

Invenția se referă la medicina regenerativă și ingineria tisulară, în special la dispozitive pentru fixarea și celularizarea grefelor de dimensiuni mici.

Este cunoscută utilizarea în practica de laborator a unor vase de cultură celulară de dimensiuni corespunzătoare pentru celularizarea unor tipuri de grefe [1], însă dezavantajul acestor vase este că grefele nu sunt fixate în ele, iar suspensia celulară, după turnarea pe greafă se poate împrăști prin vasul de cultură ducând la pierdere semnificativă de celule, astfel, reducând considerabil numărul de celule fixate în greafă.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în fixarea sigură a grefei în interiorul dispozitivului și reducerea pierderii excesive de celule în timpul turnării suspensiei celulare pe greafă, astfel crescând randamentul celularizării grefelor.

Esența invenției constă în aceea că dispozitivul pentru fixarea și celularizarea grefelor de dimensiuni mici conține un container de formă conică de tip eppendorf, în partea superioară a căruia este fixat un capac detașabil cu un orificiu central, în corpul containerului din două părți sunt amplasate opus două orificii, iar în partea inferioară a containerului este executat un orificiu străpuns, totodată în interiorul containerului este amplasat coaxial un suport detașabil de formă conică pentru grefe, orientat cu baza mică în partea de jos a containerului, cu posibilitatea trecerii prin orificiul executat în partea inferioară a containerului, diametrul extern al suportului fiind egal cu diametrul orificiului containerului, totodată lungimea suportului depășește lungimea containerului, iar toate componentele dispozitivului sunt confecționate din polipropilenă și autoclavabile.

Diametrele extern și intern al bazelor mare și mică ale suportului pot constitui 9,5 mm și 8,5 mm, corespunzător 1 mm și 0,45 mm, pentru grefe cu diametrul de 4...7 mm.

Diametrele extern și intern al bazelor mare și mică ale suportului constituie 6,5 mm și 5,5 mm, corespunzător 1,5 mm și 1 mm, pentru grefe cu diametrul de până la 4 mm.

Avantajele dispozitivului constau în posibilitatea fixării grefei în interiorul dispozitivului, ca urmare după turnarea suspensiei celulare, grefa rămâne pe loc fără riscul de a se îndoi, rupe sau detașa de dispozitiv. Totodată respectivul dispozitiv permite evitarea contactului direct al grefei cu instrumentele chirurgicale în procesul celularizării, dar și permite transplantarea directă a ei în locul necesar. De asemenea, randamentul celularizării grefei este mult mai mare deoarece suspensia celulară este concentrată la nivelul acesteia. Totodată nu trebuie de ținut cont de viteza de absorbție a lichidelor de către greafă, astfel, dispare riscul ca suspensia celulară să se împrăști prin vas. Pe lângă aceasta, dispozitivul permite implantarea grefei în locul recipientului fără ca grefa celularizată să intre în contact cu instrumentele chirurgicale. Alcătuirea acestuia dintr-un suport permite fixarea sigură a grefei și reducerea pierderii excesive de celule în timpul turnării suspensiei celulare pe greafă, astfel crescând randamentul celularizării grefelor.

De asemenea, forma conică a suportului permite expansiunea grefei spre partea mai largă a suportului când aceasta se îmbibă cu lichid. Un alt avantaj este extragerea grefei celularizate din suport fără a o deteriora, strivi sau stoarce de celulele. Aceasta poate fi făcut cu un ac, cu ajutorul căruia grefa ușor se împinge din partea bazei mici direct în locul transplantării fără implicarea altor instrumente. La rândul ei carcasa prezintă un rol de protecție pentru grefa celularizată, aceasta exclude contactul direct cu instrumentele sau a mâinilor cu grefa celularizată în timpul transportării acesteia, astfel, nu permite suportului cu materialul celularizat să fie supus unei acțiuni directe, cu risc de compresie și stoarcerea celulelor din greafă, distrugerea sau contaminarea bacteriană a acesteia.

Rezultatul constă în sporirea eficienței, siguranței și calității dispozitivului, precum și în ușurința utilizării și confecționării acestuia. Totodată dispozitivul este econom și permite celularizarea mai abundentă a grefelor, protecția materialului celularizat și transplantarea ușoară a acestuia.

Invenția se explică prin desenele din fig. 1-8, care reprezintă:

- fig. 1, vederea containerului în plan longitudinal;
- fig. 2, vederea containerului în plan transversal;
- fig. 3, vederea capacului în plan transversal;
- fig. 4, vederea capacului în plan longitudinal;
- fig. 5, suportul pentru grefe cu diametrul de 4...7 mm;
- fig. 6, suportul pentru grefe cu diametrul de până la 4 mm;
- fig. 7, dispozitivul asamblat, cu suportul pentru grefe cu diametrul de 4...7 mm;
- fig. 8, dispozitivul asamblat, cu suportul pentru grefe cu diametrul de până la 4 mm.

Prin literele grecești sunt reprezentate următoarele structuri: α – orificiul din corpul containerului, numit urechiușă; γ – orificiul străpuns în partea inferioară a containerului; β – nivelul la care diametrul extern al suportului coincide cu diametrul orificiului străpuns γ ; δ – orificiul central al capacului; μ – îngroșare circulară la extremitatea de sus a containerului; π – greafă.

Dispozitivul constă din următoarele elemente constructive: 1 – container; 2 – capac; 3 – suport pentru grefe cu diametrul de 4...7 mm; 4 – suport pentru grefe cu diametrul de până la 4 mm.

Dispozitiv pentru fixarea și celularizarea grefelor de dimensiuni mici conține un container de formă conică de tip eppendorf, în partea superioară a căruia este fixat un capac detașabil cu un orificiu central. În corpul containerului din două părți sunt amplasate opus două orificii, iar în partea inferioară a containerului este executat un orificiu străpuns.

Dispozitivul pentru fixarea și celularizarea grefelor de dimensiuni mici conține un container 1 de formă conică de tip eppendorf, carcasa căruia are înălțimea de 3,8 cm. În partea inferioară a containerului 1 este executat un orificiu străpuns γ cu diametrul de 3,7 mm. În corpul containerului 1 din două părți sunt amplasate opus două orificii α (numite urechiușe) cu diametrul de 4 mm fiecare, necesare pentru circulația aerului prin carcasa și apucarea acesteia

cu un instrument. Diametrele extern și intern al containerului 1 sunt de 10,5 mm și 9,5 mm. La extremitatea de sus containerul prezintă o îngroșare circulară μ cu diametrul extern de 12,5 mm și 1 mm grosime, aceasta fiind necesară pentru fixarea capacului 2. Capacul 2 în partea sa externă are grosimea de 1,5 mm și diametrul de 12,5 mm, precum și un orificiu central δ cu diametrul de 4 mm, necesar pentru ridicarea și aplicarea capacului 2 cu un instrument și circulația liberă a aerului. Înălțimea părții interne a capacului 2 este de 4 mm și diametrul ei extern este egal cu 9,5 mm, grosimea peretelui acesteia este egal cu 0,5 mm. În interiorul containerului 1 este amplasat coaxial un suport detașabil 3, 4 de formă conică pentru grefe, orientat cu baza mică în partea de jos a containerului 1, cu posibilitatea trecerii prin orificiul γ executat în partea inferioară a containerului 1 până la nivelul β al suportului 3, 4 unde diametrul extern al suportului este egal cu diametrul orificiului γ a containerului 1. Suportul 3, 4 are înălțimea de 4,9 cm. În dispozitivul revendicat pot fi utilizate două tipuri de suporturi, suportul 3 mai mare, pentru grefe cu diametrul de 4...7 mm, și alt suport 4 mai mic, pentru grefe cu diametrul de până la 4 mm. Suportul 3 mai mare are diametrele extern și intern al bazei mari de 9,5 și 8,5 mm, iar suportul 4 mai mic – de 6,5 și 5,5 mm. Diametrele extern și intern al bazei mici a suportului 3 sunt de 1 și 0,45 mm, iar al suportului 4 de 1,5 și 1 mm. Totodată lungimea suportului 3, 4 depășește lungimea containerului 1, iar toate componentele dispozitivului sunt confecționate din polipropilenă și autoclavabile.

Procesul de celularizare a grefei π și ulterioara ei transplantare constă din câțiva pași. Mai întâi de toate se pregătește suspensia celulară în volum corespunzător gradului de umflare a grefei π cu lichid. Containerul 1, capacul 2 și suportul 3 sau 4, care sunt împachetate și sterilizate, se introduc în hota cu flux laminar de aer și se despachetează. În condiții sterile cu un instrument de la containerul 1 se scoate capacul 2, apucând de marginea orificiului δ , care se pune de o parte, iar containerul 1 se introduce într-un stativ înalt pentru eppendorfe. Cu alt instrument se apucă suportul dorit 3 sau 4 și se introduce în container 1. Acesta va migra în jos prin orificiul γ din partea de jos al containerului 1 până la nivelul β unde diametrul extern al suportului 3 sau 4 va fi egal cu diametrul acestui orificiu. După care cu un instrument grefa π se introduce în suport 3 sau 4. Cu o pipetă suspensia celulară și se toarnă pe suprafața grefei π , după care se aplică capacul 2 pe containerul 1. Cu alt instrument steril se apucă carcasa containerului 1 de una din urechiușe α și se introduce într-o eprubetă sterilă de 15 ml. Aceasta la rândul ei cu capacul întredeschis se pune într-un stativ și se incubează la 37°C, 5% CO₂ pentru o perioadă de 60...180 min. După scurgerea perioadei de timp necesare fixării celulelor de grefa π , eprubeta se scoate din incubator și se duce direct în sala de operație. Dispozitivul (fig. 7 sau 8) cu grefa π celularizată se extrage în condiții sterile din eprubetă prin răsturnarea acesteia pe masa de operații, după care cu un instrument se scoate suportul 3 sau 4 cu grefa π celularizată din container 1, apoi suportul 3 sau 4 se aduce cu baza mare spre locul unde este necesară transplantarea. La necesitate suportul 3 sau 4 se secționează transversal cu o foarfecă în partea lui de jos, mai subțire, pe unde cu un ac sau o broșă sterilă, grefa π celularizată se împinge în locul recipient.

Exemplul 1

În ziua când celulele predestinate transplantării au ajuns la confluența de 70...90% s-au tripsinizat și $3 \times 10^6 \pm 3 \times 10^5$ celule s-au resuspendat în 50 μ l de mediu de nutriție. Apoi, de asemenea în condiții sterile, utilizând instrumente chirurgicale, grefa π obținută din os spongios demineralizat de iepure cu înălțimea de 5 mm și diametrul de 3,7 mm s-a introdus în suportul 4 pentru grefe cu diametrul de 4...7 mm. După care cu o pipetă suspensia celulară s-a turnat peste grefa π . Suportul 4 cu grefa π s-a introdus în container 1 după care s-a pus capacul 2 ținând de marginea orificiului δ . Dispozitivul (fig. 8) cu grefa π în curs de celularizare s-a introdus într-o eprubetă de 15 ml și s-a pus într-un stativ, după care s-a incubat cu capacul eprubetei întredeschis la 37°C, 5% CO₂ timp de 100 minute. În timpul intervenției chirurgicale când este necesară grefa π celularizată, eprubeta s-a scos din incubator, s-a închis capacul 2 și s-a dus în sala de operație. În sală s-a scos capacul eprubetei și dispozitivul (fig. 8) cu grefa π celularizată s-a răsturnat pe masa sterilă. Cu un instrument chirurgical se ținea carcasa de orificiul α și s-a scos capacul 2 apucând de marginea orificiului δ . Cu alt instrument s-a scos suportul 4 cu grefa π din container 1. Suportul 4 cu grefa π celularizată ținut cu un instrument, s-a îndreptat cu baza mare spre locul unde este necesară transplantarea. Suportul 4 s-a secționat cu o foarfecă în partea sa mai îngustă. După care cu un ac de seringă s-a împins grefa π celularizată în locul necesar. Apoi suportul 4 s-a introdus într-o eprubetă de 15 ml cu 5 ml de mediu nutritiv de temperatura camerei și s-a incubat cu capacul întredeschis la 37°C, 5% CO₂. Peste o oră s-au numărat celulele restante spălate de pe suport 4. Viabilitatea celulelor s-a evaluat la colorarea cu albastru de tripan. S-au obținut $2,3 \times 10^5 \pm 5 \times 10^4$ celule cu o viabilitate de 92,7%. Respectiv, au fost transplantate aproximativ 92% din celule. Acest dispozitiv se utilizează în Laboratorul de Inginerie Tisulară și Culturi Celulare pentru celularizare grefelor utilizate în transplantare la animale.