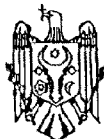




MD 1015 Z 2016.10.31

REPUBLICA MOLDOVA



**(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală**

(11) 1015 (13) Z
(51) Int.Cl: A61B 17/00 (2006.01)
A61B 5/027 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61K 31/185 (2006.01)

**(12) BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

(21) Nr. depozit: s 2015 0065 (22) Data depozit: 2015.05.12	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2016.03.31, BOPI nr. 3/2016
(71) Solicitant: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD (72) Inventatori: URSU Alexandru, MD; NACU Viorel, MD; JIAN Mariana, MD; MACAGONOVA Olga, MD; COCIUG Adrian, MD; SARMANIUC Viorica, MD; IGNATOV Olga, MD (73) Titular: IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	

(54) Metodă de decelularizare a ficatului la animalele experimentale

(57) Rezumat:

1

Invenția se referă la biologia moleculară, în special la o metodă de decelularizare a ficatului la animalele experimentale.

Conform invenției, animalele experimentale se eutanasează în camera cu bioxid de carbon cu concentrația de 5%, se fixează pe masa de lucru, se delimitează câmpul operator, se deschide cavitatea abdominală prin incizia liniei mediane a corpului, se mobilizează vena portă și se ligaturează la capătul ei proximal, se canulează

2

cu un cateter, prin care se perfuzează o soluție ce conține apă distilată în volum de 1...1,5 L și 63 mL de citrat fosfat dextroză timp de 4...6 ore, apoi se perfuzează o soluție de dodecilsulfat de sodiu cu concentrația de 0,25% în volum de 2...3 L, timp de 12...15 ore, după care se perfuzează o soluție tampon fosfat cu concentrația de 1% în volum de 1,5 L, timp de 2...3 ore.

Revendicări: 1

MD 1015 Z 2016.10.31

(54) Method for decellularization of liver in experimental animals

(57) Abstract:

1

The invention relates to molecular biology, in particular to a method for decellularization of liver in experimental animals.

According to the invention, experimental animals are euthanized in the room with carbon dioxide with the concentration of 5%, are fixed on the worktable, is delimited the operative field, is opened the abdominal cavity by the incision of midline of the body, is mobilized the portal vein and is ligated to the proximal end, is cannulated with a catheter, through which is perfused a solution

2

containing distilled water in an amount of 1...1.5 L and 63 mL of citrate-phosphate-dextrose for 4...6 hours, then is perfused a sodium dodecyl sulfate solution with the concentration of 0.25% in an amount of 2...3 L, for 12...15 hours, afterwards is perfused a phosphate buffer solution with the concentration of 1% in a volume of 1.5 L, for 2...3 hours.

Claims: 1

(54) Метод децеллюляризации печени у экспериментальных животных

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к молекулярной биологии, в частности к методу децеллюляризации печени у экспериментальных животных.

Согласно изобретению, экспериментальных животных эвтаназируют в комнате с диоксидом углерода с концентрацией 5%, фиксируют на рабочем столе, разграничивают операционное поле, открывают брюшную полость путём разреза срединной линии тела, мобилизуют воротную вену и лигируют её к проксимальному концу, канулируют

2

катетером через которого перфузируют раствор, который содержит дистиллированную воду в объёме 1...1,5 л и 63 мл цитрат-фосфат-декстрозы в течение 4...6 часов, затем перфузируют раствор додецилсульфата натрия с концентрацией 0,25% в объёме 2...3 л в течение 12...15 часов, после чего перфузируют раствор буферного фосфата с концентрацией 1% в объёме 1,5 л в течение 2...3 часов.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la biologia moleculară, în special la o metodă de decelularizare a ficatului la animalele experimentale.

5 Este cunoscută metoda de decelularizare a ficatului ce presupune deschiderea cavității abdominale prin incizia liniei mediane a corpului, identificarea venei portă care este ligaturată la capătul proximal și canulată, după care se inițiază perfuzia ficatului prin vena portă cu 6...10 L apă distilată, urmată de perfuzia ficatului cu 20 L soluție de dodecilsulfat de sodiu de 0,25% și progresiv cu 40 L soluție de dodecilsulfat de sodiu de

10 0,5% pentru a muta proteinele citoplasmatică [1].

Dezavantajul acestei metode constă în aceea că prevenirea generării trombilor sangvini nu se realizează, în special, fiind cunoscut faptul că în ficat sunt sintetizați factorii de coagulare a sângelui ce favorizează formarea rapidă a cheagurilor.

15 Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode care permite decelularizarea mai efektivă și optimală a ficatului și a altor organe sau țesuturi, favorizând un acces bun pentru perfuzie prin vena portă, micșorarea timpului și efortului aplicat.

Problema se rezolvă prin aceea că animalele experimentale se eutanasează în camera cu bioxid de carbon cu concentrația de 5%, se fixează pe masa de lucru, se delimitează câmpul operator, se deschide cavitatea abdominală prin incizia liniei mediane a corpului, se mobilizează vena portă și se ligaturează la capătul ei proximal, se canulează cu un cateter, prin care se perfuzează o soluție ce conține apă distilată în volum de 1...1,5 L și 63 mL de citrat fosfat dextroză timp de 4...6 ore, apoi se perfuzează o soluție de dodecilsulfat de sodiu cu concentrația de 0,25% în volum de 2...3 L, timp de

25 12...15 ore, după care se perfuzează o soluție tampon fosfat cu concentrația de 1% în volum de 1,5 L, timp de 2...3 ore.

Avantajul acestei metode constă în faptul că utilizarea anticoagulantului citrat fosfat dextroză permite înlăturarea sângelui proaspăt și previne formarea trombilor, decurgerea procesului de decelularizare fiind mai rapidă, precum și obținerea unei matrice decelularizate cât mai calitative, cu un conținut minim și chiar nul de acizi nucleici.

30 Rezultatul constă în operativitatea, eficacitatea, calitatea mult mai înaltă și lejeritatea procesului de decelularizare a țesutului hepatic și a altor organe.

Metoda se efectuează în modul următor:

Eutanasierea animalelor experimentale se efectuează în camera cu bioxid de carbon, la concentrația de 5%. Animalele experimentale se fixează pe masa de lucru, se delimitează câmpul operator. Pentru inițierea decelularizării, vena portă se canulează cu „fluturaș” (butterfly), având lungimea acului de 2 cm. Decelularizarea începe cu montarea și umplerea sistemului de perfuzie cu soluție de apă distilată în volum de 1 L, la care se adaugă 63 mL soluție anticoagulant ce conține în componența sa citrat fosfat dextroză, pentru înlăturarea sângelui proaspăt și prevenirea formării trombilor, din cauza sintezei în ficat a factorilor de coagulare. Perioada de perfuzare cu apă distilată este de 4 ore. Imediat după perfuzarea ficatului cu apă distilată și anticoagulant, se inițiază perfuzia cu soluție de dodecilsulfat de sodiu (SDS) 0,25% în volum de 2 L timp de 12 ore. La o concentrație de 0,25%, detergentul elimină excelent celulele, în timp ce dimensiunile generale tisulare se conservă. Ulterior se inițiază perfuzia țesutului hepatic cu soluție SDS 0,5% în volum de 2 L, timp de 12 ore. După aceasta se continuă perfuzia cu soluție tampon fosfat (PBS) 1% în volum de 1 L, timp de 2 ore, pentru înlăturarea detergentului și conservarea matricei extracelulare.

Exemplu

50 În calitate de obiect de studiu au servit 10 șobolani linia Wistar de culoare albă, cu masa corporală cuprinsă între 175...230 g. Eutanasierea animalelor experimentale a fost realizată în camera cu bioxid de carbon, concentrația căruia era de 5%. După eutanasiere, șobolanii au fost fixați pe masa de lucru, s-a delimitat câmpul operator, s-a efectuat incizia pe linia mediană a corpului șobolanilor, s-a pătruns în cavitatea abdominală, a fost identificată vena portă, care ulterior a fost ligaturată și detașată împreună cu ficatul din cavitatea abdominală. Debutul decelularizării a început cu montarea și umplerea sistemului de perfuzie cu soluție de apă distilată în volum de 1 L, la care s-au adăugat 63 mL soluție anticoagulant ce conține în componența sa citrat fosfat dextroză, pentru înlăturarea sângelui proaspăt și prevenirea formării trombilor,

din cauza sintezei în ficat a factorilor de coagulare. Perioada de perfuzare cu apă distilată a fost de 4 ore, timp în care țesutul hepatic și-a schimbat conformația și culoarea. Imediat după perfuzarea ficatului cu apă distilată s-a inițiat perfuzia cu soluție SDS 0,25% în volum de 2 L, perioada de perfuzie fiind de 12 ore. La o concentrație de 0,25%, detergentul a eliminat excelent celulele, în timp ce dimensiunile generale tisulare s-au conservat. Apoi s-a inițiat perfuzia țesutului hepatic cu soluție SDS 0,5% în volum de 2 L, timp de 12 ore. La asemenea concentrație are loc mutarea proteinelor citoplasmice. După 12 ore de perfuzare cu SDS 0,5% , s-a continuat perfuzia cu soluție PBS 1% în volum de 1 L, timp de 2 ore, pentru înlăturarea detergentului și conservarea matricei extracelulare.

Metoda propusă asigură o decelularizare mai efektivă, lejeră și operativă și mult mai calitativă prin utilizarea anticoagulantului citrat fosfat dextroză.

Metoda dată a fost aplicată cu rezultate bune în 10 cazuri în cadrul laboratorului și catedrelor Universității.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Omar Barakat, Shahrzad Abbasi, Gabriela Rodriguez, Jessi Rios et al. Use of decellularized porcine liver for engineering humanized liver organ. Journal of surgical research, 2012, 173(1), p. 11-25

(57) Revendicări:

Metodă de decelularizare a ficatului la animalele experimentale care constă în aceea că ele se eutanasează în camera cu bioxid de carbon cu concentrația de 5%, se fixează pe masa de lucru, se delimitează câmpul operator, se deschide cavitatea abdominală prin incizia liniei mediane a corpului, se mobilizează vena portă și se ligaturează la capătul ei proximal, se canulează cu un cateter, prin care se perfuzează o soluție ce conține apă distilată în volum de 1...1,5 L și 63 mL de citrat fosfat dextroză timp de 4...6 ore, apoi se perfuzează o soluție de dodecilsulfat de sodiu cu concentrația de 0,25% în volum de 2...3 L timp de 12...15 ore, după care se perfuzează o soluție tampon fosfat cu concentrația de 1% în volum de 1,5 L, timp de 2...3 ore.

Șef adjunct Direcție Brevete:

IUSTIN Viorel

Examinator:

LEVIȚCHI Svetlana

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii

(21) Nr. depozit: s 2015 0065

(22) Data depozit: 2015.05.12

(71) Solicitant: **IP UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD**

(54) **Titlul: Metodă de decelularizare a ficatului la animalele experimentale**

II. Clasificarea obiectului invenției:

(51) **Int.Cl:** **A61B 17/00** (2006.01)
A61B 5/027 (2006.01)
A61K 31/70 (2006.01)
A61K 31/185 (2006.01)

III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)

MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): “dcelularizarea ficatului”, “citrato fosfat dextroză”, “A61P7/02”

Int. Cl: **A61B 17/00** (2006.01), **A61B 5/027** (2006.01), **A61K 31/70** (2006.01), **A61K 31/185** (2006.01)

EA, CIS (Eapatis): “децеллюляризация печени”

Int. Cl: **A61B 17/00** (2006.01), **A61B 5/027** (2006.01), **A61K 31/70** (2006.01), **A61K 31/185** (2006.01)

SU (nonpublic): “децеллюляризация печени”

Int. Cl: **A61B 17/00** (2006.01), **A61B 5/027** (2006.01), **A61K 31/70** (2006.01), **A61K 31/185** (2006.01)

IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate

<http://usmf.md/wp-content/uploads/2013/05/PS%20Introducere.pdf>
<http://semneletimpului.ro/pe-scurt/americanii-au-creat-primul-ficat-artificial-cu-ajutorul-celulelor-stem.html>
<http://medlive.hotnews.ro/americanii-au-creat-primul-ficat-artificial-cu-ajutorul-celulelor-stem.html>
<http://www.descopera.ro/dnews/7688558-a-fost-creat-primul-ficat-uman-in-eprubeta>
http://adevarul.ro/sanatate/medicina/ficat-uman-creat-laborator-1_50ad26957c42d5a6638fa025/index.html
<https://only4news.wordpress.com/2010/06/16/cercetatorii-americani-au-creat-primul-ficat-artificial/>
<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/lt.21090/abstract>
[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(20000405\)68:1%3C59::AID-BIT7%3E3.0.CO;2-N/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0290(20000405)68:1%3C59::AID-BIT7%3E3.0.CO;2-N/abstract)
<http://innovatii.od.ua/volume-1-2014/2.pdf>
<http://farmamir.ru/2015/06/uchenye-sozdali-bioinzhenernyuyu-perednyuyu-konechnost-dlya-transplantacii-na-zhivotnoj-modeli/>
<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.tec.2009.0342>
http://bioxa.com/use-decellularized-porcine-liver-engineering-humanized-liver-organ-318wC_rc.htm

<http://www.sursamedicala.ro/adenina-2/>
<https://www.umftgm.ro/cercetare/strategia-de-cercetare.html>
<http://www.medicalstudent.ro/stiri-medicale/primul-ficat-artificial-creat.html>
<http://www.ziarulring.ro/stiri/life-inedit/17202/Ficat-artificial>
http://www.realitatea.net/cercetatorii-americani-au-creat-primul-ficat-artificial_718695.html
http://www.scienceagainstaging.org/Projects/project-10_09.html
http://lomonosov-msu.ru/archive/Lomonosov_2014/2471/2471.pdf

V. Documente considerate a fi relevante

Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	MD 191 Z5 2010.04.30	1
A	MD 939 Y 2015.08.31	1
A	UA 85240 U 2013.11.11	1
A	RU 2445940 C1 2012.03.27	1
A	RU 2453291 C1 2012.06.20	1
A	RU 2504334 C1 2014.01.20	1
A	RU 2539918 C1 2015.01.27	1
A	RU 2524619 C2 2014.07.27	1
A, D, C	Omar Barakat, Shahrzad Abbasi, Gabriela Rodriguez, Jessi Rios et al. Use of decellularized porcine liver for engineering humanized liver organ. Journal of surgical research, 2012, 173(1), p. 11-25	1

* categoriile speciale ale documentelor citate:

A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri

Data finalizării documentării 12.01.2016

Examinator LUPAȘCU Lucian