



Patent dodatkowy
do patentu nr _____

Zgłoszono: 07.11.75 (P. 184572)

Pierwszeństwo: 11.11.74 Republika
Federalna Niemiec

Zgłoszenie ogłoszono: 11.09.76

Opis patentowy opublikowano: 31.08.1979

Int. Cl.² A61F 1/00
A61K 35/44

Twórca wynalazku: _____

Uprawniony z patentu: Solco Basel AG., Bazylea (Szwajcaria)

Sposób wytwarzania heterologicznych przeszczepów arterii

1

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania heterologicznych przeszczepów arterii, w którym uwalnia się zwierzęce arterię od otaczającej je tkanki, podwiązuje się jedwabiem ich odgałęzienia boczne, oddziela się tkankę mięśniową i włókna elastyczne na drodze rozkładu proteolitycznego, a otrzymane w ten sposób rurki kolagenowe usieciowuje się poprzecznie.

Znane jest zastępowanie wadliwych arterii trzema metodami poprzez:

- a) stosowanie żył autologicznych,
- b) stosowanie przeszczepów z tworzyw sztucznych,
- c) stosowanie przeszczepów heterologicznych arterii.

Wielką zaletą zastępowania wadliwych arterii autologicznymi żyłami jest ich bezwarunkowa zgodność immunologiczna, ponieważ przeszczep pochodzi z organizmu tego samego pacjenta.

Jednakże niekorzystnie oddziałuje tutaj fakt, że żyły /na przykład Vena sphenae magna/ używa się dopiero po żmudnej operacji, przy której potrzebne są liczne cięcia, które stwarzają dodatkowe ryzyko, związane z operowaniem pacjenta.

Przeszczepy protetyczne z tworzyw sztucznych nie nasuwają również zastrzeżeń pod względem immunologicznym i można je mieć zawsze w rezerwie. Jednakże nie nadają się one do wszczepiania w miejscach, gdzie znajdują się stawy, ponieważ wiąże się to z dużym ryzykiem.

2

Heterologiczne przeszczepy naczyniowe na skutek niżej wymienionych właściwości okazały się bardzo cenne. Dają się one bardzo dobrze zszywać i można je wytwarzać prawie w każdej potrzebnej długości i średnicy. Przez zszywanie razem kilku krótszych odcinków można otrzymywać przeszczepy o dowolnej długości. Ponieważ do wszczepienia tych heterologicznych protez naczyniowych wystarczą 2 lub 3 nacięcia skóry, ryzyko związane z operacją jest bardzo niewielkie i dlatego można je stosować również w przypadkach bardzo zagrożonych pacjentów (nadciśnienie, niewydolność serca, cukrzyca itd.).

Znane jest z opisów patentowych Stanów Zjednoczonych Ameryki nr 2 900 644 i nr 3 093 439 otrzymywanie heterologicznych przeszczepów arterii w następujący sposób.

Arterie, korzystnie tętnice szyjne, pobrane przy uboju ssaków o odpowiedniej wielkości, jak na przykład cieląt lub jałówek, są wkładane do zimnego roztworu fizjologicznego soli kuchennej i transportowane z rzeźni do laboratorium. Następnie naturalne naczynia /krwionośne/ są uwalniane z otaczającej je tkanki, a ich boczne odgałęzienia są podwiązywane jedwabiem.

Otrzymany w ten sposób preparat nie nadaje się jednak do transplantacji, ponieważ znajdująca się w ścianie naczynia tkanka mięśniowa, a także elastyczne włókna będą wywoływały reakcję odrzucenia przeszczepu. Z tego względu konieczne

jest wyeliminowanie wywołującej taką reakcję tkanki ze ścianek naczyń. Następuje to poprzez inkubację w roztworze enzymatycznym, szczególnie w zbuforowanym roztworze ficyny. Ficyna jest fermentem proteolitycznym, czyli rozkładającym białko, otrzymywanym z dzikich fig. Mogą być jednak używane także i inne enzymy proteolityczne, jak tripsyna i papaina. Wiadomo, że te enzymy proteolitycznie nie są w stanie spowodować rozkładu kolagenowego szkieletu arterii. Poprzez inkubację arterii, zawierających jeszcze tkankę mięśniową i elastyczne włókna, uzyskuje się „wytrawienie” tych antygenowo działających składników tkanki. Przy tym procesie „wytrawiania”, jak przy każdym procesie enzymatycznym konieczne jest nastawienie optymalnej wartości pH roztworu.

Po inkubacji w roztworze fermentu względnie ficyny poddane proteolizie arterie cielece, względnie krowie zastają dokładnie przemyte wodą destylowaną, a następnie przez wprowadzenie ich do roztworu chlorku sodowego o określonym stężeniu i przetrzymywanie w nim przez pewien określony czas następuje zatrzymanie reakcji enzymatycznej.

Materiał pozostały po takim traktowaniu stanowi wyłącznie szkielet kolagenowy, istniejący we wszystkich arteriach.

Otrzymana rurka kolagenowa nie działa już antygenowo, ale jeszcze nie nadaje się do transplantacji, ponieważ nie posiada ona wymaganej szczelności i stabilności.

Szczelność i stabilność uzyskuje się poprzez garbowanie rurki kolagenowej, a mianowicie przez umieszczenie jej na pewien określony czas w zbuforowanym roztworze garbującym.

Dobrymi do tego celu garbnikami okazały się dotychczas skrobia dwualdehydowa, glioksal i poliakroleina, można jednak stosować do tego także i inne garbniki, jak na przykład aldehyd mrówkowy, celulozę dwualdehydową, aldehyd glutarowy i inne. Zachodzący przy tym proces jest określany jako sieciowanie poprzeczne. Sprawdzanie szczelności następuje poprzez nadmuchiwanie sprężonym powietrzem do ciśnienia 240 mm Hg, przy czym arterie zanurza się w wodzie.

W ten sposób otrzymane „protezy naczyniowe” są naciągane następnie na pręty metalowe o odpowiedniej średnicy i wkładane do zamykanych rurek szklanych, zawierających roztwór odpowiedni do sterylizacji. Sterylizacja ta trwa 14 dni i może przebiegać na przykład w roztworze konserwującym przy temperaturze 37°C, utrzymywanej przez umieszczenie w inkubatorze. Wysterylizowane protezy naczyniowe pozostają w rurkach szklanych aż do chwili ich użycia.

W tym samym sposobie wytwarzania występuje proces statyczny, to znaczy, że proteolityczny rozkład tkanki i sieciowanie poprzeczne przebiegają statycznie.

Przy przeszczepach, wytwarzanych w ten sposób nie zostało wyraźnie uwzględnione to, że kolagen, to jest istniejąca jeszcze po rozkładzie substancja szkieletowa, może nieść ze sobą pewne immunologiczne trudności szczególnie, gdy przy zwykłym statycznym wytwarzaniu nie zostaje usunięty

wszystek silnie lub umiarkowanie immunogeny materiał, zwłaszcza retikulina.

Statyczna obróbka materiału wyjściowego, pobieranego ze zwierząt, niesie ze sobą zwiększone niebezpieczeństwo zanieczyszczenia zarodkami materii i tym samym możliwość zakażenia wytwarzanych arterii, przez co następuje zmiana na niekorzyść sytuacji immunologicznej.

Wynalazek niniejszy opiera się na odkryciu, że zastosowanie heterologicznych przeszczepów, otrzymywanych ze zwierzęcych arterii krwionośnych, daje tym lepsze, trwałe rezultaty, czym młodsze są zwierzęta użyte do tego celu.

Ponadto zostało stwierdzone, że wspomniane wady znanego sposobu wytwarzania heterologicznych przeszczepów w arterii mogą być wyeliminowane, gdy proteolityczny rozkład tkanki i sieciowanie substancji szkieletowej przeprowadza się w sposób ciągły, względnie dynamiczny to znaczy, że obróbka ta jest przeprowadzana za pomocą przepływającego strumienia każdego z używanych roztworów, a nie przez zanurzenie.

Wynalazek dotyczy sposobu wytwarzania heterologicznych przeszczepów arterii, w którym uwalnia się zwierzęce arterie od otaczającej je tkanki, podwiązuje się jedwabiem ich odgałęzienia, oddziela się tkankę mięśniową i włókna elastyczne na drodze rozkładu proteolitycznego, a otrzymane w ten sposób rurki kolagenowe poddaje się sieciowaniu poprzecznemu, przy czym, zgodnie z wynalazkiem stosuje się arterie pobrane z możliwie najmłodszych zwierząt, a proteolityczny rozkład i sieciowanie poprzeczne prowadzi się w sposób dynamiczny.

Przez takie ciągłe lub dynamiczne oddziaływanie zgodnie ze sposobem według wynalazku zostaje zagwarantowana zupełna obróbka arterii, zwłaszcza od strony wewnętrznej.

Równocześnie sposób dynamiczny pozwala na łączenie poszczególnych odcinków arterii na przykład za pomocą rurek szklanych, które mogą jednocześnie łączyć ze sobą dowolnie dużą liczbę arterii, a tym samym gwarantują zupełną jednorodność gotowego materiału transplantacyjnego.

Dalszą zaletą sposobu według wynalazku jest to, że następujące po sobie kolejne fazy obróbki takie jak trawienie, przemywanie, zatrzymywanie reakcji trawienia, przemywanie, sieciowanie poprzeczne i przemywanie mogą być przeprowadzane w sposób ciągły przez zastosowanie odpowiedniego sterowania.

Poprzez sposób według wynalazku, to znaczy przez użycie arterii, pochodzących od możliwie najmłodszych zwierząt i przez dynamiczne prowadzenie procesu obróbki, zwłaszcza rozkładu proteolitycznego i sieciowania poprzecznego, uzyskuje się protezy arterii, które w znacznie większym stopniu nie budzą zastrzeżeń pod względem immunologicznym i tym samym szczególnie dobrze nadają się do zastosowania wadliwych arterii.

Poniższe przykłady wyjaśniają bliżej wynalazek bez ograniczania jego zakresu.

Przykład I. Wstępne przygotowanie arterii do chemicznego preparowania: Pobrane w rzeźni,

możliwie długie arterie cieląt /tętnice szyjne/ zostały przetransportowane do laboratorium w ochłodzonym poniżej zera roztworze fizjologicznym soli kuchennej /0,9%/ . Tam uwolniono je z otaczającej je tkanki, a odgałęzienia boczne podwiązano jedwabiem /niesterylizowane nitki nr 000/.

Tak przygotowane wstępnie arterie zostały użyte bezpośrednio do preparowania chemicznego.

Przykład II. Przygotowanie skrobi dwualdehydowej.

16,2 g skrobi kukurydzianej /suchej masy, przy materiale zawierającym wodę odpowiednio więcej/, zmieszano ze 100 ml wody destylowanej. Do tej białej zawiesiny wkraplano przez okres 1 godziny roztwór 23,5 g metanadjodanu sodowego w 300 ml wody destylowanej przy jednoczesnym mieszaniu, a po wklepieniu całości roztworu mieszano jeszcze dalsze 18 godzin przy temperaturze około 25°C. Roztwór ten został następnie przefiltrowany przez filtr próżniowy, zaś pozostałość przepłukano dokładnie sześć razy, używając za każdym razem 50 ml wody destylowanej. Ostatnia woda z przemycia powinna być wolna od jodanu. Pozostałość przepłukano jeszcze na koniec 100 ml acetonu, aby uniknąć tworzenia się zrogowaciałego produktu. Pozostałość suszono następnie pod próżnią w temperaturze 40°C przez 24 godziny.

Uzysk: 117,2 g /115,7 g suchej masy/

Przykład III. Ten przykład przedstawia chemiczne preparowanie arterii sposobem dynamicznym według wynalazku. Aparatura do wykonywania tego preparowania jest pokazana na fig. 1.

Materiał wyjściowy: 20 arterii /przygotowanych według przykładu 1/.

W zlewce o pojemności 10 l przygotowano roztwór ficyny:

7,5 l zdejonizowanej wody /podgrzanej do 30°C/.

75 g ficyny — 1%

7,5 g L-/+/-cystein=1%.

Po przelaniu roztworu ficyny do cylindra szklanego nastawiono pH roztworu na 6,0 za pomocą cytrynianu sodowego, a następnie wstawiono roztwór do kąpieli wodnej o temperaturze 45—50°C. Następnie przy zamkniętych zaworach zaciskowych zassano roztwór ficyny za pomocą pompy przez przewód 1 i przepompowano do dzwona rozdzielczego 4, łączącego się z przewodami, prowadzącymi do arterii 7. Z chwilą całkowitego napełnienia dzwona rozdzielczego roztworem ficyny zamknięto zawór rozdzielczy 5, a otwarto zawory 6 i przepompowywano roztwór ficyny przy stałej temperaturze wewnętrznej 36°C w ciągu 3 godzin.

Następnie wypompowano roztwór ficyny i odstawiono kąpiel wodną. Po odpompowaniu roztworu ficyny doprowadzono przewodem 2 zdejonizowaną wodę i wielokrotnie przepłukano tą wodą. Po odprowadzeniu wody płuczącej przewodem 3 doprowadzono poprzez przewód 2 roztwór 93,7 gramów chloranu sodowego /80%/ w 7,5 l zdejonizowanej wody /co odpowiada 1% stężeniu roztworu/, odpowietrzono cały układ jak poprzednio i przepompowywano ten roztwór w ciągu 18 godzin. Następnie odpompowano roztwór chloranu sodowego przez przewód 3 i jeszcze raz przepłukano zdejonizowaną wodą tak, jak poprzednio.

Potem przez przewód 2 został wlaný roztwór 97,5 g skrobi dwualdehydowej /przygotowanej według przykładu 2/ w 7500 ml wody /1,35%/ zbuforowany wodorowęglanem sodowym na pH=8,8, przepompowywany przez 24 godziny, po czym odpompowano ten roztwór przez przewód 3 i wielokrotnie przepłukano zdejonizowaną wodą, jak poprzednio.

Przy użyciu pompki aparatu do pomiaru ciśnienia krwi sprawdzono każdą arterię przy ciśnieniu wewnętrznym, wynoszącym 240 torów. W tym celu nadmuchane arterie zanurzono w wodzie. Nieszczelne miejsca obwiązano jeszcze, tam gdzie to było możliwe, jedwabiem. Arterie uznane jako dobre zostały naciągnięte na pręt szklany, wstawione do rurki szklanej zatopionej z jednej strony, którą następnie napełniono roztworem etanolu w wodzie destylowanej /50/50% obj./ z dodatkiem 1% tlenu propylenu oraz zamknięto za pomocą gumowego korka i taśmy izolacyjnej. Tak przygotowane arterie zostały zakonserwowane przez umieszczenie na 14 dni w inkubatorze o temperaturze 37°C.

Przykład IV. Preparowanie chemiczne było takie samo, jak w przykładzie 3 z tą różnicą, że dla spowodowania enzymatycznego rozkładu zbytnej tkanki użyto zamiast 1%-ego roztworu ficyny, nastawionego na pH=6,0, roztwór trypsyny 0,2%, nastawiony na pH=7,8 przy użyciu fosforanowo-cytrynianowego środka buforowego.

Przykład V. Preparowanie chemiczne było takie samo, jak w przykładzie 3 z tą różnicą, że zamiast 1,3%-go roztworu skrobi dwualdehydowej użyto roztwór gliksalu, nastawiony na pH=8,8 przy użyciu 10%-go wodorowęglanu sodowego /37,5 g gliksalu w 7500 ml wody/ dla sieciowania poprzecznego.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób wytwarzania heterologicznych przeszczepów arterii, w którym zwierzęce arterie uwalnia się od otaczającej je tkanki, podwiązuje się jedwabiem ich odgałęzienia boczne, oddziela się tkankę mięśniową i elastyczne włókna na drodze rozkładu proteolitycznego, a otrzymane w ten sposób rurki kolagenowe poddaje się sieciowaniu poprzecznemu, **znamienny tym**, że stosuje się arterie, pobrane z możliwie najmłodszych zwierząt, a procesy proteolitycznego rozkładu i sieciowania poprzecznego prowadzi się w sposób dynamiczny.

2. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się arterie, pobrane z młodych zwierząt, najkorzystniej cieląt, których arterie odpowiadają wielkości żądanych przeszczepów.

3. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że stosuje się arterie, pobrane ze świeżo urodzonych zwierząt, zwłaszcza cieląt, prosiąt i jagniąt.

4. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że potrzebne fazy obróbki pobranych arterii, jak trawienie i sieciowanie poprzeczne, prowadzi się jedną po drugiej w sposób ciągły przy użyciu odpowiednich urządzeń przepływowych.

5. Sposób według zastrz. 1, **znamienny tym**, że

uszeregowuje się pobrane arterie w odpowiedni sposób jedna za drugą i wywołuje się przez nie

przepływ każdego z używanych do obróbki roz-
tworów.

