



(51) МПК

G01N 33/68 (2006.01)*C12N 5/08* (2006.01)*A61K 35/36* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2004128368/15, 23.09.2004

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
23.09.2004

(43) Дата публикации заявки: 10.03.2006

(45) Опубликовано: 10.08.2006 Бюл. № 22

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: ВЛАСОВ М.Ю. Влияние внутримышечных инъекций гидроксиапатита на обмен коллагена. Вестник Самарского государственного университета. Естественнонаучная серия. №4(26), Самара, 2002, с.157-161. RU 2182018 С1, 10.05.2002. SU 1173990 А1, 23.08.1985. BEGLEY С. Т. A comparison of the biocompatibility of bone graft substitutes for human osteoblasts. J. Anal. 1993, 183, №1, p.176, реф.

Адрес для переписки:

443100, г.Самара, ул. Молодогвардейская, 225,
кв.148, В.Г. Подковкину

(72) Автор(ы):

Волова Лариса Теодоровна (RU),
Подковкин Владимир Георгиевич (RU),
Россинская Виктория Викторовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Волова Лариса Теодоровна (RU),
Подковкин Владимир Георгиевич (RU),
Россинская Виктория Викторовна (RU)

(54) СПОСОБ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ СТИМУЛЯЦИИ КОЛЛАГЕНОГЕНЕЗА БИОПЛАСТИЧЕСКИМИ МАТЕРИАЛАМИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины. Сущность способа: помещают биопластический материал в культуральную жидкость с культурой дермальных фибробластов и культивируют фибробласты вместе с биопластическим материалом в течение 4 суток, после чего производят забор культуральной жидкости и определяют в ней концентрацию белковосвязанного оксипролина. О степени стимуляции коллагеногенеза исследуемым биопластическим материалом судят по большей

или меньшей степени увеличения концентрации белковосвязанного оксипролина в забранной культуральной жидкости по сравнению с контрольной пробой. В качестве контрольной пробы используют культуральную жидкость, в которой в течение 4 суток находился исследуемый биопластический материал, но отсутствовали фибробласты. Способ прост в исполнении, позволяет количественно оценить стимуляцию коллагеногенеза биопластическими материалами без использования лабораторных животных.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)**C12N 5/08** (2006.01)**A61K 35/36** (2006.01)(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(21), (22) Application: **2004128368/15, 23.09.2004**(24) Effective date for property rights: **23.09.2004**(43) Application published: **10.03.2006**(45) Date of publication: **10.08.2006 Bull. 22**

Mail address:

**443100, g.Samara, ul. Molodogvardejskaja,
225, kv.148, V.G. Podkovkinu**

(72) Inventor(s):

**Volova Larisa Teodorovna (RU),
Podkovkin Vladimir Georgievich (RU),
Rossinskaja Viktorija Viktorovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Volova Larisa Teodorovna (RU),
Podkovkin Vladimir Georgievich (RU),
Rossinskaja Viktorija Viktorovna (RU)**(54) **METHOD FOR QUANTITATIVE EVALUATION OF STIMULATED COLLAGENOGENESIS WITH BIOPLASTIC MATERIALS**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: one should place bioplastic material in culture liquid with a culture of dermal fibroblasts to cultivate fibroblasts together with bioplastic material for 4 d, then it is necessary to sample culture liquid and detect the concentration of protein-bound hydroxyproline. One concludes upon the degree of collagenogenesis stimulation with tested bioplastic material by greater or lesser degree

of increased concentration of protein-bound hydroxyproline in sampled culture liquid against the control. As a control sample it is useful to apply culture liquid in which one could observe the tested bioplastic material for 4 d but no fibroblasts. The innovation is simple and enables to quantitatively evaluate the stimulation of collagenogenesis with bioplastic materials without applying any laboratory animals.

EFFECT: higher accuracy of evaluation.

Изобретение относится к области медицины, а именно к клинико-диагностическим исследованиям количественной оценки стимуляции коллагеногенеза биопластическими материалами.

5 Известно, что для восстановления поврежденных участков кости, реконструкции ее анатомической целостности широко используют в настоящее время биоимплантаты - пластические материалы биологического (брефоостеоматрикс, костная ткань, твердая мозговая оболочка) и неорганического происхождения (гидроксиапатит).

Преимуществом биоимплантатов являются их остеоиндуктивные свойства. В ряде экспериментальных моделей на животных показано, что их введение животным вызывает 10 стимуляцию процессов регенерации костной ткани.

Так как основным белком соединительной, в том числе и костной ткани, является коллаген, то стимуляция регенераторных процессов, с точки зрения функционального подхода, проявляется в стимуляции способности клеток соединительной ткани и костной 15 ткани синтезировать коллаген.

Известен способ количественной оценки стимуляции коллагеногенеза в эксперименте на 20 животных, осуществляемый следующим образом. Группе подопытных животных - белых беспородных половозрелых крыс - вводили аллогенный гидроксиапатит, крысам второй группы трансплантировали стерильный аллогенный деминерализованный костный матрикс (ДКМ), крысам третьей группы осуществляли одновременную трансплантацию ДКМ и гидроксиапатита, крысам четвертой группы трансплантировали ДКМ и производили инъекции аллогенного гидроксиапатита. При этом подопытных животных содержали в виварии в течение двух месяцев.

Далее забивали животных и производили у них забор крови. В плазме забранной у животных крови определяли концентрацию свободного и белковосвязанного оксипролина.

25 В крови животных второй и четвертой групп происходило увеличение концентрации белковосвязанного оксипролина, а более выраженное увеличение концентрации белковосвязанного оксипролина наблюдалось у четвертой группы по сравнению с контрольной группой животных (Власов М.Ю. Влияние внутримышечных инъекций гидроксиапатита на обмен коллагена. Вестник Самарского государственного университета. 30 Естественнонаучная серия. №4(26), Самара, 2002, с.157-161).

Данный способ выбран в качестве прототипа.

Недостатком известного способа является то обстоятельство, что с точки зрения биоэтики неправомерно производить забой подопытных животных, подвергаемых данным 35 экспериментальным исследованиям, если можно этого избежать. При этом приобретение лабораторных животных и их содержание в виварии является дорогостоящим. Кроме этого, биоимплантат, полученный из человеческой ткани и вводимый лабораторному животному, является для последнего ксеногенным.

Техническим результатом, на достижение которого направлено создание предлагаемого изобретения, является упрощение и удешевление проведения способа путем 40 биохимического определения белковосвязанного оксипролина без использования лабораторных животных.

Поставленный технический результат достигается тем, что в способе количественной оценки стимуляции коллагеногенеза биопластическими материалами, основанном на 45 определении концентрации белковосвязанного оксипролина, помещают биопластический материал, например брефоостеоматрикс, в культуральную жидкость в культуру дермальных фибробластов, культивируют фибробласты вместе с биопластическим материалом в течение 4 суток, после чего производят забор культуральной жидкости, определяют в ней концентрацию белковосвязанного оксипролина, далее по большей или 50 меньшей степени увеличения концентрации белковосвязанного оксипролина в забранной культуральной жидкости судят о степени стимуляции коллагеногенеза исследуемым биопластическим материалом.

В качестве биопластического материала также может быть использована костная ткань, полученная из кости взрослого человека, или твердая мозговая оболочка.

Способ осуществляется следующим образом.

Исследование проводят на первичной культуре дермальных фибробластов человека 4-8 пассажа. Фибробласты после пересева выращивают в культуральном флаконе площадью 25 см² в 5 мл культуральной жидкости в течение 2 суток до образования монослоя.

5 Затем, после смены культуральной жидкости на свежую на слой фибробластов помещают образец биопластического материала (например, брeфоостеоматрикса) размером 10×10×3 мм и культивируют фибробласты вместе с брeфоостеоматриksom в течение 4 суток. Одновременно такой же образец исследуемого биопластического материала помещают в другой культуральный флакон с культуральной жидкостью, но не содержащий фибробластов, на тот же срок. Данная проба служит контролем. После этого производят забор культуральной жидкости из опытного и контрольного флакона и определяют в ней концентрацию белковосвязанного оксипролина по известному методу: (Крель А.А., Фурцева Л.Н. Методы определения оксипролина в биологических жидкостях и их применение в клинической практике // Вопр. мед. химии. 1968. №6. С.635-640).

15 При увеличении концентрации белковосвязанного оксипролина в культуральной жидкости по сравнению с контрольной пробой делают вывод о способности исследуемого биопластического материала стимулировать регенерацию костной ткани. При этом чем более выражено увеличение концентрации белковосвязанного оксипролина в культуральной жидкости, тем более выражена способность исследуемого биопластического материала стимулировать регенерацию костной ткани.

20 В проведенных исследованиях наиболее значительное усиление образования белковосвязанного оксипролина вызывал брeфоостеоматрикс, меньше - костная ткань, полученная из кости взрослого человека, еще в меньшей степени - твердая мозговая оболочка.

25

Формула изобретения

Способ количественной оценки стимуляции коллагеногенеза биопластическими материалами, основанный на определении концентрации белковосвязанного оксипролина, отличающийся тем, что помещают биопластический материал в культуральную жидкость с культурой дермальных фибробластов и культивируют фибробласты вместе с биопластическим материалом в течение 4 суток, после чего производят забор культуральной жидкости, определяют в ней концентрацию белковосвязанного оксипролина, далее по большей или меньшей степени увеличения концентрации белковосвязанного оксипролина в забранной культуральной жидкости по сравнению с контрольной пробой, которая представляет собой культуральную жидкость, в которой в течение 4 суток находился исследуемый биопластический материал, но отсутствовали фибробласты, судят о степени стимуляции коллагеногенеза исследуемым биопластическим материалом.

40

45

50