

Invenția se referă la medicina regenerativă și ingineria tisulară, și poate fi utilizată pentru reticularea matricei hepatice decelularizate pentru creșterea rezistenței transplantului la factorii agresivi interni ai organismului recipient. Procedeele cunoscute de decelularizare al ficatului în mare parte utilizează diverși detergenți, în special sodium dodecil sulfat (Mariana Jian, Vitalie Cobzac, Ivan Moghildea, Victor Popescu, Viorel Nacu. Techniques of liver decellularization. In: Moldovan Medical Journal, no. 61(4), 2018, p. 21-24, ISSN 2537-6373; Thomas Shupe, Matthew Williams, Alicia Brown, Bradley Willenberg, Bryon E. Petersen. Method for the decellularization of intact rat liver. In: Orgogenesis, no 6(2), 2010, p. 134-136), acesta făcând matricea decelularizată mai rigidă și mai casantă, ce duce la ruperea ulterioară a acesteia cu eșuarea procesului de recelularizare și transplantare, soldat cu pierderi mari de timp și bani. Totodată, matricele hepatice decelularizate în urma transplantării, fiind structuri străine ale organismului-gazdă, sunt atacate de către factorii agresivi interni ai acestuia, dar și de acțiunea fizică a țesuturilor înconjurătoare (Ping Zhou, Nataly Lessa, Daniel C. Estrada, Ella B. Severnson, Shilpa Lingala, Mark A. Zern, Jan A. Nolte, Jian Wu. Decellularized Liver Matrix as a Carrier for Transplantation of Human Fetal and Primary Hepatocytes in Mice In: Liver Transplantation. No 17(4), 2011, p. 418-427, doi: 10.1002/lt.22270; Ming Xi Pan, Peng Yun Hu, Yuan Cheng, Li Quan Cai, Xiao Hui Rao, Yan Wang, Yi Gao. An efficient method for decellularization of the rat liver. In: Journal of the Formosan Medical Association. No 113(10), 2014, p. 680-687, <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2013.05.003>).

Este cunoscută metoda de reticulare a matricei hepatice decelularizate cu riboflavină și razele UV-A [1].

Dezavantajul acestei metode constă în aceea că nu are loc perfuzia continuă a matricei hepatice decelularizate cu un volum de soluție de riboflavină raportat la masa umedă a matricei hepatice decelularizate, ceea ce reprezintă un proces pasiv, prin care riboflavina în timpul expunerii la razele UV-A nu asigură o saturare deplină a matricei hepatice decelularizate, ca urmare nu are loc reticularea uniformă.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unui procedeu, care permite reducerea gradului de rigiditate a matricei hepatice decelularizate, obținut în urma acțiunii detergenților, ca urmare aceasta devine mai rezistentă și nu se rupe în timpul manipularilor, crește rezistența matricei recelularizate la factorii agresivi interni ai organismului după transplantare și este un proces activ ce asigură o saturare uniformă a întregii matrici hepatice decelularizate cu un volum de soluție raportat la masa acesteia în timpul acțiunii razelor UV-A.

Esența invenției constă în aceea că matricea hepatică decelularizată se spală de detergenți prin perfuzie cu apă distilată și/sau soluție tampon fosfat salin prin vena portă, apoi peste 1 oră se efectuează perfuzia continuă cu soluție apoasă sau alcoolică de riboflavină cu concentrația de 0,2...0,25 mM, în volum de 10 ml la 100 mg de matrice hepatică decelularizată, cu viteza de 1...5 ml/min, sub acțiunea razelor ultraviolete de tip A, cu lungimea de undă de 365 nm, iar perfuzia se prelungește până la decolorarea soluției de riboflavină, apoi matricea hepatică decelularizată reticulată se spală cu apă distilată și se păstrează la temperatura de 4°C.

Avantajele procedurii constau în prevenirea deteriorării matricei hepatice decelularizate, creșterea rezistenței la factorii agresivi interni ai organismului recipient după transplantare, o saturare deplină a matricei hepatice decelularizate și o reticulare uniformă.

Rezultatul constă în prezervarea unei cantități mari de resurse ca timpul, reactive și donatori, deoarece matricea devine mai rezistentă, experimentul sau intervenția chirurgicală de transplantare a ficatului recelularizat poate decurge mai sigur, fără riscul ca matricea să se deterioreze.

Realizarea procedurii este prezentată în figurile care urmează:

- fig. 1, perfuzia matricei hepatice decelularizate cu soluție apoasă sau alcoolică de riboflavină sub acțiunea razelor UV-A;
- fig. 2, reperfuzia matricei hepatice decelularizate cu soluție apoasă sau alcoolică de riboflavină sub acțiunea razelor UV-A.

Prin litere grecești sunt prezentate următoarele structuri: α - razele UV-A; β - direcția de pompare; δ - locul trecerii furtunului în vena portă; μ - capătul de furtun aferent pompei peristaltice.

Procedeu descris se realizează cu ajutorul următoarelor elemente: 1 - lampa UV; 2 - vas cu matricea hepatică decelularizată; 3 - furtun pentru perfuzia ficatului; 4 - matrice hepatică decelularizată; 5- vena portă; 6 - pompa peristaltică; 7 - filtru de seringă de 0,22 μ m; 8 - soluția apoasă sau alcoolică de riboflavină; 9 - vas cu soluție apoasă sau alcoolică de riboflavină.

Procedeu de reticulare a matricei hepatice decelularizate 4 cu riboflavină și raze UV-A α constă în perfuzia continuă a matricei hepatice decelularizate 4 cu o soluție apoasă sau alcoolică de riboflavină 8 cu concentrația de 0,2...0,25 mM, în volum de 10 ml la 100 mg masă umedă, cu viteza de 1...5 ml/min prin furtunul 3 atașat la filtrul de seringă 7 de 0,22 μ m. După terminarea soluției de riboflavină din vasul 9, capătul de furtun μ aferent pompei peristaltice 6 se introduce în vasul 2 cu matricea decelularizată 4 pentru reciclarea soluției 8, care durează până soluția apoasă sau alcoolică de riboflavină 8 nu se decolorează.

Procedeu se realizează în modul următor.

După decelularizarea completă a unui ficat, acesta se spală continuu de detergenți prin perfuzie cu apă distilată sau/și soluție tampon fosfat salin prin vena portă 5. Peste 1 oră după spălare matricea hepatică decelularizată 4 se introduce în alt vas și se cântărește, se pregătește soluția apoasă sau alcoolică de riboflavină 8 cu concentrația de 0,2...0,25mM pentru masa umedă cântărită, în volum de 10 ml la 100 mg în vasul de sticlă întunecată 9. Cu o seringă prin vena portă 5 se injectează încet în matricea hepatică decelularizată 4 soluție de riboflavină 8 până aceasta se colorează în întregime. Apoi matricea se schimbă în alt vas 2. Furtunul 3 dotat cu filtrul 7 de 0,22 μ m se

conectează la vena portă 5. Se include pompa peristaltică 6 la o viteză de 1...5 ml/min și lampa UV 1. După ce soluția apoasă sau alcoolică de riboflavină 8 pregătită în vasul cu sticlă întunecată 9 se termină, capătul de furtun μ aferent pompei peristaltice 6 se introduce în vasul 2 cu matricea hepatică decelularizată 4 pentru reciclarea soluției. Reticularea cu raze UV-A α are loc până când soluția apoasă sau alcoolică de riboflavină pregătită se decolorează. După reticulare, matricea hepatică decelularizată 4 se spală de soluția apoasă sau alcoolică de riboflavină prin perfuzie cu apă distilată până aceasta se decolorează. După decolorarea maximal posibilă matricea hepatică decelularizată 4 se păstrează în frigider la temperatura de 4°C sau se utilizează după necesitate.

Exemplul 1

După decelularizarea unui ficat de șobolan rasa Wistar, matricea hepatică 4 obținută s-a perfuzat prin vena portă 5, pentru a fi spălată de rămășițele de detergenți cu 500 ml de apă distilată și 500 ml de soluție tampon fosfat salin. Peste 1 oră după spălare, matricea hepatică decelularizată 4 s-a introdus în alt vas în care s-a cântărit și s-a determinat 2,2 g de masă umedă. În vasul de sticlă întunecată 9 s-au pregătit 220 ml de 0,25 mM de soluție apoasă de riboflavină 8, după care cu o seringă s-a injectat prin vena portă 5 în matricea hepatică decelularizată 4, soluția apoasă de riboflavină 8 până când ficatul s-a colorat complet în culoare brună deschis. Apoi matricea hepatică decelularizată 4 s-a introdus în vasul 2, s-a conectat furtunul 3 cu filtrul 7 de 0,22 μ m la vena portă 5, s-a inclus lampa UV 1. După conectarea lampei UV 1 cu raze ultraviolete de tip A, cu lungimea de undă de 365 nm s-a pornit pompa peristaltică 6 cu viteza de 2 ml/min. După ce matricea decelularizată 4 s-a perfuzat cu soluție apoasă de riboflavină 8 pregătită în vasul din sticlă întunecată 9, capătul de furtun μ aferent pompei peristaltice 6 s-a introdus în soluția apoasă de riboflavină 8 acumulată în vasul 2 pentru reciclare. După 360 min de acțiune a razelor ultraviolete de tip A α , lampa UV 1 s-a deconectat, s-a început perfuzia matricei hepatice decelularizate 4 cu 800 ml de apă distilată cu viteza de 4 ml/min pentru a spăla matricea hepatică 4 de rămășițele de soluție apoasă de riboflavină 8. După spălare, matricea hepatică decelularizată 4 s-a plasat în frigider la temperatura de 4°C.