena prasiatka, ktorý ukazuje poškodenie chrupky vytvorené v kolene (ľavá kondyla, mediálna kondyla), a obr. 6B je MRI obraz rovnakého kolena prasiatka tri mesiace po liečbe, ktoré ukazuje opravu poškodenia.

Príklad 9

Kit obsahujúci zložky vhodné na realizáciu postupu podľa vynálezu umožní bežné vykonávanie postupu podľa vynálezu v chirurgickom prostredí. Vo výhodnom rozpracovaní poskytuje kit podľa vynálezu sterilné zložky určené na ľahké použitie v chirurgickom prostredí, a poskytne vhodnú hemostatickú bariéru, vhodnú kryciu náplasť a pokiaľ je to nutné, organickú glejovinu. Kit podľa vynálezu môže rovnako poskytnúť sterilný, buniek-prostý maticový materiál, vhodný na podporu autológnych chondrocytov, ktoré majú byť implantované na povrch artikulárneho poškodenia kĺbu. V jednom rozpracovaní obsahuje kit podľa vynálezu hemostatickú bariéru zo Surgicel^(R) a Bio-Gide^(R)

kryciu náplast' s vhodným potťahom organickou glejovinou Tisseel^(R), pričom Surgicel^(R) a Bio-Gide^(R) boli spracované, v súlade s predloženým vynálezom, na zvýšenie času do resorpcie.

V inom výhodnom rozpracovaní sú hemostatická bariéra aj krycia náplast' obidve semipermeabilná kolagénová matrica, ktorá je spracovaná na predĺženie času do resorpcie materiálu. Rovnako je možné poskytnúť Tisseel^(R) glejovinu vo vylepšenej forme ako samostatnú zložku, ktorá sa aplikuje, ako je potrebné, pretože každý postup opravy/transplantácie má vlastný variant a jedinečné okolnosti postupu.

Ďalšie rozpracovanie kitu podľa vynálezu zahŕňa chirurgický nástroj, ako je opísaný v príklade 7, alebo jeho vhodné varianty.

Od odborníka v danej oblasti techniky je možné očakávať, že navrhne rad variácií a/alebo modifikácií vynálezu, a ukáže v konkrétnych realizáciách bez toho, že by sa odchýlil z rozsahu vynálezu, ako je opísaný.

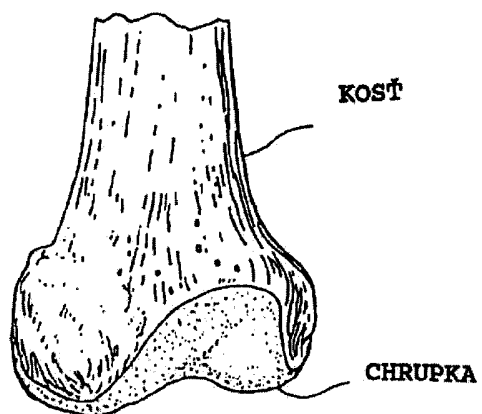
PATENTOVÉ NÁROKY

1. Súprava na transplantáciu chondrocytov na povrchu kĺbu, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že obsahuje hemostatickú bariéru vopred spracovanú na odolanie resorpcii, na uloženie na uvedený povrch, kryciu náplast' (2) vopred spracovanú na odolanie resorpcii, na prekrytie daného povrchu, a organickú glejovinu, na prilepenie uvedenej hemostatickej bariéry a/alebo uvedenej krycej náplasti na daný povrch.

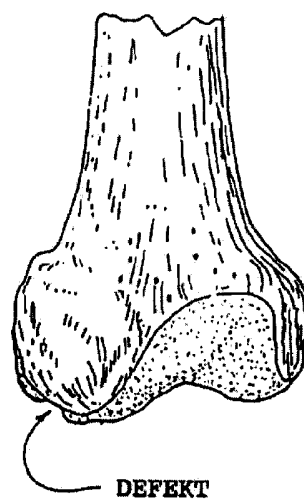
2. Súprava podľa nároku 1, **v y z n a č u j ú c a s a t ý m**, že ďalej obsahuje chirurgický nástroj na tvarovanie stien miesta štepu a matricový materiál vhodný ako nosič chondrocytov.

5 výkresov

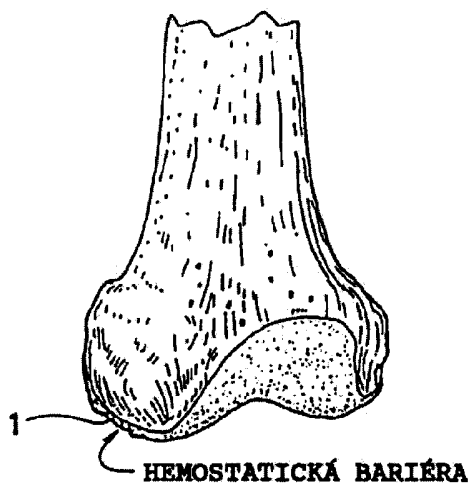
OBR. 1A



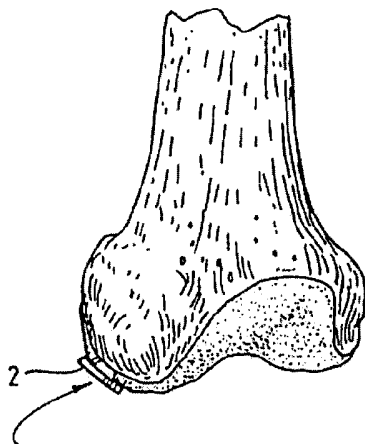
OBR. 1B



OBR. 1C

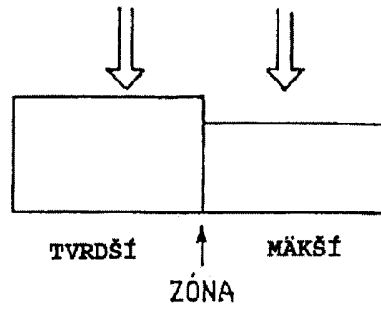


OBR. 2

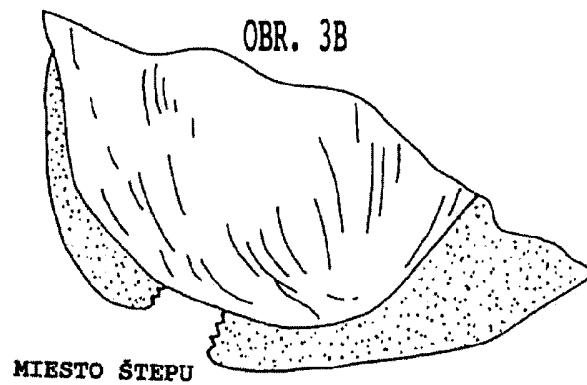


PREKRYTIE/NÁPLAŠŤ

OBR. 3A

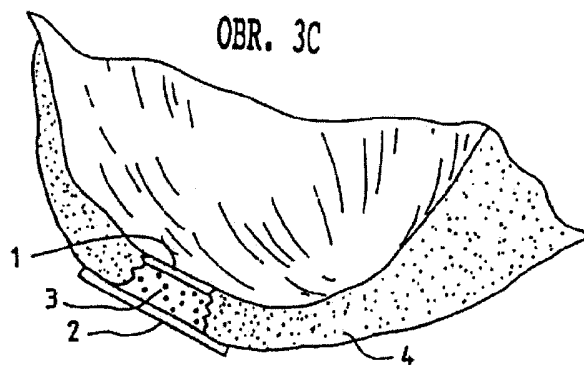


OBR. 3B

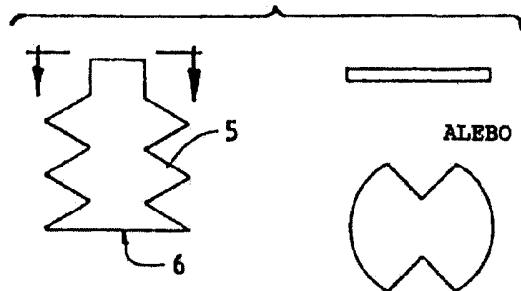


MIESTO ŠTEPU

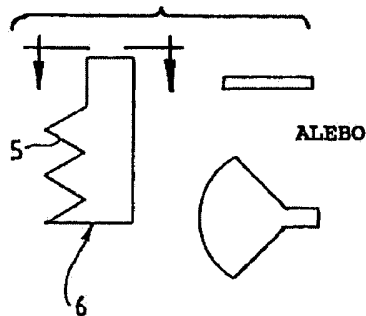
OBR. 3C



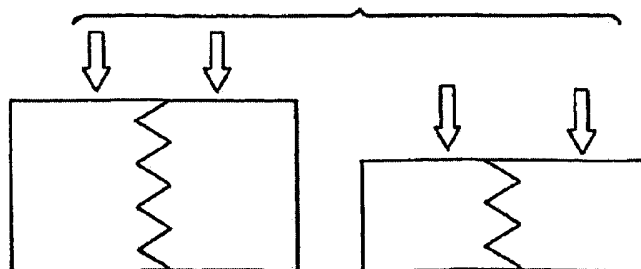
OBR. 4A

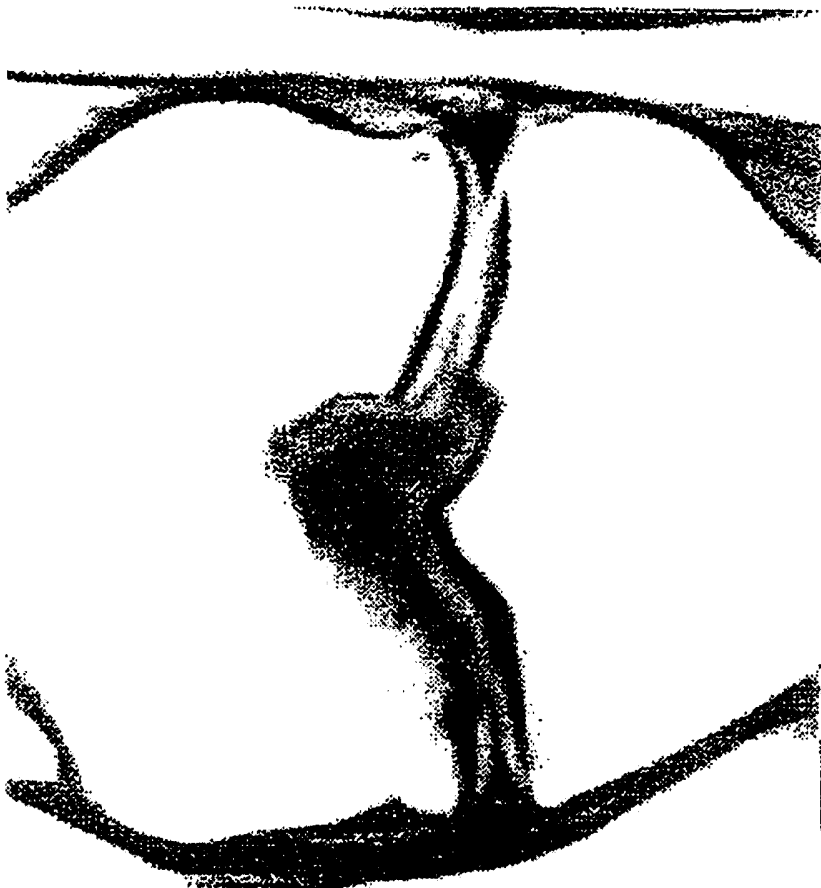


OBR. 4B

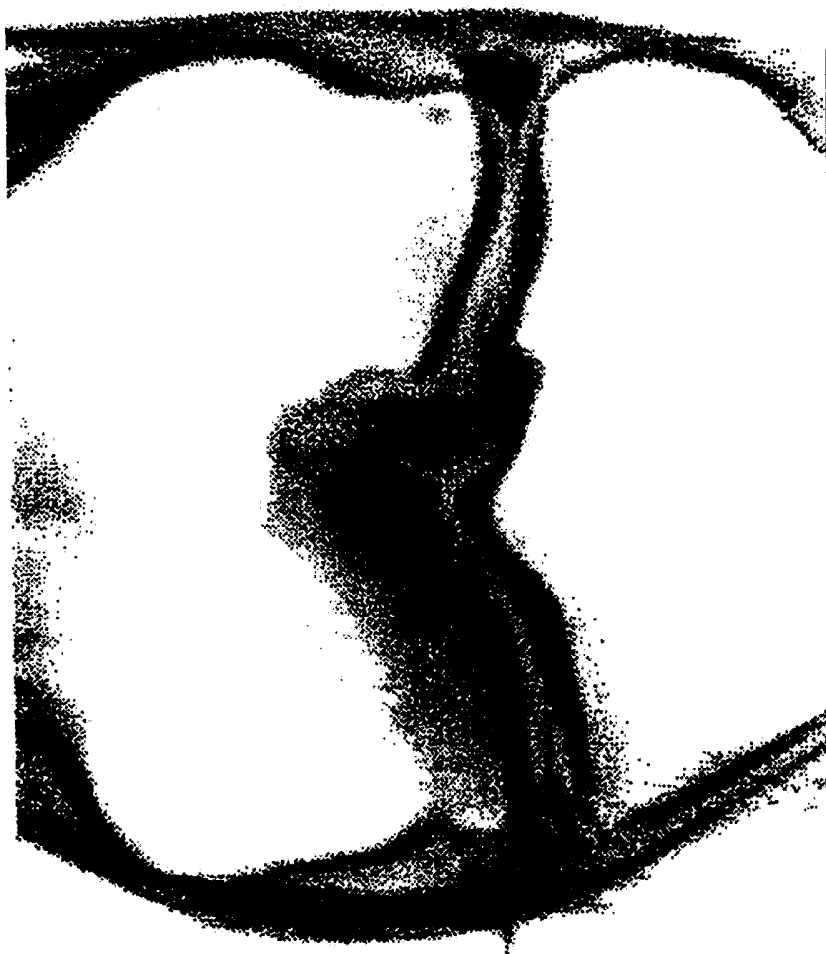


OBR. 5





OBR. 6A



OBR. 6B

Koniec dokumentu
