



(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 214 197** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) МПК⁷ **A 61 F 2/30, A 61 L 27/00, A 61 B 17/32**

РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

(21), (22) Заявка: 99106519/14, 29.08.1997

(24) Дата начала действия патента: 29.08.1997

(30) Приоритет: 30.08.1996 US 08/704,891
15.05.1997 US 08/857,090

(46) Дата публикации: 20.10.2003

(56) Ссылки: American Academy of Orthopedic Surgeons, 1992, 125. J. Bone joint Surgery, 1980, 62A, 1192. SU 1090362 A1, 05.07.1984. SU 770479 A1, 15.10.1980. RU 2142285 C1, 10.12.1999. US 5053050 A, 01.10.1991. New.Engl.J. МЕД, 1994, 331, 889.

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу: 30.03.1999

(86) Заявка РСТ:
US 97/15258 (29.08.1997)

(87) Публикация РСТ:
WO 98/08469 (05.03.1998)

(98) Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Большая Спасская, 25,
стр.3, ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Ю.Д. Кузнецову

(71) Заявитель:

ВЕРИГЕН ТРАНСПЛАНТАЦИОН СЕРВИСЕС
ИНТЕРНАЦИОНАЛ АГ. (DE)

(72) Изобретатель: ВИБЕ-ХАНСЕН Хенрик (DK),
ЛУНСГОР Шарлотта (DK), ИДОУРАИНЕ Ахмед
(US), ОСТЕР Курт Б. (US)

(73) Патентообладатель:

ВЕРИГЕН ТРАНСПЛАНТАЦИОН СЕРВИСЕС
ИНТЕРНАЦИОНАЛ АГ. (DE)

(74) Патентный поверенный:

Миц Александр Владимирович

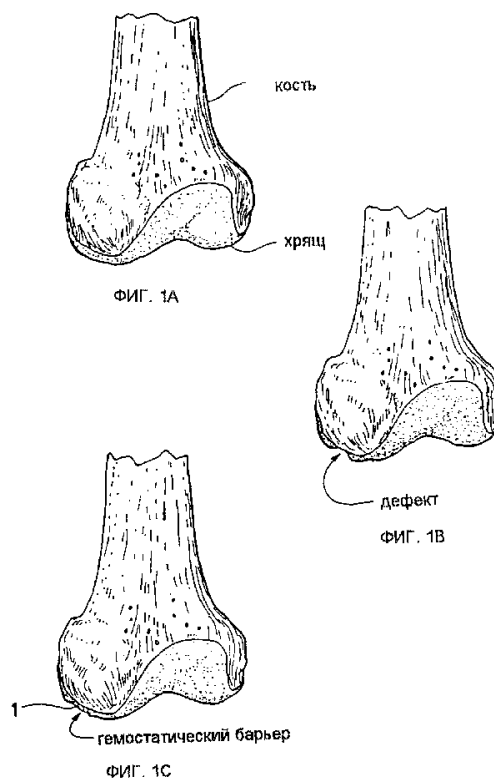
(54) **СПОСОБ И НАБОР ДЛЯ АУТОТРАНСПЛАНТАЦИИ**

(57)

Изобретение относится к медицине, области трансплантации хондроцитов, пересадки кости, хряща, восстановления суставов и профилактики артритов. Сущность лечения: размещают гемостатический барьер на подлежащей лечению поверхности, помещают хондроциты в матрикс на гемостатический барьер, покрывают подлежащую лечению поверхность накладкой. Хондроциты размещают под накладку. Накладка содержит полупроницаемый коллагеновый матрикс с пористой поверхностью, свободный от интактных клеток. Барьер способен к рассасыванию, полупроницаемый материал, ингибирующий или предотвращающий сосудистую инфильтрацию, содержит коллаген. Сущность трансплантации хондроцитов: профилируют участок пересадки с образованием нелинейных и/или волнообразных стенок, барьер размещают проксимальнее участка пересадки, помещают хондроциты в подходящем матриксе на

гемостатический барьер, покрывают их накладкой, частично прикрепленной перед помещением хондроцитов, способный к рассасыванию полупроницаемый материал, ингибирующий или предотвращающий сосудистую инфильтрацию через барьер, барьер содержит коллаген. Накладка - бесклеточный, полупроницаемый коллаген - новый матрикс. Набор для трансплантации хондроцитов и необязательно хряща на поверхность сочленяющего сустава включает гемостатический барьер с противодействием рассасыванию, такую же накладку, органический клей для крепления барьера и/или наклейки, свободный от жизнеспособных клеток, содержит коллагеновый матрикс с увеличенным содержанием аprotонинного компонента. Набор для осуществления способа, включающий гемостатический барьер, накладку, обработанные для ингибирования рассасывания, органический клей, профилирование стенок участка пересадки, матрикса, поддерживающего хондроциты,

накладка свободна от жизнеспособных клеток, содержит коллагеновый матрикс с увеличенным содержанием апротонинового компонента. Способы и наборы позволяют восстановиться хрящевой ткани и устранить дефект. 4 с. и 11 з. п.ф-лы, 6 ил.





RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 214 197** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 61 F 2/30, A 61 L 27/00, A**
61 B 17/32

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

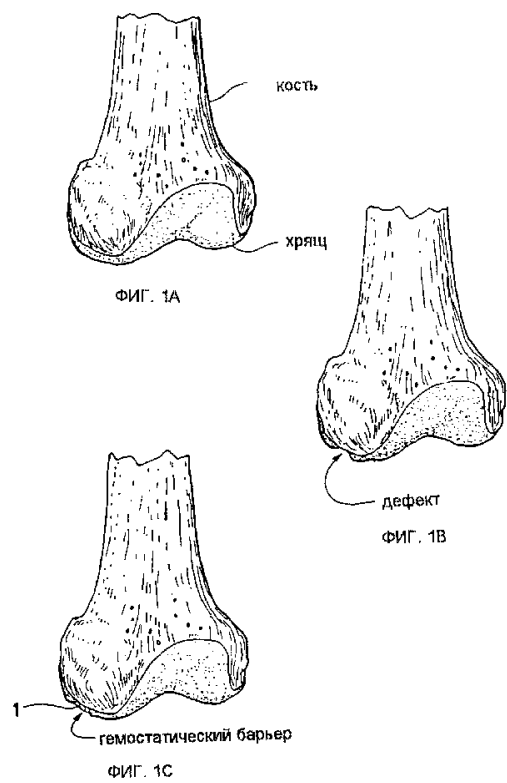
(21), (22) Application: 99106519/14, 29.08.1997
(24) Effective date for property rights: 29.08.1997
(30) Priority: 30.08.1996 US 08/704,891
15.05.1997 US 08/857,090
(46) Date of publication: 20.10.2003
(85) Commencement of national phase: 30.03.1999
(86) PCT application:
US 97/15258 (29.08.1997)
(87) PCT publication:
WO 98/08469 (05.03.1998)
(98) Mail address:
129010, Moskva, ul. Bol'shaja Spasskaja, 25,
str.3, OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij
i Partnery", pat.pov. Ju.D. Kuznetsovu

(71) Applicant:
VERIGEN TRANSPLANTATsION SERViSES
INTERNATsIONAL AG. (DE)
(72) Inventor: VIBE-KhANSEN Khenrik (DK),
LUNSGOR Sharlotta (DK), IDOURAINE Akhmed
(US), OSTER Kurt B. (US)
(73) Proprietor:
VERIGEN TRANSPLANTATsION SERViSES
INTERNATsIONAL AG. (DE)
(74) Representative:
Mits Aleksandr Vladimirovich

(54) **METHOD AND SET FOR PERFORMING AUTOTRANSPLANTATION**

(57) Abstract:
FIELD: medicine; medical engineering.
SUBSTANCE: method involves arranging
hemostatic barrier over surface under
treatment, chondrocytes enclosed in matrix
are placed on hemostatic barrier and surface
under treatment is covered with a cover
plate. The cover plate has semi-transparent
collagen matrix having porous surface with
no intact cells. The barrier is resolvable.
The semi-transparent inhibiting or
preventing vascular infiltration material
comprises collagen. Method involves
transplantation area is shaped with
non-linear and/or wavy walls being created.
The barrier is arranged proximally with
respect to transplantation area.
Chondrocytes are enclosed into permissible
matrix and placed onto hemostatic barrier
and covered with cover plate partially fixed
before placing chondrocytes. Resolvable
semi-transparent material inhibiting or

preventing vascular infiltration via the
barrier. The barrier comprises collagen. The
cover plate is semitransparent collagen with
no cells being new matrix. Set for
transplanting chondrocytes and optionally
cartilage onto uniting articulation surface
has hemostatic barrier resistant to
resolution. The same cover plate, organic
glue for fixing barrier and/or cover plate
deprived of viable cells has collagen matrix
with increased contents of aprotonine
ingredient. The set has hemostatic barrier,
cover plate treated for resolution
inhibition, organic glue, profiling of
transplantation area walls, matrix
supporting the chondrocytes. The cover late
is free from viable cells has collagen
matrix with increased contents of aprotonine
component. EFFECT: enhanced effectiveness in
restoring cartilage tissue and removing
defect. 15 cl, 6 dwg



Настоящее изобретение относится к области трансплантации хондроцитов, пересадки кости и хряща, заживления, восстановления суставов и профилактики артритных патологических процессов. В частности, к способам подготовки участка для пересадки, устройствам для такой подготовки и для ауто трансплантации клеток на подготовленный участок для пересадки.

Предшествующий уровень техники

В США ежегодно выполняется более 500000 артропластических операций и полного протезирования суставов. Приблизительно такое же количество аналогичных вмешательств выполняется в Европе. В эти цифры включено приблизительно 90000 операций полного протезирования коленного сустава и приблизительно 50000 операций по восстановлению дефектов в области коленного сустава, выполняемых ежегодно в Европе. В США количество вмешательств по существу такое же (In: Praemer A., Furner S., Rice, D.P., *Musculoskeletal conditions in the United States*, American Academy of Orthopaedic Surgeons, Park Ridge, Ill., 1992, 125). Самым полезным был бы способ регенерации лечения хряща, который мог бы выполняться на более ранней стадии повреждения сустава, уменьшая таким образом количество больных, нуждающихся в операции искусственного протезирования сустава. При использовании таких профилактических способов лечения уменьшилось бы также количество больных с развившимся остеоартритом.

Методики, применявшиеся для восстановления поверхности хрящевой структуры в суставах, пытались главным образом вызвать восстановление хряща с использованием подхрящевой сверления, абразивной обработки и других способов, посредством чего производится иссечение пораженного хряща и подхрящевой кости с оставлением открытым снабженного сосудами губчатое вещества кости (Insall, J., *Clin. Orthop.* 1974, 101, 61; Ficat R.P. et al., *Clin Orthop.* 1979, 144, 74; Johnson L.L., In: *Operative Arthroscopy*, McGinty J.B., Ed., Raven Press, New York, 1991, 341).

Coon and Cahn (*Science* 1966, 153, 1116) описали методику культивирования синтезирующих хрящ клеток из сомитов куриного эмбриона. Позже Cahn and Lasher (*PNAS USA* 1967, 58, 1131) использовали систему для анализа участия синтеза ДНК как необходимого условия дифференцировки хряща. Хондроциты реагируют ростом и на эпидермальный фактор роста, и на фактор роста фибробластов (Gospodarowicz and Mescher, *J. Cell Physiology* 1977, 93, 117), но в конечном итоге теряют свою дифференцированную функцию (Benay et al., *Cell* 1978, 15, 1313). Способы выращивания хондроцитов были описаны и в основном использовались с небольшими модификациями Brittberg, M. et al. (*New Engl. J. Med.* 1994, 331, 889). Клетки, выращенные с применением этих способов, использовались в качестве аутологических трансплантатов в коленные суставы пациентов. Кроме того, Kolettas et al. (*J. Cell Science* 1995, 108, 1991) исследовали экспрессию специфичных для хряща молекул, таких как коллагены и протеогликаны, в

условиях длительного культивирования клеток. Они обнаружили, что несмотря на морфологические изменения во время культивирования в однослойных культурах (Aulthouse, A. et al., *In Vitro Cell Dev. Biol.* 1989, 25, 659; Archer, C. et al., *J. Cell Sci.* 1990, 97, 361; Hanselmann, H. et al., *J. Cell Sci.* 1994, 107, 17; Bonaventure, J. et al., *Exp. Cell Res.* 1994, 212, 97), при сравнении с суспензионными культурами, выращенными над агарозными гелями, альгинатными гранулами или в виде спин-культур (сохраняющих круглоклеточную морфологию), исследованными различными исследователями, они не меняли экспрессируемые хондроцитами маркеры, такие как коллагены типа II и IX и не изменялись крупные агрегирующие протеогликаны, агрекан, версикан и связывающий белок (Kolettas, E. et al., *J. Cell Science* 1995, 108, 1991).

Суставные хондроциты представляют собой специализированные клетки мезенхимального происхождения обнаруживаемые исключительно в хряще. Хрящ представляет собой бессосудистую ткань, физические свойства которой зависят от внеклеточного матрикса, образуемого хондроцитами. Во время внутрихрящевой оксификации хондроциты подвергаются созреванию, приводящему к клеточной гипертрофии, характеризуемой началом экспрессии коллагена типа X (Upholt, W. B. and Olsen, R.R., In: *Cartilage Molecular Aspects* (Hall, B & Mewman, S, Eds.) CRC Boca Raton 1991, 43; Reichenberg, E. et al., *Dev. Biol.* 1991, 148, 562; Kirsch, T. et al., *Differentiation*, 1992, 52, 89; Stephens, M. et al., *J. Cell Sci* 1933, 103, 1111).

Избыточный распад коллагена II типа в наружных слоях сочленяющихся поверхностей сустава также вызван остеоартритом. Коллагеновая сеть соответственно ослабляется, и в последующем развивается волокнистость, в результате чего вещества матрикса, такие как протеогликаны, утрачиваются и в конечном итоге полностью замещаются. Такое образование волокон ослабленного остеоартритического хряща может распространяться вплоть до обызвестленного хряща в подхрящевую кость (Kenipson, G.E. et al., *Biochim. Biophys. Acta* 1976, 428, 741; Roth, V. and Mow, V.C., *J. Bone Joint Surgery*, 1980, 62A, 1102; Woo, S.L.-Y. et al., in *Handbook of Bioengineering* (R. Skalak and S. Chien eds.), McGraw-Hill, New York, 1987, pp. 4.1-4.44).

Описание основного развития гистологической и микроскопической структуры кости, хряща и других таких соединительных тканей можно найти, например, в Wheeler, Burkitt and Daniels, *Functional Histology*, 4th Edition, (Churchill Livingstone, London, 1987, Chp. 4). Описание основной гистологической структуры дефектов в кости, хряще и другой соединительной ткани можно найти, например, в Wheeler, Burkitt, Stevens and Lowe, *Basic Histopathology* (Churchill Livingstone, London, 1985, Chp. 21).

Несмотря на достижения в культивировании хондроцитов и манипулировании костью и хрящем, не было

достигнуто большого успеха в попытках трансплантации хряща или хондроцитов для восстановления поврежденных сочленяющихся поверхностей. Положения настоящего изобретения предоставляют эффективные и действенные средства, способствующие трансплантации хряща и/или хондроцитов в дефект суставного сочленения или на другие костные поверхности, покрытые хрящем, посредством чего хрящ восстанавливается для устранения дефекта. Настоящее изобретение также предоставляет хирургические инструменты, которые предназначены для подготовки участка для трансплантации с тем, чтобы облегчить эффективное интегрирование пересаженного материала в участок пересадки.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение предоставляет способ эффективного лечения хряща сочленяющейся поверхности сустава с помощью трансплантации хондроцитов в подходящем матриксе на подлежащую лечению поверхность с гемостатическим барьером и бесклеточной покрывающей накладкой, включающий, во-первых, размещение гемостатического барьера проксимальнее подлежащей лечению поверхности, помещение хондроцитов в подходящем матриксе на подлежащую лечению поверхность дистальнее гемостатического барьера, покрытие подлежащей лечению поверхности бесклеточной покрывающей накладкой. Как будет описано ниже, гемостатический барьер представляет собой барьер, который ингибирует или предотвращает проникновение васкуляризирующих клеток и ткани в пересаженный материал. В частности, настоящий способ обеспечивает гемостатический барьер, который представляет собой способный к рассасыванию, полупроницаемый материал, который ингибирует или предотвращает сосудистую инфильтрацию через барьер. В одном варианте реализации гемостатический барьер содержит коллаген. Термин "бесклеточный" используется здесь, как и в предшествующем уровне техники, и обозначает материал, который по существу свободен от интактных клеток, способных к дальнейшему клеточному делению, распространению или биологической активности. В предпочтительном варианте реализации бесклеточный материал является свободным от всех интактных, имеющих ядра клеток. В одном варианте реализации настоящий способ охватывает использование бесклеточной покрывающей накладки, которая содержит полупроницаемый коллагеновый матрикс. В одном предпочтительном варианте реализации способа пористая поверхность бесклеточной покрывающей накладки направлена в сторону имплантируемого материала.

Настоящее изобретение, кроме того, обеспечивает аутотрансплантацию коллагена или хондроцитов в участок пересадки, в котором участок пересадки сначала был подготовлен с помощью хирургической манипуляции для лучшего восприятия пересаженного материала. В одном варианте реализации участок пересадки профилируется так, что стенкам участка пересадки придается волнообразный

характер, так что при помещении внутрь трансплантата и расширении пересаженного материала до контакта со стенкой участка пересадки, будет создано сопротивление удалению или выталкиванию всего трансплантата из участка пересадки. Настоящее изобретение, кроме того, обеспечивает хирургические инструменты, предназначенные для профилирования участка пересадки, как предусмотрено способом изобретения.

Изобретение, кроме того, обеспечивает набор для трансплантации хряща и/или хондроцитов на поверхность сочленяющегося сустава, в котором указанный набор включает гемостатический барьер, бесклеточную полупроницаемую покрывающую накладку и органический клей. В еще одном варианте реализации набор, кроме того, может необязательно предоставлять один или более хирургических инструментов, которые могут использоваться для профилирования участка пересадки в соответствии со способами настоящего изобретения.

Краткое описание чертежей

Настоящее изобретение будет понятнее при изучении следующих чертежей, которые иллюстрируют определенные свойства настоящего изобретения, на которых:

Фиг. 1А представляет собой чертеж, показывающий типичный суставной конец кости. Обычно костный материал покрыт на сочленяющейся поверхности хрящевой тканью.

На фиг.1В показан пример, где развивается дефект или повреждение хрящевого покрытия (зазор в хряще), и такой дефект перед лечением можно с помощью хирургических процедур подвергнуть непосредственной обработке, небольшому увеличению или профилированию для восприятия пересаженного материала.

На фиг. 1С показано, как гемостатический барьер (обозначенный цифрой 1) помещается внутрь дефекта хрящевого покрытия для ингибирования или предотвращения прорастания сосудов в регенерирующий хрящ из подлежащей кости. Затем поверх гемостатического барьера наслаиваются хондроциты, имплантация которых предполагается в полость дефекта.

Фиг.2 представляет собой чертеж, показывающий обработанный дефект (зазор в хряще) в хрящевом покрытии, покрытый бесклеточным полупроницаемым материалом (обозначенным цифрой 2), который используется для образования колпачка/накладки или банджа над участком дефекта. Этот колпачок фиксируется на месте, или пришиванием к здоровому хрящу по краю полости, или прикрепляется другим способом. Этот колпачок покрывает область дефекта сустава, в которую был помещен трансплантат культивированных хондроцитов/хряща, или будет помещен под частично прикрепленный колпачок.

Фиг. 3А представляет собой график, иллюстрирующий различную реакцию на силы сжатия и сдвига более твердого и более мягкого хряща с последующей зоной демаркации.

Фиг.3В иллюстрирует участок пересадки после того, как дефект был спрофилирован с образованием волнистой поверхности стенок.

Фиг.3С иллюстрирует спрофилированный

участок пересадки с гемостатическим барьером (1), пересаживаемым материалом (3) и бесклеточной покрывающей накладкой (2), размещенными внутри хряща (4) суставной поверхности.

Фиг. 4А иллюстрирует один вариант реализации хирургического устройства настоящего изобретения, где доказаны режущие зубья (5) и выступающий штырь для размещения (6). Иллюстрации в разрезе справа показывают две возможные конфигурации режущих лезвий.

Фиг. 4В иллюстрирует второй вариант реализации хирургического устройства настоящего изобретения.

Фиг. 5 представляет собой график, иллюстрирующий модифицированную различную реакцию на силы сдавливания и сдвига более твердого и более мягкого хряща после профилирования участка пересадки.

Фиг. 6А представляет собой полученное с помощью ЯМР изображение коленного сустава свиньи, показывающее дефект хряща в левом (медиальном) мыщелке.

Фиг. 6В представляет собой полученное с помощью ЯМР изображение того же коленного сустава свиньи через три месяца после лечения.

Подробное описание изобретения

Это изобретение касается использования определенных продуктов, которые ингибируют образование сосудистой ткани, например, такой как капиллярные петли, растущие в сформировавшийся хрящ, во время процесса аутотрансплантации хондроцитов в дефекты в хряще. Образующаяся сосудистая ткань из подлежащей кости будет иметь тенденцию врастать в новый хрящ, образование которого предполагается, приводя к появлению клеток, отличных от желательных мезенхимальных специализированных хондроцитов.

Примешивающиеся клетки, внедряющиеся в результате прорастания сосудов, могут вызвать вторжение и избыточное врастание в хрящ, образование которого предполагается имплантированными хондроцитами. Одним из типов промышленных продуктов, которые могут использоваться в этом изобретении, является Surgicel® (Ethicon Ltd., UK), который может всасываться через 7-14 дней. Использование этого материала в способе настоящего изобретения противоположно обычному использованию гемостатического устройства, такого как Surgicel®, как это описано во вкладыше компании Ethicon Ltd., в упаковке.

К удивлению, мы обнаружили, что в ситуации, когда вы хотите ингибировать повторное прорастание сосудов в хрящ, гемостатический материал будет действовать в качестве гелеподобного искусственного хряща. Если бы эритроциты присутствовали внутри дефекта всей толщины суставного хряща, который покрыт таким гемостатическим барьером, эти клетки крови были бы химически преобразованы в гематин и поэтому стали бы неспособны вызывать рост сосудов. Следовательно, гемостатический продукт, используемый в качестве барьера, ингибирующего повторное прорастание сосудов с применением фибриновых клеев или без них, такой, например, как Surgicel®, эффективен для рассматриваемого способа в соответствии с

положениями настоящего изобретения. Другой частью этого изобретения является использование бесклеточного компонента, который используется в виде накладки, покрывающей область дефекта сустава, в который трансплантируются культивированные хондроциты/хрящи с использованием для трансплантации аутологичных хондроцитов. Способ изобретения также предусматривает использование подходящих аллогенных хондроцитов или ксеногенных хондроцитов для восстановления дефекта хряща.

Таким образом, настоящее изобретение описывает способ эффективного восстановления или обработки дефектов хряща в костных поверхностях суставного сочленения, который включает введение средства или устройства для блокировки врастания сосудов в подлежащий восстановлению участок хряща, а также обеспечение бесклеточного барьера, который изолирует участок восстановления и удержит на месте трансплантированные клетки. Таким образом, настоящее изобретение также обеспечивает набор, включающий компонент гемостатического барьера для вставки в подлежащий восстановлению участок так, что имеется эффективное ингибирование прорастания сосудов в подлежащий восстановлению участок; и как только подлежащие трансплантации хондроциты помещаются в подлежащий восстановлению участок, поверх восстанавливаемого участка накладывается бесклеточный полупроницаемый барьер так, что трансплантированные хондроциты удерживаются на месте, но еще способны получать доступ к питательным веществам.

Примеры определенных аспектов изобретения были приведены с использованием системы *in vitro* для изучения поведения хондроцитов при контакте с определенным продуктом или комбинацией определенных продуктов, которые ингибируют образование сосудистой ткани. Это испытание *in vitro* протезирует способность определенных исследуемых материалов ингибировать прорастание сосудов, которое произойдет *in vivo*, когда капиллярные петли врастут в хрящ, образуемый во время процесса аутотрансплантации хондроцитов в дефекты в хряще.

Подходящие гемостатические продукты будут характеризоваться наличием способности ингибировать рост или внедрение сосудистой ткани, остеоцитов, фибробластов и т.д. в развивающийся хрящ. Подходящий гемостатический материал достигнет цели способа настоящего изобретения в том, что для оптимизации образования хряща и достижения восстановления полной толщины любых дефектов в суставном хряще, следует предотвратить внедрение сосудов и клеток в развивающийся хрящ. В идеале гемостатический барьер будет устойчивым в течение продолжительного периода времени для обеспечения возможности полного восстановления хряща, а затем с течением времени будет способен рассасываться или разрушаться другим образом. Один из выявленных в качестве подходящего материала называется Surgicel® W1912

(рассасываемый гемостатический материал, содержащий окисленную регенерированную стерильную целлюлозу; Lot GG3DH, Ethicon Ltd. UK). Другим примером подходящего материала является BioGide® (имеющаяся в продаже накладка из коллагенового матрикса I типа; Geistlich Sobne, Switzerland).

Подходящий органический клеящий материал, такой как, например, Tisseel® или Tissucol® (клей на основе фибрина; Immuno AG, Austria), клеящий белок (Cat. #A-2707, Sigma Chaemical, USA) и Dow Corning Medical Adhesive B (Cat. #895-3, Dow Corning, USA), можно найти в продаже. Хирургические инструменты, предусматриваемые настоящим изобретением, могут быть изготовлены из металла и/или пластика, пригодного для изготовления хирургических инструментов для одноразового или многократного использования. Режущий инструмент может содержать режущие зубья, которые являются полностью круговыми или плоскими или имеют какую-либо промежуточную форму. Поскольку хрящ представляет собой относительно мягкий материал, преимущество может иметь изготовление режущих краев повышенной прочности, которые будут способны спрофилировать хрящ, не будучи способными повредить кость. Такие режущие инструменты могут быть изготовлены с включением отверстий для введения жидкости, удаления с помощью отсоса остатков отсекаемой ткани, и жидкости, и нитей оптических волокон для освещения и визуализации участка дефекта.

Определенные стороны настоящего изобретения можно лучше понять при иллюстрации с помощью следующих примеров, которые предназначены для иллюстрации, а не ограничения.

Пример 1

Для использования Surgicel® в соответствии с изобретением для предотвращения развития кровеносных сосудов в имплантированный аутотрансплантат хряща или хондроцитов Surgicel® сначала обрабатывают фиксатором, таким как глутаровый альдегид. Вкратце, Surgicel® обрабатывают 0,6%-ным глутаровым альдегидом в течение 1 мин с последующими несколькими промываниями для устранения остатков альдегида, которые иначе могут оказать токсическое воздействие на ткань. Альтернативно Surgicel® обрабатывают фибриновым клеем, именуемым Tisseel®, перед обработкой глутаровым альдегидом, как описано в примере 2. Было обнаружено, что Surgicel®, фиксированный, например, таким фиксатором, как глутаровый альдегид, промытый стерильным физиологическим солевым раствором (0,9%) и хранившийся в холодильнике, не растворяется в течение 1-2 мес. В целом, Surgicel® рассасывается в течение периода от 7 до 14 дней. Этот период времени был бы слишком коротким, потому что для предотвращения развития кровеносных сосудов или прорастания сосудов как такового из костной структуры в имплантированный хрящ перед тем, как имплантированные хондроциты прорастут в твердый хрящевой слой, получающий свои питательные потребности из соседнего хряща, требуется более длительный период времени. Другими словами, достаточное

ингибирование прорастания сосудов необходимо в течение более длительного времени, такого как, например, 1 мес. Поэтому продукт не должен существенно всасываться до этого времени. С другой стороны, в конечном счете необходимо его рассасывание. Следовательно, органический материал, используемый в качестве ингибирующего барьера, должен обладать этими способностями, и было обнаружено, что Surgicel®, обработанный таким образом, обеспечивает эту функцию.

Пример 2

Surgicel® также покрывают органическим клеем; в этом примере используемым клеем был Tisseel®, но могут использоваться другие клеи. Этот продукт совместно с Surgicel® создает подходящий барьер для конкретной цели изобретения. Может использоваться любой другой гемостатический или ингибирующий прорастание сосудов барьер. Tisseel® смешивают, как описано выше. Surgicel® затем покрывают Tisseel® с помощью распыления материала Surgicel® на обе стороны до его пропитывания. Затем Tisseel® (фибриновому клею) дают возможность затвердеть при комнатной температуре. Непосредственно перед завершением затвердевания покрытый Surgicel® затем помещают на 1 мин в 0,6%-ный глутаровый альдегид и затем промывают стерильным физиологическим (0,9%) солевым раствором. Затем с помощью фосфатного буферного раствора и/или NaOH доводят pH до тех пор, пока оно не станет устойчивым на уровне от 7,2 до 7,4. После этого обработанный таким образом Surgicel® промывают в среде для тканевой культуры, такой как минимальная основная среда/F 12 с буфером 15 mM Hepes.

Как указано в этом примере, мы в качестве фибринового клея для покрытия Surgicel® использовали Tisseel®. Кроме того, фибриновый адгезионный материал или клей можно также непосредственно наносить на дно повреждения по направлению к кости, на которую приклеивается Surgicel®. Используемая вместо исследования in vivo система in vitro состояла из 6-ячеечного одноразового планшета для клеточных исследований NUNCLON™ (NUNC, InterMed, Roskilde, Denmark). Каждая ячейка имеет диаметр приблизительно 4 см.

В изобретении фибриновый адгезионный материал может представлять собой любой адгезионный материал, который совместно с фибриновым компонентом образует клей, который может быть толерантен для людей (Ihara, N, et al., Burns Incl. Therm. Inj., 1984, 10, 396). Это изобретение также предусматривает любой другой клеевой компонент, который может использоваться вместо фибринового адгезионного материала. В этом изобретении мы использовали Tisseel® или Tissucol® (Immuno AG, Vienna, Austria). Набор Tisseel® состоит из следующих компонентов:

Tisseel®, лиофилизированное водонепроницаемое покрытие с инактивированными вирусами, содержащее свертывающийся белок, состоящее из фибриногена, фибронектина плазмы (телячьего иммуноглобулина), и фактора XIII, и плазминогена.

Раствор апротинина (бычьего)
Тромбин 4 (бычий)
Тромбин 500 (бычий)
Раствор хлорида кальция
Набор Tisseel® содержит систему наложения DUPLOJECT®. Фибриновый клей или двухкомпонентное водонепроницаемое покрытие с использованием набора Tisseel® комбинируется следующим образом в соответствии с вкладышем продукта компании Immuno AG.

Пример 3

Хондроциты выращивают в минимальной основной культуральной среде, содержащей HAM F12 и 15 мМ буфера HEPES и от 5 до 7,5% аутологичной сыворотки в CO₂, инкубаторе при 37°C и обрабатывают в лаборатории класса 100 в Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Copenhagen, Denmark. Для культивирования хондроцитов можно использовать другие композиции культуральной среды. Клетки трипсинизируют с использованием ЭДТА в течение 5-10 мин и считают с использованием окрашивания трипаном синим в камере Burker-Turk для определения жизнеспособности. Количество клеток доводят до $7,5 \cdot 10^5$ клеток на 1 мл. Одну планшету NUNCLON™ раскрывают в лаборатории класса 100.

Гемостатический барьер Surgicel® отрезают до подходящего размера, соответствующего дну ячейки в планшете для культуры ткани NUNCLON™. В этом случае круг имеет размер приблизительно 4 см (но он может быть любого возможного размера), и его помещают в асептических условиях на дно в ячейке 6-ячеечной одноразовой планшеты NUNCLON™ Delta для работы по исследованию клеток (NUNC, InterMed, Roskilde, Denmark). Гемостатический барьер, который предполагается поместить на дно ячейки, предварительно обрабатывают, как описано в примере 1. Эта обработка обеспечивает значительную отсрочку всасывания Surgicel. Задаем этот гемостатический барьер отмывают несколько раз в дистиллированной воде и в последующем несколько раз до тех пор, пока не будет смыт не вступивший в реакцию глутаральдегид. Небольшое количество среды для клеточной культуры, содержащей сыворотку, наносят для всасывания на гемостатический барьер, в то же самое время поддерживая влажность гемостатического барьера на дне ячейки.

Приблизительно 10^6 клеток в 1 мл культуральной среды помещают непосредственно на верхнюю часть гемостатического барьера, диспергированного по поверхности гемостатического барьера, предварительно обработанного 0,4%-ным глутаральдегидом, как описано выше. Затем планшету инкубируют в CO₂ инкубаторе при 37°C в течение 60 мин. Среду для культуры тканей, содержащую от 5 до 7,5% сыворотки, в количестве от 2 до 5 мл осторожно добавляют в ячейку, содержащую клетки, избегая разбрызгивания клеток с помощью удерживания наконечника пипетки тангенциально к стороне ячейки при выталкивании среды. Оказывается, что pH среды очень низкое (pH≈6,8). Затем pH доводят до 7,4-7,5. На следующий день

некоторые хондроциты начинают расти на гемостатическом барьере, располагаясь группами. Некоторые клетки погибают вследствие воздействия низкого pH перед доведением pH. Планшету инкубируют в течение 3-7 дней со сменой среды на 3 день.

В конце периода инкубации среду декантируют и хранившийся в холодильнике холодный 2,5%-ный глутаральдегид, содержащий 0,1 М натриевую соль диметиларсиновой кислоты (называемую также какодилат с доведением pH с помощью HCl до 7,4), добавляют в качестве фиксатора дня получения клетки и подложки (гемостатического барьера) для последующей подготовки к электронной микроскопии.

Пример 4

Хондроциты выращивают в минимальной основной культуральной среде, содержащей HAM F12 и 15 мМ буфера HEPES и от 5 до 7,5% аутологичной сыворотки, в CO₂ инкубаторе при 37°C и обрабатывают в лаборатории класса 100 в Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Copenhagen, Denmark. Для культивирования хондроцитов можно использовать другие композиции культуральной среды. Клетки трипсинизируют с использованием ЭДТА в течение 5-10 мин и считают с использованием окрашивания трипаном синим в камере Burker-Turk для определения жизнеспособности. Количество клеток доводят до $7,5 \cdot 10^5$ клеток на 1 мл. Одну планшету NUNCLON™ раскрывают в лаборатории класса 100.

Surgicel® (для использования в качестве гемостатического барьера) обрабатывают 0,6%-ным глутаровым альдегидом в течение 1 мин, как описано в примере 1, и промывают 0,9%-ным стерильным раствором хлорида натрия или предпочтительно буфером, таким как фосфатный буферный раствор, или культуральной средой, такой как MEM/F12, потому что pH после обработки глутаровым альдегидом составляет 6,8, а должно быть предпочтительно от 7,0 до 7,5. На обе стороны Surgicel® наносят Tisseel® с использованием системы DUPLOJECT®, покрывая таким образом обе стороны Surgicel®, накладки, которую предполагается использовать, фибриновым клеем. Клей оставляют для высыхания в асептических условиях в течение, по меньшей мере, от 3 до 5 мин. "Покрытый" гемостатический барьер помещают на дно ячейки в 6-ячеечной одноразовой планшете NUNCLON™ Delta для работы по исследованию клеток. Небольшое количество среды для тканевой культуры, содержащей сыворотку, наносят для всасывания на гемостатический барьер. Приблизительно 10^6 клеток в 1 мл культуральной среды, содержащей сыворотку, помещают непосредственно на верхнюю часть гемостата, диспергированного по поверхности гемостатического барьера. Затем планшету инкубируют в CO₂ инкубаторе при 37°C в течение 60 мин. Среду для культуры тканей, содержащую от 5 до 7,5% сыворотки, в количестве от 2 до 5 мл осторожно добавляют в ячейку, содержащую клетки, избегая разбрызгивания клеток с помощью удерживания наконечника пипетки тангенциально к стороне ячейки при выталкивании среды. Через 3-6 дней

микроскопическое исследование показывает, что клетки удовлетворительным образом прилипли и вросли в Surgicel®, свидетельствуя о том, что Surgicel® не проявляет токсичности по отношению к хондроцитам и что хондроциты удовлетворительным образом врастают в Surgicel®.

Планшету инкубируют в течение 3-7 дней со сменой среды на 3 день. В конце периода инкубации среду декантируют и хранившийся в холодильнике холодный 2,5%-ный глутаральдегид, содержащий 0,1 М натриевую соль диметиларсиновой кислоты, называемой также какодилат натрия, с доведением pH с помощью HCl до 7,4, добавляют в качестве фиксатора для получения клетки и подложки (гемостатического барьера) для последующей подготовки к электронной микроскопии.

Пример 5

Хондроциты выращивают в минимальной основной культуральной среде, содержащей HAM F12 и 15 мМ буфера Hepes и от 5 до 7,5% аутологичной сыворотки, в CO₂ инкубаторе при 37°C и обрабатывают в лаборатории класса 100 в Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Copenhagen, Denmark. Клетки трипсинизируют с использованием ЭДТА в течение 5-10 мин и считают с использованием окрашивания трипаном синим в камере Burkert-Turk. Количество клеток доводят до $7,5 \cdot 10^5$ - $2 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл. Одну планшету NUNCLON™ раскрывают в лаборатории класса 100.

Было обнаружено, что Bio-Gide® может использоваться в качестве рассасываемой двухслойной мембраны, которая будет применяться в качестве накладки или бандажа, покрывающего область дефекта сустава, в которую трансплантируются культивированные хондроциты, а также гемостатического барьера.

Bio-Gide® представляет собой чистую коллагеновую мембрану, подученную с помощью стандартизованных, контролируемых процессов изготовления (по E.D. Geistlich Sohne AG, CH-6110 Wolhusen). Коллаген экстрагируют у свиней, прошедших ветеринарную сертификацию, и тщательно очищают во избежание антигенных реакций и стерилизуют в двойных блистерах с помощью γ -облучения. Двухслойная мембрана имеет пористую поверхность и плотную поверхность. Мембрана изготовлена из коллагена I типа и III типа без дальнейшей поперечной сшивки или химической обработки. Коллаген рассасывается в пределах 24 нед. Мембрана сохраняет свою структурную целостность даже в мокром состоянии и может фиксироваться с помощью швов или штифтами. Мембрану можно также "приклеить" с использованием фибринового клея, такого как Tisseel®, к соседнему хрящу или ткани или вместо швов, или совместно со швами.

Bio-Gide® раскрывают в лаборатории класса 100 и помещают в асептических условиях на дно ячейки в 6-ячеечной одноразовой планшете NUNCLON™ Delta для работы по исследованию клеток или с пористой поверхностью двухслойной мембраны, обращенной вверх, или с плотной поверхностью, обращенной вверх. Приблизительно 10^6 клеток в 1 мл среды для

культуры ткани, содержащей сыворотку, помещают непосредственно на верхнюю часть Bio-Gide®, диспергированного или по пористой, или по плотной поверхности Bio-Gide®, затем планшету инкубируют в CO₂ инкубаторе при 37°C в течение 60 мин. Среду для культуры тканей, содержащую от 5 до 7,5% сыворотки, в количестве от 2 до 5 мл осторожно добавляют в ячейку, содержащую клетки, избегая разбрызгивания клеток с помощью удерживания наконечника пипетки тангенциально к стороне ячейки при выталкивании среды.

На 2 день после помещения хондроцитов в ячейку, содержащую Bio-Gide®, клетки исследуют в инвертированном микроскопе Nikon. Было отмечено, что некоторые хондроциты прилипли к краю Bio-Gide. Конечно, при использовании этого микроскопа было невозможно смотреть через сам Bio-Gide®.

Планшету инкубируют в течение 3-7 дней со сменой среды на 3 день. В конце периода инкубации среду декантируют и хранившийся в холодильнике холодный 2,5%-ный глутаральдегид, содержащий 0,1 М натриевую соль диметиларсиновой кислоты, называемой также какодилат натрия, с доведением pH с помощью HCl до 7,4, добавляют в качестве фиксатора для получения клетки и опоры Bio-Gide®, с клетками или культивированными на пористой поверхности, или на плотной поверхности. Накладки из Bio-Gide® затем посылают для электронной микроскопии в отделение патанатомии Herlev Hospital, Denmark.

Электронная микроскопия показывает, что хондроциты, культивированные на плотной поверхности Bio-Gide®, не врастают в коллагеновую структуру Bio-Gide®, тогда как клетки, культивированные на пористой поверхности, действительно не врастают в коллагеновую структуру и, кроме того, проявляют присутствие протеогликанов и отсутствие признаков фибробластных структура. Этот результат показывает, что когда коллагеновая накладка, такая, например, как накладка из Bio-Gide®, пришивается в качестве накладки, покрывающей дефект хряща, причем пористая поверхность обращена вниз по направлению к дефекту, в который предполагается инъецировать культивированные хондроциты. Они затем будут способны проникать через коллаген и образовывать гладкую хрящевую поверхность вровень с интактной поверхностью, и в этой области будет постепенно создаваться гладкий слой протеогликанов. Тогда как если плотная поверхность коллагена обращена вниз в дефект, хондроциты, подлежащие имплантации, не объединятся с коллагеном, и клетки не образуют такую же гладкую поверхность, как описано выше.

Пример 6

Хондроциты выращивают в минимальной основной культуральной среде, содержащей HAM F12 и 15 мМ буфера Hepes и от 5 до 7,5% аутологичной сыворотки, в CO₂ инкубаторе при 37°C и обрабатывают в лаборатории класса 100 в Verigen Europe A/S, Symbion Science Park, Copenhagen, Denmark. Клетки трипсинизируют с использованием трипсина ЭДТА в течение 5-10 мин и считают в камере Burkert-Turk с использованием

окрашивания трипаном синим для определения жизнеспособности. Количество клеток доводят до $7,5 \cdot 10^5 - 2 \cdot 10^6$ клеток на 1 мл. Одну планшету NUNCLON™ раскрывают в лаборатории класса 100.

Bio-Gide®, используемый в качестве рассасываемой двухслойной мембраны, может также использоваться совместно с органическим клеем, таким как Tisseel® с дополнительным, значительно более высоким содержанием аprotонина, чем обычно обнаруживается в Tisseel®, как описано во вкладыше продукта. С помощью увеличения содержания аprotонина приблизительно до 25,000 КМЕ/мл, рассасывание материала будет отсрочено на недели вместо обычного периода, исчисляемого днями.

Для исследования этого признака in vitro Tisseel® наносят на дно ячейки планшеты NUNCLON™ и обеспечивают возможность неполного затвердевания. Затем на Tisseel® накладывают коллагеновую накладку, такую как Bio-Gide®, и приклеивают ко дну ячейки. Эта комбинация Bio-Gide® и Tisseel® предназначена быть гемостатическим барьером, который будет ингибировать или предотвращать развитие или инфильтрацию кровеносных сосудов в область трансплантации хондроцитов. Теперь эту гибридную коллагеновую накладку можно использовать и в качестве гемостатического барьера на дне поражения (максимально проксимальнее поверхности, подлежащей восстановлению), но также и в качестве подложки для образования хряща, потому что дистальная поверхность может быть пористой стороной коллагеновой наклейки и, следовательно, способствовать инфильтрации хондроцитов и хрящевого матрикса. Таким образом, эта гибридная коллагеновая накладка может также использоваться для покрытия верхней части имплантата с коллагеновой пористой поверхностью, направленной вниз по направлению к имплантированным хондроцитам, и барьером, образующим верхнюю часть. Гибридная коллагеновая накладка с увеличенным содержанием аprotонинового компонента может также использоваться без любого органического клея, такого как Tisseel®, и помещаться непосредственно внутрь дефекта, прилипая под воздействием естественных сил. Следовательно, коллагеновая накладка может использоваться и в качестве гемостатического барьера, и бесклеточного покрытия участка восстановления/трансплантата с пористыми поверхностями накладок, ориентированными в направлении к трансплантированным хондроцитам/хрящу. В другом варианте будет использоваться коллагеновая накладка, которая состоит из коллагена II типа (т.е. из Gelstlich Sohne AG, CH-6110 Wolhusen).

Таким образом, настоящее изобретение обеспечивает накладку из гибридного коллагена, в которой указанная накладка представляет собой коллагеновый матрикс с возросшими уровнями аprotонинового компонента, предпочтительно приблизительно 25,000 КМЕ/мл, в сочетании с клеем органического матрикса, в котором коллагеновый компонент аналогичен рассасываемому двухслойному материалу Bio-Gide® или коллагену II типа, а

органически клей аналогичен материалу Tisseel®. В другом варианте реализации для приклеивания гибридной коллагеновой наклейки к участку восстановления не используется никакой органический клей.

Пример 7

Ввиду ослабленной структуры хряща при остеоартрите, прилипание культивированных аутологичных хондроцитов, трансплантированных в участок пересадки в дефектном хряще, может быть ингибировано, создавая таким образом краевую зону (зону демаркации) между вновь имплантированным хрящом/хондроцитами и окружающим сформированным хрящом. Эта краевая зона будет более всего выражена, если участок пересадки подготовлен для трансплантата путем создания прямых, гладких стенок, срезанных линейным образом. Силы сдвига и сдавливания, действующие через такую краевую зону (как показано на фиг. 3А), будут оказывать сильное воздействие для смещения трансплантата, если участок пересадки создается дальнейшим отсечением. Эта краевая зона и различное движение материалов вдоль этой зоны будет ингибировать сливное срастание между пересаженным материалом и окружающим материалом. Сдвиг этой краевой зоны усиливается, когда жесткость упирающегося материала различна. Во многих случаях материал трансплантата мягче, чем окружающий материал, однако в некоторых случаях заболевания остеоартритом окружающий хрящ может быть действительно мягче, чем имплантированные хондроциты/хрящ.

Поэтому для разрешения этой проблемы способ изобретения предусматривает использование хирургических инструментов для профилирования стенок участка пересадки так, что стенки не линейные и, следовательно, обеспечивают волнистость поверхностей, что уменьшит сдвиг краевой зоны и обеспечит прикрепление трансплантированного материала. Можно также так профилировать участок пересадки, что диаметр участка проксимальнее поверхности кости имеет больший размер, чем отверстие дистальнее кости и на поверхности подлежащего восстановлению хряща тем, что имеется эффект "обратного туннеля". Суженное отверстие на поверхности поможет снижению сдвига краевой зоны и выталкивания материала трансплантата из участка пересадки.

Предпочтительный вариант реализации описывает профилирование стенок участка пересадки образом, подобным резбовому отверстию для приема болта или винта (как показано на фиг. 3В), обеспечивая таким образом механическое сопротивление сдавливанию и/или выталкиванию пересаженного материала из участка пересадки, что может быть описано как "мужская" и "женская" резьба.

Хирургические инструменты, предусматриваемые настоящим изобретением, могут быть изготовлены из металла и/или пластика, пригодного для изготовления хирургических инструментов для одноразового или многократного использования. Поскольку хрящ представляет собой относительно мягкий материал, преимущество может иметь изготовление

режущих краев повышенной прочности, которые будут способны спрофилировать хрящ, не будучи способными повредить кость. Такие режущие инструменты могут быть изготовлены с включением отверстий для введения жидкости, удаления с помощью отсоса остатков отсекаемой ткани, и жидкости, и нитей оптических волокон для освещения и визуализации участка дефекта. В определенных вариантах реализации инструмента основание инструмента может иметь выступающее острие или подобное шипу образование, которое поможет в направлении и размещении инструмента в участке пересадки. Конечно, такой шип будет сконструирован для сведения к минимуму повреждения подлежащей кости.

Хотя режущая поверхность инструмента может иметь одиночный зуб, или множество зубьев, или иметь вид шурупа, такой как у металлического метчика, используемого для создания резьбовых отверстий в металлических частях, характеристика, требуемая для режущего инструмента, такова, что полученные в результате спрофилированные стороны участка пересадки имеют волнистый, а не линейный профиль. Например, в определенных вариантах реализации режущий край инструмента может иметь форму, аналогичную форме, показанной на фиг.4А или как на фиг.4В. Режущий край может быть плоским или круглым, так что он наматывается вокруг диаметра режущего инструмента. Для осуществления способа изобретения может конструироваться множество других форм для создания поверхности раздела, которая обеспечивает механическое сопротивление различной реакции на силы сдвигания или сдвига, действующие на трансплантированный материал и окружающий материал.

Пример 8

Четырехмесячную свинью смешанной йоркширской породы подвергают общей анестезии и кладут на спину. Свинью моют и обкладывают хирургическим бельем в операционной Harrington Arthritis Research Center, Phoenix, Arizona. Все хирургическое вмешательство выполняют в асептических условиях. Левую заднюю лапу и прилегающую область живота и паха смазывают йодом. Определяют положение коленного сустава и надколенника. Осуществляют срединный и разрез приблизительно в 3 см от задней части надколенника и проводят приблизительный разрез нескольких подкожных, мышечных слоев и связок для получения доступа к медиальному мыщелку бедренной кости. С использованием кругового резца осуществляют повреждение в белом хряще на средней части медиального мыщелка, оставляя край от 0,5 до 1 см до края хряща, покрывающего задне-медиальную часть мыщелка (левый мыщелок, фиг.6А). Дефект размером 0,5-1 см размещают в каудальной части медиального мыщелка, несущей весовую нагрузку. Все хирургическое вмешательство выполняют без жгута на левом бедре. Различные слои и кожу ушивают соответствующим образом.

На 3 день животное снова доставляют в операционную и укладывают, как описано выше, на операционном столе и проводят общую анестезию. Левую заднюю лапу, живот

и область паха смазывают йодом, как описано выше. Швы разрезают и область открывают. Отмечают наличие умеренной гематомы в коленном суставе. Сгусток крови удаляют и осматривают дефект. В дефекте имеется сгусток крови, который удаляют. В дефект осторожно вкручивают стерильный хирургический инструмент, имеющий режущий край в виде мужской резьбы с размером, соответствующим или несколько большим, чем окружность повреждения. Накладку Bio-Gide® отрезают до размера, равного дну дефекта. Первый используемый клей, называемый Adhesive Protein (A-2707, Sigma Chemical, USA), накладывают на плотную сторону гемостатической барьерной наклейки с отсеченными краями, и накладку посещают плотной стороной вниз на дно поражения с использованием ее в качестве барьера, как описано выше. Обнаруживают, что, как оказывается, этот клей не высыхает очень быстро. Небольшое кровотечение из дна дефекта сразу прекращается. Отрезают второй Bio-Gide®, несколько больший по окружности, чем поражение, и помещают плотной стороной вверх (следовательно, пористой стороной вниз по направлению к трансплантату), как описано выше.

Эту неплотную покрывающую накладку затем пришивают над полостью, оставляя один край открытым, куда в участок пересадки можно инъецировать подлежащие пересадке хондроциты. Окружающая часть края наклейки была покрыта вторым клеем, Dow Corning Medical Adhesive B (Cat. #895-3; Dow Corning USA). Этот второй клей высыхает гораздо быстрее и более эффективно, чем первый клей. Обнаруживают, что во время этой конкретной процедуры первый клей не высыхает достаточно для удержания гемостатического барьера на месте при попытке пришивания наклейки. Основной барьер, образованный на проксимальной поверхности участка пересадки, создается самим клеем.

С использованием шприца емкостью 1 мл и иглы 16 калибра суспензию хондроцитарных клеток (приблизительно 0,6 мл) засасывают в цилиндр шприца. Короткую иглу 23 калибра меняют на иглу 16 калибра и клеточную суспензию инъецируют под пришитую покрывающую накладку в участок пересадки (приблизительно $10 \cdot 10^6$ клеток). Затем открытый край наклейки приклеивают перед удалением иглы и иглу осторожно извлекают. Утечка клеток не наблюдается. Рану ушивают и, как и выше, не используют жгут; кровотечение не наблюдают. Зашивают последние слои кожи. После ушивания не происходит выпирания кожи, что указывает на отсутствие гематомы. Послеоперационное восстановление протекает гладко.

Как и ожидалось, пересаженные хондроциты образуют хрящевой матрикс, достаточный для восстановления дефекта, созданного в хрящевой поверхности суставного сочленения коленного сустава исследуемой свиньи. Фиг.6А представляет собой изображение с помощью ЯМР коленного сустава свиньи, показывающее дефект хряща, созданного в коленном суставе (левый мыщелок, медиальный мыщелок), а фиг.6В представляет собой изображение с помощью ЯМР того же коленного сустава через 3 мес после лечения, показывающее

восстановление дефекта.

Пример 9

Набор, включающий компоненты, которые можно использовать для реализации способа изобретения, обеспечит возможность удобного осуществления способа изобретения в хирургической клинике. В предпочтительном варианте реализации набор изобретения обеспечит стерильные компоненты, пригодные для легкого использования в хирургической клинике, и обеспечит подходящий гемостатический барьер, подходящую покрывающую накладку и, если необходимо, органический клей. Набор изобретения может также обеспечить стерильный, бесклеточный материал матрикса, подходящий для поддержки аутологических хондроцитов, которые предстоит имплантировать в дефект поверхности суставного сочленения. В одном варианте реализации набор изобретения содержит гемостатический барьер Surgicel® и покрывающую накладку Bio-Gide® с подходящим покрытием из органического клея Tisseel®, где Surgicel® и покрывающая накладка Bio-Gide® были обработаны в соответствии с положениями изобретения для увеличения периода времени до рассасывания. В случаях, когда Tisseel® предварительно покрыт, в одном варианте реализации Tisseel® дополняется дополнительным аprotинином для увеличения периода времени до рассасывания.

В другом предпочтительном варианте реализации и гемостатический барьер, и покрывающая накладка представляют собой полупроницаемый коллагеновый матрикс, который обрабатывается для увеличения периода времени до рассасывания материала. Можно также предоставить клей Tisseel® в усиленной форме в качестве отдельного компонента для применения в случае необходимости ввиду присущей изменчивости необычных обстоятельств, которые могут встретиться при каждой процедуре восстановления/трансплантации.

Еще один вариант реализации набора изобретения будет включать хирургический инструмент, как описано выше в примере 7, или его подходящие разновидности.

Специалистам в этой области будет понятно, что в изобретении, показанном в определенных вариантах реализации, могут осуществляться модификации без отхода от сущности и объема притязаний описанного изобретения.

Формула изобретения:

1. Способ эффективного лечения хряща сочленяющейся поверхности сустава, включающий размещение гемостатического барьера на подлежащей лечению поверхности, помещение хондроцитов в подходящем матриксе на гемостатический барьер и покрытие подлежащей лечению поверхности покрывающей накладкой.

2. Способ по п. 1, в котором указанную покрывающую накладку сначала прикрепляют к поверхности хряща, покрывающего участок пересадки, а затем указанные хондроциты размещают под указанную покрывающую накладку в указанный участок пересадки.

3. Способ по пп.1 и 2, в котором указанная покрывающая накладка содержит полупроницаемый коллагеновый матрикс.

4. Способ по п.3, в котором указанная покрывающая накладка содержит полупроницаемый коллагеновый матрикс с пористой поверхностью.

5. Способ по п.4, в котором указанная пористая поверхность контактирует с пересаженными хондролитами.

6. Способ по пп.3-5, в котором указанная покрывающая накладка содержит полупроницаемый коллагеновый матрикс, который по существу свободен от интактных клеток.

7. Способ по пп.1-6, в котором указанный гемостатический барьер представляет собой способный к рассасыванию полупроницаемый материал, который ингибирует или предотвращает сосудистую инфильтрацию через барьер.

8. Способ по пп.1-7, в котором указанный гемостатический барьер содержит коллаген.

9. Способ трансплантации хондроцитов в подходящем матриксе на подлежащую лечению поверхность с участком пересадки, гемостатическим барьером и покрывающей накладкой, включающий, во-первых, профилирование участка пересадки так, что стенки участка пересадки нелинейные и/или волнообразные, размещение гемостатического барьера проксимальнее подлежащей лечению поверхности внутри спродифирированного участка пересадки, помещение хондроцитов в подходящем матриксе внутрь участка пересадки на гемостатический барьер и покрытие подлежащей лечению поверхности покрывающей накладкой.

10. Способ по п. 9, в котором указанная покрывающая накладка частично прикреплена перед помещением хондроцитов внутрь участка пересадки на гемостатический барьер.

11. Способ по пп.9 и 10, в котором указанный гемостатический барьер представляет собой способный к рассасыванию полупроницаемый материал, который ингибирует или предотвращает сосудистую инфильтрацию через барьер.

12. Способ по пп.9-11, в котором указанный гемостатический барьер содержит коллаген.

13. Способ по пп.9-12, в котором указанная покрывающая накладка представляет собой бесклеточный, полупроницаемый коллагеновый матрикс.

14. Набор для трансплантации хондроцитов и необязательно хряща на поверхность сочленяющего сустава, в котором указанный набор включает гемостатический барьер, предварительно обработанный для противодействия рассасыванию, который может приспособливаться для размещения на указанной поверхности, покрывающую накладку, предварительно обработанную для противодействия рассасыванию, которая может приспособливаться для покрытия указанной поверхности, и необязательно органический клей, который может приспособливаться для прикрепления указанного гемостатического барьера и/или указанной покрывающей накладки на указанную поверхность, в котором указанная покрывающая накладка по существу свободна от жизнеспособных клеток и указанная накладка содержит коллагеновый матрикс с

увеличенным содержанием аprotонинового компонента.

15. Набор для осуществления способа по пп.1-13, включающий гемостатический барьер, обработанный для ингибирования рассасывания, покрывающую накладку, обработанную для ингибирования рассасывания, необязательно органический клей, необязательно хирургический инструмент для профилирования стенок участка пересадки и необязательно материал

матрикса, пригодный для поддержки хондроцитов, помещенных внутрь указанного участка пересадки, в котором указанная покрывающая накладка по существу свободна от жизнеспособных клеток, и указанная накладка содержит коллагеновый матрикс с увеличенным содержанием аprotонинового компонента.

Приоритет по пунктам:
30.08.1996 - пп.1-8, 14-15;
15.05.1997 - пп.9-13.

5
10

15

20

25

30

35

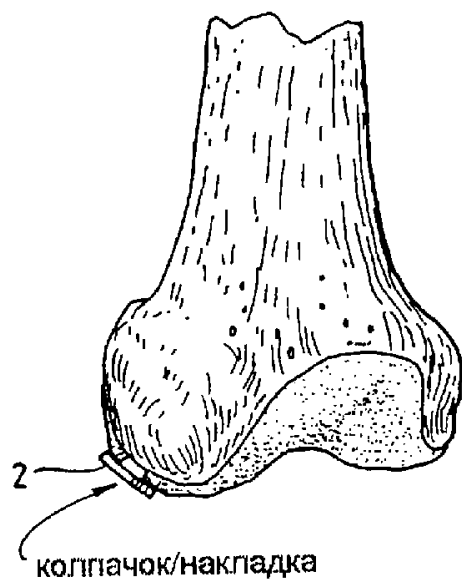
40

45

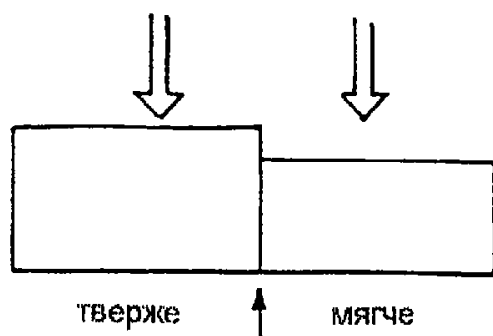
50

55

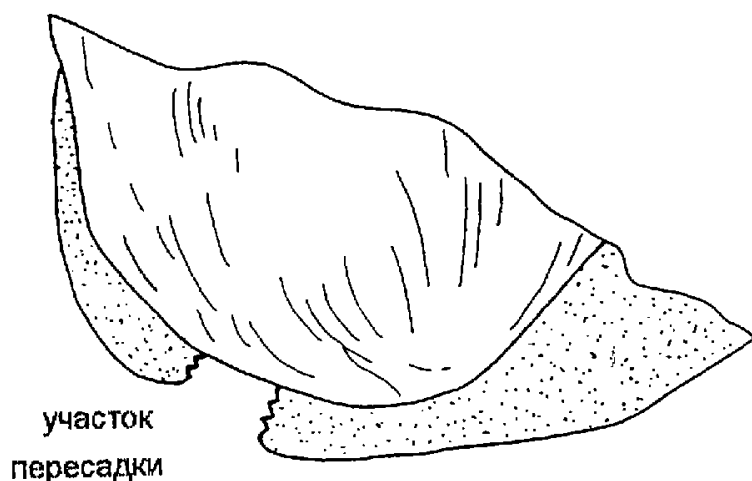
60



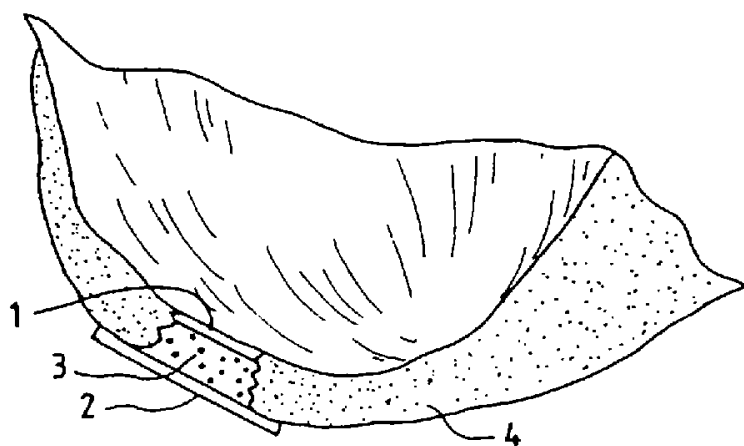
ФИГ. 2



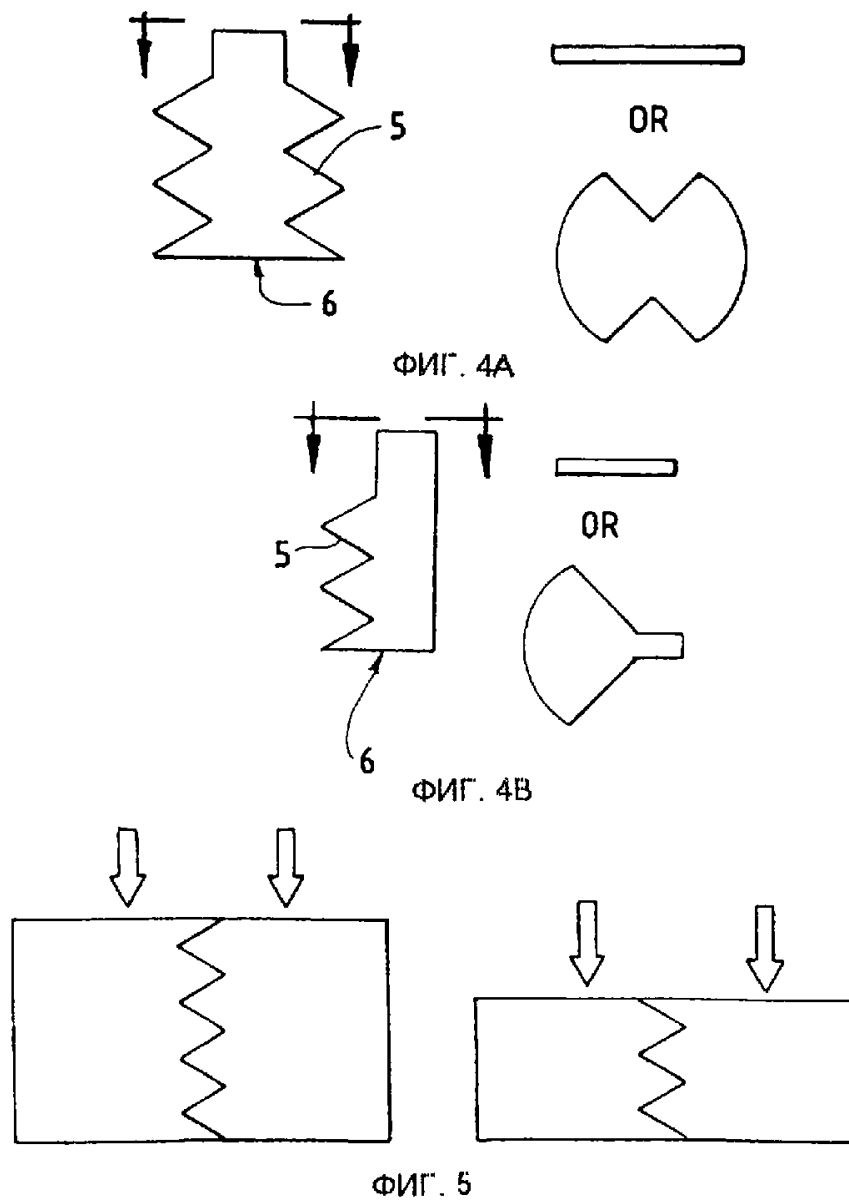
зона
ФИГ. 3А



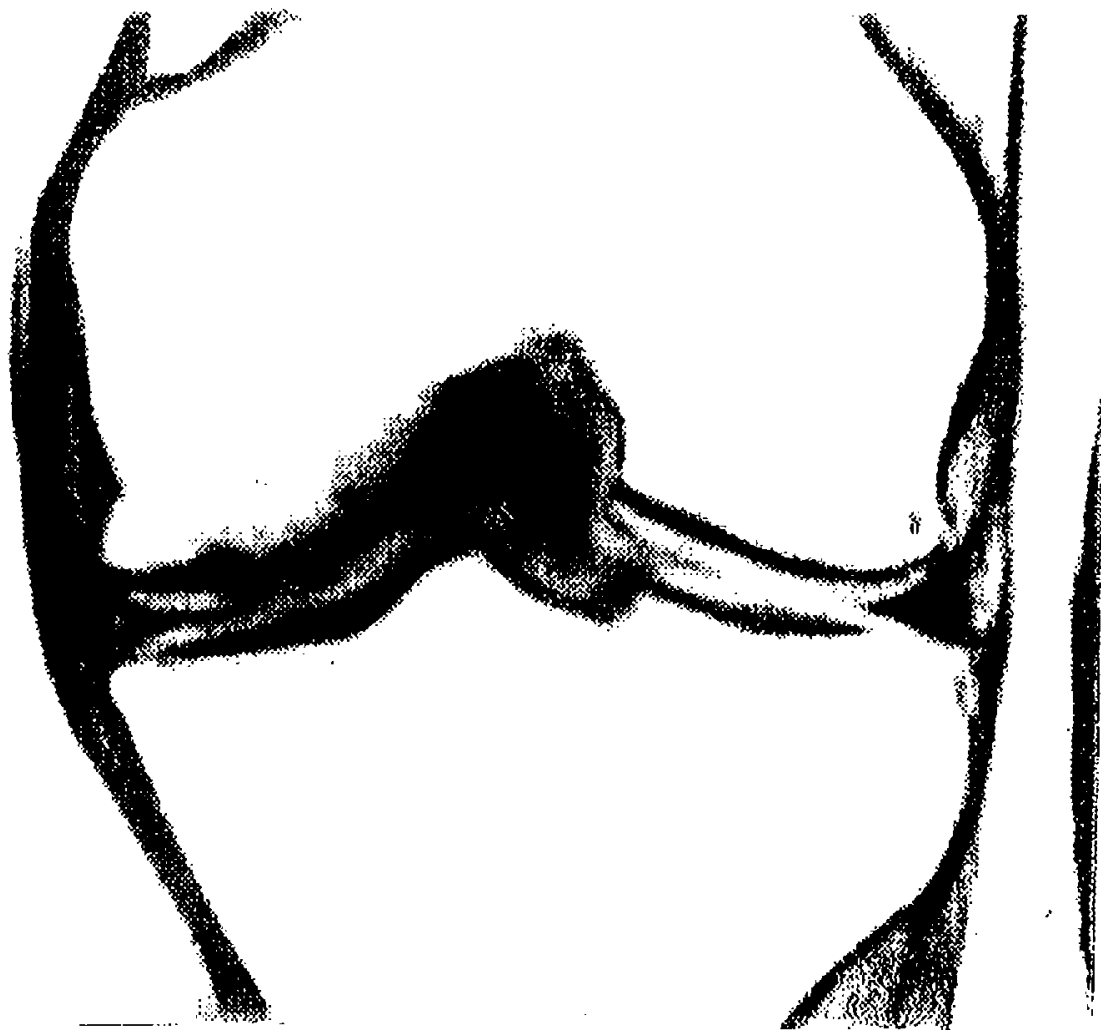
ФИГ. 3В



ФИГ. 3С

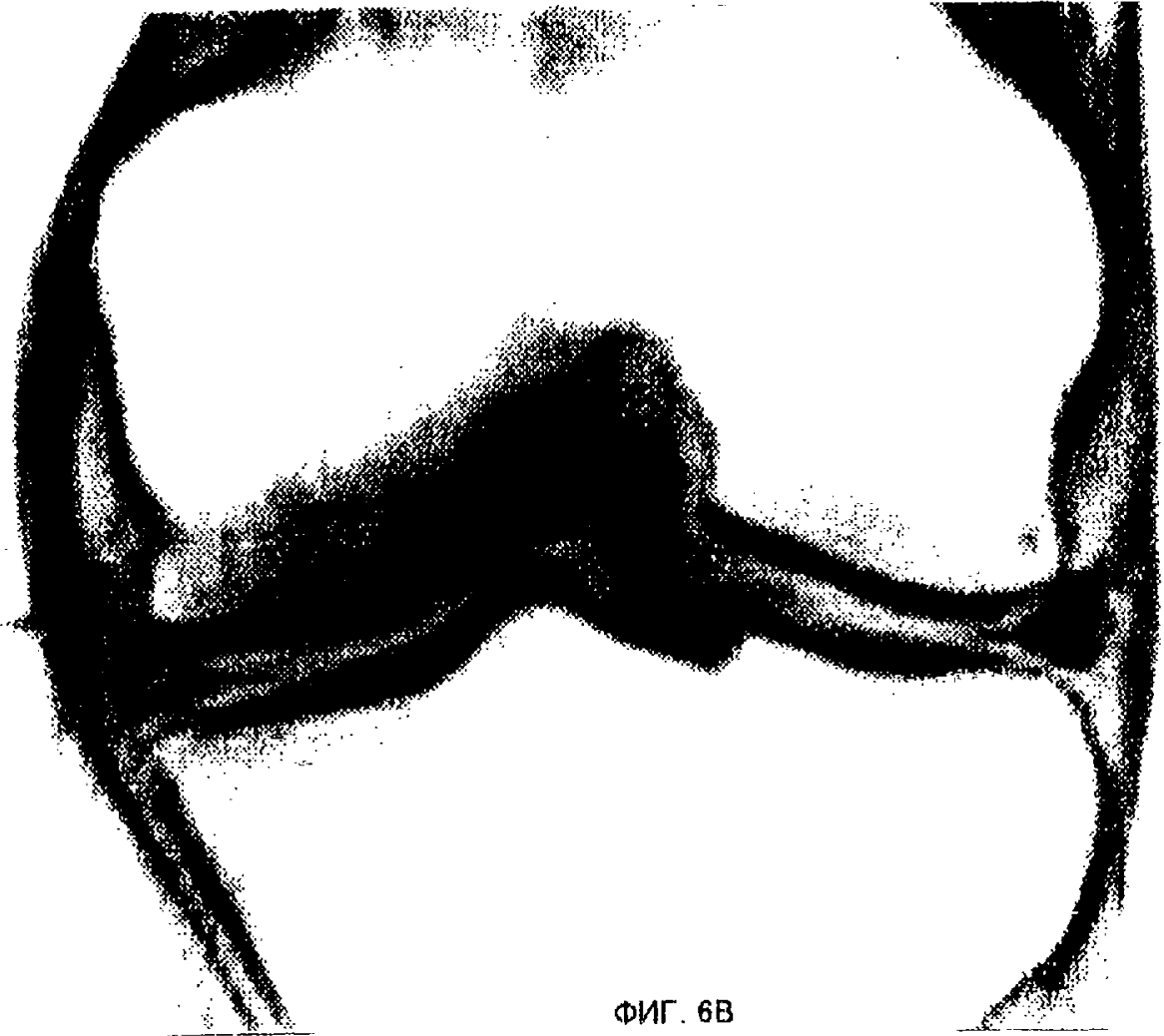


RU 2214197 C2



ФИГ. 6А

RU 2214197 C2



ФИГ. 6В