



**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2012151191/15, 29.11.2012

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.11.2012

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.11.2012

(45) Опубликовано: 20.07.2014 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: **ХВАТОВ В.Б. и др. Количественная и качественная оценка стволовых клеток кадаверного костного мозга // Трансплантология, 2009, N2, стр.40-43. RU 2303632 C1, 27.07.2007. SU 1537233 A1, 23.01.1990. US 7914461 B2, 29.03.2011. ПЕТРОВСКИЙ Я.Л. Сравнительная характеристика мезенхимальных стромальных клеток костного мозга, жировой ткани и плаценты человека (см. прод.)**

Адрес для переписки:

129090, Москва, Большая Сухареvская пл., 3,
ГБУЗ НИИ скорой помощи им. Н.В.
Склифосовского, И.С Поздышевой

(72) Автор(ы):

**Хубутия Могели Шалвович (RU),
Боровкова Наталья Валерьевна (RU),
Хватов Валерий Борисович (RU),
Пономарев Иван Николаевич (RU),
Гуляев Владимир Алексеевич (RU),
Мионов Александр Сергеевич (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения г. Москвы (RU)

(54) ТЕХНОЛОГИЯ ПОЛУЧЕНИЯ КОСТНОГО МОЗГА ОТ ДОНОРОВ-ТРУПОВ С БЬЮЩИМСЯ И НЕ БЬЮЩИМСЯ СЕРДЦЕМ

(57) Реферат:

Группа изобретений относится к области медицины и может быть использована для получения костного мозга (КМ) от доноров-трупов. Для этого пунктируют крылья подвздошных костей в передней и задней трети крыльев, устанавливая в каждое по два троакара. Сбор КМ выполняют методом простой аспирации, аспирации-промыиванием или их комбинированием при разряжении 0,6 Атм при помощи устройства. Устройство для заготовки КМ включает одноразовую многоканальную закрытую систему, модуль аспирации-накопления и модуль перфузии. Группа изобретений также

относится к способу оценки заготовленного костного мозга. Использование данного способа получения костного мозга (КМ) обеспечивает заготовку стерильного богатого жизнеспособными мультипотентными мезенхимальными стромальными и гемопозитическими прогенеторными клетками КМ, при этом результат достигается за счет автоматизации миелоаспирации, путем заготовки биоматериала специальным разработанным устройством для сбора КМ. 3 н. и 4 з.п. ф-лы, 1 пр., 1 ил., 1табл.

(56) (продолжение):

// Автореферат кбн, Новосибирск, 2009, [он-лайн], [найдено 30.10.2013]. Найдено из Интернет: .
КАЗАНЦЕВ А.В. и др. Возможности клеточной терапии в стимуляции коллатерального
кровообращения у больных с облитерирующим атеросклерозом артерии нижних конечностей //
Медицинские науки, 20011, N2, стр.68-72. КОНЮШКО О.И. и др. Требования, предъявляемые к
линиям диплоидных аллогенных клеток, предназначенных для регенеративной медицины //
Трансплантология, 2009, N2, стр.31-34

R U 2 5 2 3 5 6 3 C 1

R U 2 5 2 3 5 6 3 C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
G01N 33/533 (2006.01)
G01N 1/10 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2012151191/15, 29.11.2012**

(24) Effective date for property rights:
29.11.2012

Priority:

(22) Date of filing: **29.11.2012**

(45) Date of publication: **20.07.2014** Bull. № 20

Mail address:

**129090, Moskva, Bol'shaja Sukharevskaja pl., 3,
GBUZ NII skoroj pomoshchi im. N.V.
Sklifosovskogo, I.S Pozdyshevoj**

(72) Inventor(s):

**Khbutija Mogeli Shalvovich (RU),
Borovkova Natal'ja Valer'evna (RU),
Khvatov Valerij Borisovich (RU),
Ponomarev Ivan Nikolaevich (RU),
Guljaev Vladimir Alekseevich (RU),
Mironov Aleksandr Sergeevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe bjudzhetnoe uchrezhdenie
zdravookhraneniya goroda Moskvy Nauchno-
issledovatel'skij institut skoroj pomoshchi imeni
N.V. Sklifosovskogo Departamenta
zdravookhraneniya g. Moskvy (RU)**

(54) **BONE MARROW TECHNOLOGY FROM DEAD DONORS WITH BEATING AND NON-BEATING HEART**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: wings of ilium are punctured in an anterior and posterior one-third of the wings with two trocars being inserted into each wing. The bone marrow (BM) is collected by simple aspiration, aspiration irrigation or a combination thereof at an underpressure of 0.6 Atm with using a device. The bone marrow preparation device comprises a disposable multi-channel closed system, an aspiration collection unit and a perfusion unit. The group of inventions also refers to a

method for assessing the prepared bone marrow. The effect is ensured by automatic control of myeloaspiration by preparing a biological material with using a special designed device for the bone marrow collection.

EFFECT: using the given method for preparing the bone marrow provides preparing the sterile bone marrow rich in viable multipotent mesenchymal stromal and hemopoietic progenitor cells.

7 cl, 1 ex, 1 dwg, 1 tbl

Изобретение относится к области медицины и может быть использовано для проведения клеточной терапии у больных и пострадавших с целью улучшения репаративных процессов.

В современном понимании стволовая клетка - это незрелая клетка, способная к самообновлению и дифференцировке в специализированные клетки организма. Являясь универсальным стабильным модулем, стволовые клетки могут создавать устойчивые ростки новой здоровой ткани в больных органах. Значимость такого подхода для восстановления или воссоздания у человека здоровых тканей взамен больных или утраченных определена Приказом Министра Здравоохранения Российской Федерации №325 от 25.07.2003 года «О развитии клеточных технологий в Российской Федерации».

Наиболее часто в клинической практике используют гемопоэтические (способные дифференцироваться в клетки крови) и мезенхимальные (предшественники клеток соединительной, костной, мышечной, жировой, хрящевой ткани) прогениторные клетки. При оценке эффективности и для стандартизации протоколов клеточной терапии используют понятие «терапевтическая доза». «Терапевтическая доза» - оптимальное количество прогениторных клеток, позволяющее достичь ожидаемого эффекта. При системном введении обычно используют прогениторные клетки в количестве $1-2 \cdot 10^6$ /кг веса пациента. При местном применении доза клеток зависит от патологии и распространенности процесса.

Богатым источником прогениторных клеток обоих типов является костный мозг (КМ) человека. В процессе получения стволовых клеток из КМ выполняются этапы: сбора КМ, его очистка, фракционирование с выделением прогениторных клеток. Полученный клеточный материал может подвергаться культивированию, модификации, помещаться на хранение или применяться в клинической практике.

У доноров КМ собирают из крыльев подвздошных костей (КПК) шприцем через костномозговую иглу. С целью предотвращения коагуляции аспирата троакары, устройство для сбора и накопительную емкость обрабатывают антикоагулянтом. Троакаром прокалывают кожу, подлежащие мягкие ткани, пунктируют губчатое вещество кости. Создавая разрежение в подключенном к троакару устройстве собирают КМ. Одновременно аспирируют до 5 мл КМ, после чего меняют положение троакара в кости. После аспирации 15-20 мл КМ меняют точку пункции кости. Процедуру повторяют до получения необходимого объема аспирата. Поскольку аспират значительно отличается по клеточности от нативного КМ, так как значительно разведен кровью, вымывающей прогениторные клетки из губчатого вещества кости, то для получения необходимой терапевтической дозы миелоаспирацию проводят в объеме до 1500 мл.

Описанная методика наиболее часто применяется в практическом здравоохранении. Однако рутинному применению стандартной методики миелоаспирации, для получения прогениторных клеток КМ, пригодных для трансплантации, препятствуют присущие методу недостатки. Выполнение большого количества проколов троакаром мягких тканей, кости, для получения необходимого объема КМ, требует проведения донору наркоза или выполнения спинальной анестезии. Большой объем интраоперационной травмы обуславливает высокий риск возникновения осложнений в послеоперационном периоде [Impact of stem cell donation modality on normal donor quality of life: a prospective randomized study, GA Kennedy et al., 2003]. Объем собранного аспирата эквивалентен кровопотере, что требует проведения адекватной инфузионно-трансфузионной терапии. Высокие требования к соматическому состоянию обуславливают дефицит доноров-добровольцев и противопоказания к аутодонорству у некоторых групп пациентов.

По данным литературы, источником для получения большого количества прогенеторных клеток является КМ доноров-трупов [Cadaveric bone marrow and spleen cells for transplantation, G Soderdahl et al., 1998]. Существующие методы получения КМ от доноров-трупов условно делят на две группы: подразумевающие извлечение из тела 5 костей, содержащих КМ, с последующей их обработкой для получения прогенеторных клеток и основанные на аспирации биоматериала [Методы получения максимально возможного количества костного мозга и крови от трупов / П.М.Медведев, А.А.Раков, Г.А.Пафомов и др.: Метод. рек. - Ленинград, 1982. - 25 с.].

В соответствии с «Инструкцией по заготовке и консервированию посмертного 10 костного мозга Министерства здравоохранения СССР» от 1989 миелоаспирацию у донора-трупа проводят способом, аналогичным применяемому у доноров-добровольцев, при разрежении не более 0,4 Атм. Однако эффективность этого способа у доноров-трупов, как правило, ниже, чем у здоровых, что связано с изменениями реологических и динамических свойств крови, наступающих при остановке сердечной деятельности. 15 Посмертная гемокоагуляция приводит к тромбированию сосудов кости и препятствует вымыванию прогенеторных клеток из ячеек кровью. При частичном выключении кости из кровообращения удается собрать концентрированный КМ, однако большое количество прогенеторных клеток остается не собранными. При полном прекращении тока крови в костной ткани создающееся при аспирации разрежение делает процедуру 20 сбора не эффективной. Решением этой проблемы является разрежение создаваемого при аспирации разрежения в костной ткани путем подключения к области, содержащей КМ, внешнего источника промывной жидкости.

Наиболее близким техническим решением, принятым за прототип, является способ, утвержденный для работы с трупами [Методы получения максимально возможного 25 количества костного мозга и крови от трупов / П.М.Медведев, А.А.Раков, Г.А.Пафомов и др.: Метод. рек. - Ленинград, 1982. - 25 с.].

В соответствии с методом «Асептической заготовки костного мозга от трупов в 30 военно-полевых условиях» [Методы получения максимально возможного количества костного мозга и крови от трупов / П.М.Медведев, А.А.Раков, Г.А.Пафомов и др.: Метод. рек. - Ленинград, 1982. - 25 с.], миелоаспирация проводится через двухпросветный троакар аппаратом взятия и трансплантации костного мозга (АВИТ-1). По одному каналу проводится аспирация, по другому перфузия рабочим раствором. В полученном биоматериале оценивают объем, содержание ядродержащих клеток и их 35 жизнеспособность. Основным недостатком этого способа является аспирация в большей степени рабочего раствора, чем КМ [Г.И.Когут. Некоторые методические особенности получения трупного костного мозга для клинического применения // Клиническая хирургия. - 1979. - №3. - С.39-41]. К недостаткам способа относится необходимость, после сбора 15-30 мл КМ, изменять точку установки троакара, что увеличивает трудоемкость метода. Отсоединение аппарата АВИТ-1 от троакара при изменении 40 точки пункции кости делает систему открытой и увеличивает вероятность инфицирование биоматериала болезнетворными агентами.

Таким образом, для получения стерильного богатого жизнеспособными мультитипотентными мезенхимальными стромальными и гемопоэтическими прогенеторными клетками КМ от доноров-трупов требуется разработка нового способа, 45 позволяющего проводить сбор методами аспирации, аспирации-перфузии, а также их комбинированием.

Достижимым техническим результатом является обеспечение заготовки стерильного богатого жизнеспособными мультитипотентными мезенхимальными стромальными и

гемопоэтическими прогенеторными клетками КМ.

Результат достигается за счет:

- сохранения закрытой и полнокровной кровеносной системы путем выполнения сбора КМ до заготовки крови, органов, тканей, либо путем пережатия аорты и нижней полой вены во время операции органного донорства до перфузии органов консервирующим раствором, таким образом сохранения необходимого количества крови для выполнения миелоэкспузии, исключение контакта КМ с окружающей средой и консервирующим раствором. Миелоаспирация по сути - это вымывание прогенеторных клеток из ячеек губчатой кости жидкой кровью (аспирация), рабочим раствором (аспирация-промывание). В случае не пережатия сосудов, при изъятии органов кровь изливается в брюшную полость, инфицируется, просветы сосудов зияют, не позволяя создать необходимое разряжение в кости, обеспечивая сообщение инфицированной крови с костным мозгом,
- одномоментной установки троакаров в кость, таким образом обеспечения стерильности материала, поскольку в последующем не происходит открытие контура для перестановки троакаров,
- автоматизации миелоаспирации, путем заготовки биоматериала специальным разработанным устройством для сбора КМ, включающим одноразовую многоканальную стерильную закрытую систему (ОМЗС), хирургический отсос, волюметрический насос, одноразовые накопительную емкость, систему для волюметрического насоса, рабочий раствор, которые обеспечивают забор КМ методами аспирации, аспирации-вымывания, а также их комбинированием при разряжении до 1.0 Атм, с заданными и контролируемыми в реальном времени разряжением и скоростью перфузии области миелоаспирации, без открытия и разстерилизации контура при конверсии методов,
- аспирации биоматериала при разряжении 0,6 Атм, обеспечивающем значительное увеличение количества заготавливаемого биоматериала, его клеточности, при этом не значительно увеличивающем количество поврежденных клеток.

Способ осуществляется следующим образом.

- 30 Заготовка КМ и крови от трупов проводят на основании федерального закона Российской Федерации от 21.11.2011 №323-ФЗ "Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации", федерального закона Российской Федерации от 22.12.1992 №4180-1 «О трансплантации органов и (или) тканей человека». В соответствии с федеральным законом, изъятие органов и тканей осуществляется у доноров-трупов с бьющимся (находящихся в состоянии смерти мозга) и не бьющимся сердцем.

Доноры-трупы с бьющимся сердцем - доноры с констатированной смертью мозга на фоне сохраненной сердечной деятельности, подключенные к системе, обеспечивающей надлежащий уровень оксигенации тканей.

- 40 Доноры-трупы с не бьющимся сердцем - доноры с констатированной биологической смертью.

1. Оценка пригодности донора-трупа для сбора КМ.

Проводится в соответствии с действующими на территории РФ нормативно-правовыми актами.

- 45 При оценке донора-трупа изучают анамнезы жизни, болезни, описание проводившегося лечения, условия наступления и констатации смерти, проводят внешний осмотр. Донор-труп не пригоден для миелоэкспузии в случае отсутствия кровообращения более 6 часов, выявления у него онкологического, инфекционного (в последние 6 месяцев), аутоиммунного заболеваний, цирроза печени, малярии (при

наличии приступов в последние 3 года), язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки (обострения в последние 6 месяцев), острых или обострений хронических воспалительных заболеваний любой локализации (в течение последнего месяца), кожных заболеваний, психических болезней, наркомании, смерти от травмы, сопровождающейся

5 проникающими повреждениями, массивной кровопотерей, от отравления (за исключением отравления этиловым спиртом), асфиксией водой или рвотными массами.

В случае отсутствия в анамнезе, катанезе данных-противопоказаний к донорству донор-труп считается пригодным для миелоэкспфузии.

2. Подготовка донора к сбору КМ.

10 Подготовка донора к сбору КМ зависит от тактики и объема заготовки органов, тканей. Основной целью является обеспечение возможности сбора КМ. Основные задачи - определение очередности и способов забора тканей, органов, обеспечение сохранения крови в сосудах питающих КПК.

При заготовке от донора-трупа только КМ его укладывают в положение «на животе».

15 Определяют ориентиры: гребни крыльев подвздошных костей, ромб Михаэлиса, места пересечения задних подмышечных линий с гребнями КПК. Проводят антисептическую обработку кожи поясничной области, ягодиц, соответствующих боковых поверхностей тела. Стерильным операционным бельем ограничивают операционное поле над КПК по задней и боковым поверхностям тела.

20 Для миелоаспирации от донора-трупа до операции заготовки органов, других тканей его укладывают в положение «на спине». Определяют ориентиры: гребни крыльев подвздошных костей, передние-верхние ости, места пересечения средних подмышечных линий с гребнями КПК. Проводят антисептическую обработку кожи живота, верхних третей бедер, соответствующих боковых поверхностей тела. Стерильным операционным

25 бельем ограничивают операционное поле над крыльями подвздошных костей (КПК) по передней и боковым поверхностям тела.

При сборе КМ во время операции эксплантации органов или после нее КПК пунктируется из брюшной полости через лапаротомную рану, поэтому укладку донора, формирование операционного поля, доступа в брюшную полость выполняют

30 специалисты, проводящие эксплантацию органов. Для сохранения достаточного, для выполнения миелоэкспфузии, количества крови в сосудах подвздошной области и нижних конечностей, исключения попадания в нее консервирующего раствора, непосредственно перед перфузией им органов, перекрывают аорту и нижнюю полую вену дистальнее почечных сосудов наложением зажимов или лигатур.

35 Далее подготавливают устройство для сбора КМ.

3. Подготовка устройства для сбора КМ.

Устройство позволяет заготавливать стерильный КМ методами простой аспирации и аспирации-промывания, а также их комбинированием без открытия контура системы.

Устройство для сбора КМ включает:

40 1. Одноразовую многоканальную закрытую систему для сбора КМ (ОМЗС, рисунок 1) - соединенные в особом порядке узлы и пластиковые каналы. Обеспечивает стерильность биоматериала, одномоментный сбор КМ через нескольких точек пункции кости (до 4-х) методами простой аспирации, аспирации-промывания, конверсию одного метода в другой, отбор проб в процессе заготовки без открытия контура, направленный

45 ток миелоасpirата, рабочего раствора. Включает блоки:

1. Блок отвода аспирата состоит из:

1.1. 1-го узла подсоединения к модулю аспирации-накопления - порт Luer-Lock male

1.2. 1-го узла соединения каналов - Y-образный тройник

- 1.3. 2-х узлов введения препаратов и отбора проб - инъекционный порт
- 1.4. 3-х узлов перекрытия каналов - пластиковая клипса
- 1.5. 5-ти каналов соединяющие узлы - трубка ПВХ с внешним диаметром 10 мм,

толщиной стенки 1 мм.

- 5 2. 2 блока подключения к троакарам состоящие из:
 - 2.1. 2-х узлов подключения к троакарам - порт Luer-Lock male
 - 2.2. 2-х узлов соединения каналов - Y-образный тройник
 - 2.3. 2-х узлов перекрытия каналов узлов подключения к троакарам - пластиковая клипса
 - 10 2.4. 2-х каналов узлов подключения к троакарам - трубка ПВХ с внешним диаметром 10 мм, толщиной стенки 1 мм.
 - 2.5. 1-го канала основные - трубка ПВХ с внешним диаметром 10 мм, толщиной стенки 1 мм.
 - 2.6. 1-го узла перекрытия основного канала - пластиковая клипса
 - 15 3. Блок подачи рабочего раствора состоит из:
 - 3.1. 1-го узла подключения к модулю перфузии - порт Luer-Lock female
 - 3.2. 1-го узла соединения каналов - Y-образный тройник
 - 3.3. 3-х узлов перекрытия каналов - пластиковая клипса
 - 3.4. 3-х каналов соединяющие узлы - трубка ПВХ с внешним диаметром 10 мм,

20 толщиной стенки 1 мм.

2. Модуль аспирации-накопления включает соединенные накопительную емкость и хирургический отсос. Обеспечивает стерильность биоматериала, направленный ток миелоаспирата, его накопление.

- Накопительная емкость - стерильный резервуар, с портами притока и для создания разряжения, сохраняющий вакуум и стерильность биоматериала при разряжении до 1,0 Атм.

- Хирургический отсос - электрический прибор, создающий и поддерживающий разрежение до 1,0 Атм.

3. Модуль перфузии включает волюметрический насос с системой, емкость с рабочим раствором. Обеспечивает стерильность биоматериала, направленный ток рабочего раствора.

- Волюметрический насос - электрический прибор создающий положительное давление, управляющий скоростью инфузии.

- Система для волюметрического насоса - стерильная, стандартная, для используемого волюметрического насоса, система, имеющая порт подключения к пациенту в форме Luer-lock male, узел перекрытия канала.

- Емкость с рабочим раствором - емкость, содержащая стерильный изотонический раствор, смешанный с антикоагулянтом.

- Сбор и подготовку к работе устройства выполняют с сохранением стерильности компонентов:

1. Взвешивают накопительную емкость.

2. Готовят рабочий раствор - изотонический раствор смешивают с гепарином, окончательная концентрация антикоагулянта составила 25 млн.Ед./л.

3. Подготавливают ОМЗС - закрывают все узлы перекрытия каналов. Узел подключения к модулю перфузии (Рисунок 1. 3.1) соединяют с портом подключения к пациенту системы для волюметрического насоса (Luer-lock male). Узел подключения к модулю аспирации-накопления (Рисунок 1. 1.1) соединяют с портом притока накопительной емкости.

4. Подготавливают модуль перфузии - систему для волюметрического насоса устанавливают в волюметрический насос, подключают к емкости с рабочим раствором. На системе закрывают узел перекрытия канала.

5. Подготавливают модуль аспирации-накопления - к порту для создания разряжения накопительной емкости подключают хирургический отсос.

6. Заполняют устройство рабочим раствором - включают волюметрический насос модуля перфузии и настраивают на скорость перфузии 800 мл/час. Открывают узел перекрытия канала системы для волюметрического насоса, узлы на каналах ОМЗС (Рисунок 1. 1.4, 2.3, 2.6, 3.2). Рабочий раствор заполняет каналы устройства. При достижении рабочим раствором узла подключения к троакару (Рисунок 1. 2.1), на канале, идущем непосредственно к узлу (Рисунок 1. 2.4), закрывают узел перекрытия канала (Рисунок 1. 2.3). Заполняют ОМЗС рабочим раствором, закрывают все узлы перекрытия каналов ОМЗС, после чего выключают волюметрический насос.

7. Создают в устройстве рабочее разряжение - включают элетроотсос, настраивают его на создание и поддержание разряжение 0,6 Атм.

Собрав устройство и подготовив его к работе, приступают к пункции КПК и миелоаспирации.

4. Пункции крыльев подвздошных костей и сбор КМ.

Для одномоментной заготовки КМ из нескольких участков кости методами простой аспирации, аспирации-промывания в каждое КПК устанавливают по 2 троакара. Пунктируют переднюю и заднюю трети КПК. Способ пункции выбирают в зависимости от укладки донора, методики операции выполняемой до, после, параллельно миелоэкспузии:

- Чрезкожная пункция КПК в положении донора «на животе». Для пункции задней трети КПК прокол кожи выполняют в точке на 5 см кнаружи от латерального угла ромба Михаэлиса. Троакар ориентируют перпендикулярно коже, проводят через мягкие ткани до упора в кость. Прокалывают надкостницу, компактное вещество, пунктируют губчатое вещество кости. Для пункции передней трети КПК прокол кожи выполняют в точке пальпации края гребня КПК по задней подмышечной линии. Троакар проводят через мягкие ткани до упора в гребень подвздошной кости. Острием троакара огибают край гребня. Скользя острием по внутренней поверхности КПК, инструмент продвигают в направлении лобкового сочленения до упора. Прокалывают надкостницу, компактное вещество, пунктируют губчатое вещество кости.

- Чрезкожная пункция КПК в положении донора «на спине». Для пункции задней трети КПК прокол кожи выполняют в точке пальпации края гребня КПК по средней подмышечной линии. Троакар проводят через мягкие ткани до упора в кость. Острием троакара огибают край гребня. Скользя острием по внутренней поверхности КПК, инструмент продвигают в направлении крестцово-подвздошного сочленения до упора. Прокалывают надкостницу, компактное вещество, пунктируют губчатое вещество кости. Для пункции передней трети крыла подвздошной кости пальпируют переднюю верхнюю ость, по гребню смещаются на 2 см латеральнее - получают точку, в которой прокалывают мягкие ткани. Троакар устанавливают на гребне подвздошной кости перпендикулярно плоскости, прокалывают надкостницу, компактное вещество, пунктируют губчатое вещество.

- Трансабдоминальная пункция КПК в положении донора «на спине». Трансабдоминально КПК пунктируют через лапаротомную рану. В брюшной полости определяют границы подвздошных костей, больших поясничных мышц, мочеточники, крупные сосуды подвздошной области, передние верхние ости. Для пункции задней

трети КПК троакаром отмечают точку по наружному краю большой поясничной мышцы на уровне мыса крестца (promontorium). В этой точке троакаром прокалывают подвздошную мышцу. Инструмент ориентируют перпендикулярно поверхности проколотой мышцы, проводят через мягкие ткани до упора в кость. Прокалывают надкостницу, кортикальный слой кости, пунктируют губчатое вещество. Для пункции передней трети КПК прокол троакаром мягких тканей выполняют в точке пальпации передней верхней ости. Инструмент проводят по внутренней поверхности КПК вертикально вниз до упора. Прокалывают надкостницу, компактную часть кости, пунктируют губчатую кость

К троакарам по мере их установки подключают узлы подключения к троакарам ОМЗС (Рисунок 1, 2.1), на которых открывают узлы перекрытия каналов (Рисунок 1, 2.3). Сбор КМ методом простой аспирации начинается после установки первого троакара, методом аспирации-вымывания после установки двух троакаров в одну кость.

5. Сбор КМ устройством.

Сбор КМ выполняется методом простой аспирации, аспирации-промыванием или их комбинированием при разряжении 0,6 Атм. Указанное разряжение больше применяемого для миелоаспирации (0,4 Атм), однако позволяет увеличить эффективность сбора (Таблица 1). Разряжение 0,6 Атм обуславливает сбор большего объема миелоасpirата с более высокой клеточностью, тем самым увеличивает эффективность миелоаспирации в 2 раза, незначительно увеличивая количество погибших клеток.

Таблица 1

Количественные характеристики образцов КМ заготовленных при разных режимах

Режим	Объем,	Ядросодержащие клетки			ГСК (CD45 ^{low} CD34 ⁺)	
аспирации	мл	Концентрация, кл/мкл	Общее количество, ×10 ⁶	Погибшие клетки, %	Концентрация, %	Общее количество, ×10 ⁶
0,4 Атм (n=5)	148	24,12	3570	14,6	0,69	24,54
0,65 Атм (n=11)	190	35,58	6761	20,79	0,75	51,02
0,9 Атм (n=6)	98	64,94	6364	40	1,02	64,68

Способ миелоаспирации определяется в зависимости от условий кровоснабжения области, содержащей КМ:

- Сбор КМ методом простой аспирацией выполняется, если в сосудах подвздошной области и нижние конечности возможен ток крови в кость через естественные анатомические образования, то предпочтение отдают методу простой аспирации. Простая аспирация - метод сбора КМ путем создания разряжения и вымывания клеток из ячеек губчатой вещества собственной кровью из сосудов кровоснабжающих кость. Собранные прогенеторные клетки оказываются в наиболее физиологических условиях.

Для заготовки КМ методом простой аспирации открывают узлы, перекрывающие каналы блоков отвода аспирата (Рисунок 1. 1.4), подключения к троакарам (Рисунок 1. 2.3, 2.4). В процессе сбора контролируют разрежение аспирации. Миелоэксфузию проводят в течение 60 минут.

- Сбор КМ методом аспирации-промывания выполняется в случае отсутствия тока крови по сосудам, питающим кость. Аспирация-промывание - метод сбора КМ путем создания разряжения и перфузии раствора из внешнего источника в области, содержащей клетки КМ.

Для заготовки КМ методом аспирации-вымывания, открывают узлы перекрытия

каналов блоков отвода аспирата (Рисунок 1. 1.3), подачи рабочего раствора (Рисунок 1. 3.2), на каналах узлов подключения к троакарам (Рисунок 1. 2.3). В процессе сбора контролируют разрежение аспирации, скорость перфузии волюметрическим насосом 800 мл/час. Миелоэксфузию проводят в течение 60 минут.

5 - Сбор КМ комбинированием методов оптимально для большинства случаев. При комбинировании методов, сначала выполняют метод простой аспирации до значительного снижения его эффективности, затем производят конверсию в метод аспирации-промывания.

10 Для осуществления перехода от одного метода к другому (конверсии) закрывают узлы перекрытия основных каналов (Рисунок 1. 2.6) блока подключения к троакарам, открывают узлы перекрытия каналов на каналах блока подачи рабочего раствора (Рисунок 1. 3.2). Волюметрический насос перенастраивают на скорость перфузии 800 мл/час. Для конверсии аспирации-промывания в простую аспирацию выключают волюметрический насос и выполняют описанные действия в обратном порядке.

15 Для завершения сбора КМ, если был включен, выключают волюметрический насос, на ОМЗС последовательно закрывают узлы перекрытия каналов блока подачи раствора (Рисунок 1. 3.2), блока подключения к троакарам (Рисунок 1. 2.3, 2.6), блока отведения биоматериала (Рисунок 1. 1.1). Хирургический отсос настраивают на минимальное возможное для устройства разряжения, после чего его выключают. Накопительную
20 емкость отключают от ОМЗС, хирургического отсоса, порты подключения плотно закрывают. Троакары удаляют. Проколы кожи ушивают.

6. Оценка миелоаспирата.

Определяют объем биоматериала взвешиванием накопительной емкости с миелоаспирацией и вычитанием из полученного значения веса пустой емкости.

25 Полученное значение выражают в мл.

Из миелоаспирата отбирают пробу для оценки:

- Количества ядродержащих клеток. Критерий учитывает все клетки миелоаспирата, кроме эритроцитов и тромбоцитов. Выражается в количестве клеток в единице объема. Показатель позволяет косвенно судить о качестве биоматериала, так как не отражает
30 реального количества прогениторных клеток.

- Количества гемопоэтических стволовых клеток (ГСК, CD45^{low}CD34+) - новый критерий оценки КМ доноров-трупов, учитывающий клетки предшественники гемопоэза. Определяют относительное и абсолютное значения. Критерий учитывает только один тип клеток и позволяет более точно оценить качество биоматериала.

35 - Количества мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК, CD45-CD34-CD105+CD90+) - новый критерий оценки КМ, учитывающий мезенхимальные клетки предшественники. Определяют относительное и абсолютное значение. Критерий учитывает только один тип клеток и позволяет более точно оценить качество биоматериала.

40 - Количества погибших клеток (7AAD) - новый критерий оценки КМ, отражающий долю поврежденных клеток. При гибели клетки повреждается ее мембрана, краситель проникает внутрь и специфически связывается с ДНК. Определяется в процентах от общего количества клеток. Критерий учитывает только погибшие клетки и позволяет более точно оценить качество биоматериала.

45 После определения описанных показателей оценивают качество биоматериала:

- «Хорошее» качество в случае сбора ядродержащих клеток более $18,1 \times 10^6$, ГСК более $90,1 \times 10^6$, ММСК более $120,1 \times 10^6$, погибших клеток менее 19%;

- «Удовлетворительное» качество в случае сбора ядродержащих клеток $10-18 \times 10^6$,

ГСК более $40,1-90 \times 10^6$, ММСК $60,1-120 \times 10^6$, погибших клеток 20-29%;

- «Неудовлетворительное» качество в случае сбора ядродержащих клеток менее $10,0 \times 10^9$ /л, либо ГСК менее 40×10^6 , ММСК менее 60×10^6 , погибших клеток более 30%.

Биоматериал, соответствующий «хорошему» и «удовлетворительному» качеству, может быть применен в клинической практике после подтверждения его биологической безопасности. Биоматериал «неудовлетворительного» качества выбраковывается для клинического применения, но может быть использован для получения прогенеторных клеток для проведения научных исследований.

Таким образом, предложенная новая оценки биоматериала позволяет достоверно определить его качество, поскольку учитывает четыре критерия (ядросодержащие клетки, ГСК, ММСК, погибшие клетки), в большем объеме описывает клеточный состав миелоаспирата и его жизнеспособность.

Пример. Сбор КМ от донора-трупа с не бьющимся сердцем.

После обследования, признания пригодным, донора тканей направляли в операционную.

Донора укладывали в положение на спине, определяли ориентиры (гребни крыльев подвздошных костей, передние верхние ости, точку пересечения средней подмышечной линии с гребнем КПК). В соответствии с правилами асептики и антисептики подготавливали операционное поле.

Подготавливали устройство для сбора КМ: взвешивали накопительную емкость, подготавливали рабочий раствор, ОМЗС соединяли с накопительной емкостью (Fresenius Medical Care С.А.Т.С.) модуля аспирации-накопления, системой для волюметрического насоса модуля перфузии. Систему для волюметрического насоса устанавливали в прибор, подключали к емкости с рабочим раствором. Включив волюметрический насос, заполняли рабочим раствором ОМЗС. После заполнения выключали волюметрический насос, включали хирургический отсос и настраивали на разряжение 0,6 Атм.

Пункцию каждого КПК проводили в двух точках. Для пункции задней трети кожу прокалывали троакаром над гребнем крыла подвздошной кости по средней подмышечной линии. Рабочую часть троакара проводили в полость малого таза, пунктировали губчатое вещество. Пункцию передней трети выполняли на 2 см латеральнее по гребню подвздошной кости точки пальпации передней верхней ости.

После установки первого троакара начинали сбор КМ методом простой аспирации. К троакару подключали узел подключения к троакару ОМЗС (Рисунок 1. 2.1), на канале узла подключения к троакару (Рисунок 1. 2.4), на каналах по кратчайшему пути от троакара к накопительной емкости открывали узлы перекрытия канала (Рисунок 1. 1.4, 2.3, 2.6). Через узел для введения препаратов и отбора проб (Рисунок 1. 1.3), по которому протекал КМ, в биоматериал шприцем вносили 5 млн.Ед. гепарина.

Последовательно устанавливали и подключали остальные троакары. Миелоаспирацию проводили в течение 30 минут, после чего выполняли конверсию метода из простой аспирации в аспирацию-промывание. На ОМЗС закрывали узлы перекрытия основных каналов (Рисунок 1. 2.6) блока подключения к троакарам, открывали узлы перекрытия каналов (Рисунок 1. 3.2) блока подачи рабочего раствора. Включали волюметрический насос, настраивали скорость перфузии 800 мл/час.

Сбор КМ методом аспирации-промывания проводили в течении 30 минут.

В заключение операции сбора КМ выключали волюметрический насос. На ОМЗС последовательно закрывали узлы перекрытия каналов блока подачи раствора (Рисунок 1. 3.4), блока подключения к троакарам (Рисунок 1. 2.3, 2.6), блока отведения биоматериала (Рисунок 1. 1.4). Хирургический отсос настраивали на минимально

возможное для устройства разряжения, после чего его выключали. Накопительную емкость отключали от ОМЗС, хирургического отсоса, порты подключения закрывали прилагавшимися крышками.

ОМЗС отсоединяли от троакаров. Троакары удаляли, проколы кожи ушивали.

5 Накопительную емкость с биоматериалом взвешивали. Разницу веса пустой и заполненной накопительной емкости считали эквивалентной объему биоматериала.

От миелоасpirата отбирали пробы для проведения исследований. Методом проточной цитометрии в пробах оценивали концентрацию ядросодержащих клеток, гемопозитической стволовой клетки (ГСК, CD45^{low}CD34+), мультипотентной мезенхимальной стромальной клетки (ММСК, CD45-CD34-CD105+CD90+), долю погибших клеток (7AAD). Учитывая объем биоматериала, концентрацию клеток, определяли абсолютное количество ядросодержащих клеток, СКК, ММСК. Проводили оценку биоматериала. Биоматериал был признан хорошего качества.

15

Формула изобретения

1. Способ заготовки костного мозга (КМ) от доноров-трупов с бьющимся и не бьющимся сердцем, заключающийся в пункции кости и сборе КМ, отличающийся тем, что пунктируют крылья подвздошных костей (КПК) в передней и задней трети крыльев, устанавливая в каждое по два троакара, сбор КМ выполняют методом простой

20 аспирации, аспирации-промыванием или их комбинированием при разряжении 0,6 Атм, указанные приемы осуществляют при помощи устройства по п.7.

2. Способ по п.1, отличающийся тем, что сбор КМ выполняют до заготовки крови, органов, тканей, либо пережатия аорты и нижней полой вены во время операции

25 органного донорства до перфузии органов консервирующим раствором.

3. Способ по п.1, отличающийся тем, что при положении донора «на животе» выполняют чрезкожную пункцию КПК, при этом для пункции задней трети КПК прокол

30 кожи выполняют в точке на 5 см кнаружи от латерального угла ромба Михаэлиса, троакар ориентируют перпендикулярно коже, проводят через мягкие ткани до упора в кость, прокалывают надкостницу, компактное вещество, пунктируют губчатое

35 вещество кости, а для пункции передней трети КПК прокол кожи выполняют в точке пальпации края гребня КПК по задней подмышечной линии, троакар проводят через мягкие ткани до упора в гребень подвздошной кости, острием троакара огибают край гребня, скользя острием по внутренней поверхности КПК, троакар продвигают в направлении лобкового сочленения до упора, прокалывают надкостницу, компактное

4. Способ по п.1, отличающийся тем, что при положении донора «на спине» выполняют чрезкожную пункцию КПК, при этом для пункции задней трети КПК прокол

40 кожи выполняют в точке пальпации края гребня КПК по средней подмышечной линии, троакар проводят через мягкие ткани до упора в кость, острием троакара огибают край гребня, скользя острием по внутренней поверхности КПК продвигаются в направлении крестцово-подвздошного сочленения до упора, прокалывают надкостницу, компактное вещество, пунктируют губчатое вещество кости, а для пункции передней трети крыла подвздошной кости пальпируют переднюю верхнюю ость, по гребню смещаются на 2 см латеральное - получают точку, в которой прокалывают мягкие

45 ткани, троакар устанавливают на гребне подвздошной кости перпендикулярно плоскости, прокалывают надкостницу, компактное вещество, пунктируют губчатое вещество.

5. Способ по п.1, отличающийся тем, что при положении донора «на спине»

выполняют трансабдоминальную пункцию КПК, для чего КПК пунктируют через лапаротомную рану, при этом для пункции задней трети КПК троакаром отмечают точку по наружному краю большой поясничной мышцы на уровне мыса крестца (promontorium), в этой точке троакаром прокалывают подвздошную мышцу, троакаром ориентируют перпендикулярно поверхности проколотой мышце, проводят через мягкие ткани до упора в кость, прокалывают надкостницу, кортикальный слой кости, пунктируют губчатое вещество, а для пункции передней трети КПК прокол троакаром мягких тканей выполняют в точке пальпации передней верхней ости, троакаром проводят по внутренней поверхности КПК вертикально вниз до упора, прокалывают надкостницу, компактную часть кости, пунктируют губчатую кость.

6. Способ оценки заготовленного костного мозга от доноров-трупов с бьющимся и не бьющимся сердцем, включающий отбор из миелоасpirата пробы для оценки, в пробе оценивают: количество ядродержащих клеток, количество гемопоэтических стволовых клеток (ГСК, CD45^{low}CD34+), количество мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК, CD45-CD34-CD105+CD90+) и количество погибших клеток (7AAD), и в случае сбора ядродержащих клеток более $18,1 \times 10^9$ /л, ГСК более $90,1 \times 10^6$, ММСК более $120,1 \times 10^6$, погибших клеток менее 19%, оценивают заготовленный костный мозг как «хорошего» качества; в случае сбора ядродержащих клеток $10-18 \times 10^9$ /л, ГСК более $40,1-90 \times 10^6$, ММСК $60,1-120 \times 10^6$, погибших клеток 20-29% - «удовлетворительного» качества; в случае сбора ядродержащих клеток менее $10,0 \times 10^9$ /л, либо ГСК менее 40×10^6 , ММСК менее 60×10^6 , погибших клеток более 30% - «неудовлетворительного» качества.

7. Устройство для заготовки костного мозга (КМ) от доноров-трупов с бьющимся и не бьющимся сердцем, включает одноразовую многоканальную закрытую систему (ОМЗС) для сбора КМ, модуля аспирации-накопления и модуля перфузии, причем ОМЗС состоит из соединенных между собой блоков: блока отвода аспирата, двух блоков подключения к троакарам, блока подачи рабочего раствора; модуль аспирации-накопления соединен с ОМЗС посредством блока отвода аспирата, и включает соединенные между собой накопительную емкость, выполненную в виде стерильного резервуара, с портами притока и обеспечивающего создание разряжения, сохранения вакуума и стерильности биоматериала при разряжении до 1,0 Атм, а также хирургический отсос, создающий и поддерживающий разрежение до 1,0 Атм; модуль перфузии соединен с ОМЗС посредством блока подачи рабочего раствора и включает волюметрический насос, выполненный в виде электрического прибора, создающего положительное давление и управляющего скоростью инфузии, системы для волюметрического насоса, имеющей порт подключения к пациенту в форме Luer-lock male и узел перекрытия канала, а также емкости с рабочим раствором.

