

# РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



## ПАТЕНТ

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2742754

### СПОСОБ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СКАФФОЛДА ИЗ СПЛАВА ТИТАНА С ЗАСЕЛЕННОЙ КУЛЬТУРОЙ КЛЕТОК В НИЖНЮЮ ЧЕЛЮСТЬ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ МЫШЕЙ

Патентообладатель: *федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр онкологии" Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *см. на обороте*

Заявка № 2020132530

Приоритет изобретения 30 сентября 2020 г.

Дата государственной регистрации в

Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 10 февраля 2021 г.

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает 30 сентября 2040 г.

Руководитель Федеральной службы  
по интеллектуальной собственности

Г.П. Ивлиев





ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

G09B 23/28 (2020.08)

(21)(22) Заявка: 2020132530, 30.09.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
30.09.2020

Дата регистрации:  
10.02.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 30.09.2020

(45) Опубликовано: 10.02.2021 Бюл. № 4

Адрес для переписки:

344037, г. Ростов-на-Дону, 14-я линия, 63,  
НМИЦ онкологии, Ишониной О.Г.

(72) Автор(ы):

Месхи Бесарион Чохоевич (RU),  
Кит Олег Иванович (RU),  
Воловик Вячеслав Георгиевич (RU),  
Кононенко Владимир Иванович (RU),  
Енгибарян Марина Александровна (RU),  
Волкова Виктория Львовна (RU),  
Аединова Ирина Валентиновна (RU),  
Максимов Алексей Юрьевич (RU),  
Гончарова Анна Сергеевна (RU),  
Лукбанова Екатерина Алексеевна (RU),  
Чапек Сергей Васильевич (RU),  
Заикина Екатерина Владиславовна (RU),  
Ткачев Сергей Юрьевич (RU),  
Волкова Анастасия Владимировна (RU),  
Ходакова Дарья Владиславовна (RU),  
Миндарь Мария Вадимовна (RU)

(73) Патентообладатель(и):

федеральное государственное бюджетное  
учреждение "Национальный медицинский  
исследовательский центр онкологии"  
Министерства здравоохранения Российской  
Федерации (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
о поиске: RU 2727868 C1, 24.07.2020. RU  
2713798 C1, 07.02.2020. Митрошин А. Н. и др.  
Современные представления о применении  
скаффолдов в регенеративной медицине (обзор  
литературы) // Известия ВУЗов. Поволжский  
регион. Медицинские науки. 2019. N2 (50), с.  
133-143. Li J, Wen J, Li B, Li W, Qiao W, Shen  
J, Jin W, Jiang X, Yeung KWK, Chu PK. Valence  
State (см. прод.)

(54) СПОСОБ ТРАНСПЛАНТАЦИИ СКАФФОЛДА ИЗ СПЛАВА ТИТАНА С ЗАСЕЛЕННОЙ КУЛЬТУРОЙ КЛЕТОК В НИЖНЮЮ ЧЕЛЮСТЬ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ МЫШЕЙ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальной онкологии, и может быть использовано для трансплантации скаффолда из

сплава титана с заселенной культурой опухолевых клеток в нижнюю челюсть иммунодефицитных мышей для получения ортотопической модели

опухолевого процесса в костях и мягких тканях нижнечелюстной и шейной области. Способ включает наркоз иммунодефицитных мышей, рассечение кожи и мышц нижней челюсти, послойное ушивание послеоперационной раны. Разрез кожи производят параллельно телу нижней челюсти на протяжении 15 мм. Начало разреза расположено на средней линии тела на расстоянии 5 мм от нижней губы. Отодвигая анатомическим пинцетом подкожную мышцу шеи, осуществляют тупое выделение жевательной мышцы, которую рассекают параллельно телу нижней челюсти. При помощи хирургического бура производят повреждение надкостницы и верхнего слоя костной ткани тела нижней челюсти диаметром 2 мм и глубиной 1 мм в области жевательного гребня. Прошивают лигатурой скаффолд из

сплава титана с заселенной культурой опухолевых клеток и обвивают этой же лигатурой тело нижней челюсти. Завязывают узел, сшивают разрезанную жевательную мышцу одним узловым швом, ушивают послеоперационную рану непрерывным швом. Способ обеспечивает создание адекватной клинической картины туморогенеза, позволяет создать ортотопическую модель злокачественного роста в костях и мягких тканях нижнечелюстной и шейной области, трансплантируя опухолевые клетки в костную ткань, и исключает элиминацию опухолевого материала, создавая оптимальные условия для роста имплантируемых клеток за счет использования скаффолда из сплава титана с заселенной культурой опухолевых клеток. 5 ил.

(56) (продолжение):

Manipulation of Cerium Oxide Nanoparticles on a Titanium Surface for Modulating Cell Fate and Bone Formation. Adv Sci (Weinh). 2017 Dec 18;5(2):1700678. doi: 10.1002/advs.201700678. PMID: 29610729; PMCID: PMC5827567. Cao H, Feng L, Wu Z, Hou W, Li S, Hao Y, Wu L. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on the biological behavior of osteoblasts on porous titanium alloy scaffolds: An in vitro and in vivo study. Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2017 Nov 1;80:7-17. doi: 10.1016/j.msec.2017.05.078. Epub 2017 May 19. Erratum in: Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. 2018 Jan 1;82:384. PMID: 28866219.



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

**(12) ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

*G09B 23/28 (2020.08)*(21)(22) Application: **2020132530, 30.09.2020**(24) Effective date for property rights:  
**30.09.2020**Registration date:  
**10.02.2021**

Priority:

(22) Date of filing: **30.09.2020**(45) Date of publication: **10.02.2021** Bull. № 4

Mail address:

**344037, g. Rostov-na-Donu, 14-ya liniya, 63,  
NMITS onkologii, Ishoninoj O.G.**

(72) Inventor(s):

**Meskhi Besarion Chokhovich (RU),  
Kit Oleg Ivanovich (RU),  
Volovik Vyacheslav Georgievich (RU),  
Kononenko Vladimir Ivanovich (RU),  
Engibaryan Marina Aleksandrovna (RU),  
Volkova Viktoriya Lvovna (RU),  
Aedinova Irina Valentinovna (RU),  
Maksimov Aleksej Yurevich (RU),  
Goncharova Anna Sergeevna (RU),  
Lukbanova Ekaterina Alekseevna (RU),  
Chapek Sergej Vasilevich (RU),  
Zaikina Ekaterina Vladislavovna (RU),  
Tkachev Sergej Yurevich (RU),  
Volkova Anastasiya Vladimirovna (RU),  
Khodakova Darya Vladislavovna (RU),  
Mindar Mariya Vadimovna (RU)**

(73) Proprietor(s):

**federalnoe gosudarstvennoe byudzhetnoe  
uchrezhdenie "Natsionalnyj meditsinskij  
issledovatel'skij tsentr onkologii" Ministerstva  
zdravookhraneniya Rossijskoj Federatsii (RU)**

**(54) METHOD FOR SCAFFOLD TRANSPLANTATION FROM TITANIUM ALLOY WITH A POPULATED CELL CULTURE INTO THE LOWER JAW OF IMMUNODEFICIENT MICE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention refers to medicine, namely to experimental oncology, and can be used for transplantation of scaffold of titanium alloy with populated culture of tumor cells in lower jaw of immunodeficient mice for obtaining orthotopic model of tumor process in bones and soft tissues of mandibular and cervical region. Method involves anesthesia of immunodeficient mice, a skin and mandibular muscle dissection, a layer-by-layer repair of a postoperative wound. Skin incision is made parallel to the mandible body for 15 mm. Beginning of incision is located on middle line of body at distance of 5 mm from lower lip. Anatomical tweezers of the subcutaneous muscle of the

neck is moved aside, a blunt excision of the mastication muscle is performed, which is dissected parallel to the lower jaw body. Periosteum and an upper layer of bone tissue of the mandibular body with diameter of 2 mm and depth of 1 mm within the chewing crest are damaged by a surgical bore. Scaffold of titanium alloy with a populated culture of tumor cells is ligated with a ligature of the lower jaw. Knot is fastened, the cut down chewing muscle is sutured one interrupted suture, the postoperative wound is closed with a continuous suture.

EFFECT: method provides creating an adequate clinical picture of tumorigenesis, enables to create an orthotopic model of malignant growth in bones and soft

tissues of the mandibular and cervical region, transplanting tumor cells into bone tissue, and eliminates tumor tissue elimination, creating optimal conditions for growth of implanted cells due to use of

scaffold of titanium alloy with populated culture of tumor cells.  
1 cl, 5 dwg

R U 2 7 4 2 7 5 4 C 1

R U 2 7 4 2 7 5 4 C 1

Изобретение относится к медицине, а именно к экспериментальной онкологии, и касается способа трансплантации скаффолда из сплава титана с заселенной культурой опухолевых клеток в нижнюю челюсть иммунодефицитных мышей для получения ортотопической модели опухолевого процесса в костях и мягких тканях нижнечелюстной и шейной области, позволяющей наиболее адекватно повторить клиническую картину туморогенеза.

Достижением последних десятилетий в клинической практике является трансплантация тканей и органов, выращенных из культур клеток на специальных подложках - скаффолдах. Данный способ считается более совершенным по сравнению с имплантацией эндопротезов, не способных к сращиванию с окружающими тканями. Соответствие характеристик трансплантируемых клеток микроокружению в организме реципиента и форма имплантата, организованная при помощи скаффолда, позволяют ему максимально точно повторить восполняемый орган или его часть. Скаффолды благодаря своей пористой структуре способны надежно закрепляться выращиваемым на них клеткам, а также окружающей ткани реципиента, в том числе и костной, которая врастает в поровое пространство (см. Vacanti J.P., Vacanti C.A. The history and scope of tissue engineering, in principles of tissue engineering // Academic Press. - 2000. - P. 3-8).

Подобные конструкции должны обладать определенной внешней формой и внутренней структурой (см. Yang S., Leong K.F., Du Z., Chua C.K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. traditional factors // Tissue Eng. - 2001. - 7(6). - P. 679-689; см. Hollister S., Lin C., Saito E., Schek R., Taboas J., Williams J. Engineering craniofacial scaffolds // Orthod Craniofac Res. -2005. - 8(3). - P. 162-173).

Существует опыт применения имплантатов из керамики и полимеров (см. Chang B.S., Lee C.K., Hong K.S., Youn H.J., Ryu H.S., Chung S.S. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations // Biomaterials. - 2000. - 21(12). - P. 1291-1298; см. Nagashima T., Ohshima Y., Takeuchi H. Osteoconduction in porous hydroxyapatite ceramics grafted into the defect of the lamina in experimental expansive open-door laminoplasty in the spinal canal // Nippon Seikeigekagakkai Zasshi. - 1995. - 69(4). - P. 222-230). Однако они не обладают достаточной жесткостью и могут легко трансформироваться (см. Kalita S.J., Bose S., Hosick H.L., Bandyopadhyay A. Development of controlled porosity polymer-ceramics composite scaffolds via fused deposition modeling // Mater Sci Eng (C). - 2003. - 23. - P. 611-620; см. Zhang R., Ma P.X. Poly(a-hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone-tissue engineering. I. Preparation and morphology // J Biomed Mater Res. - 1999. - 44. - P. 446-155).

По этой причине наиболее распространенными материалами для скаффолдов и эндопротезов являются сплавы из титана (см. Lueck R.A., Galante J.O., Rostoker W., Ray R.D. Development of an open pore metallic implant to permit attachment to bone // Surg Forum. - 1969. - 20. - P. 456-457; см. Welsh R.P., Pilliar R.M., Macnab I. Surgical implants. The role of surface porosity in fixation to bone and acrylic // J Bone J Surg Am. - 1971. - 53(5). - P. 963-977.).

Титановые сплавы обладают значительными преимуществами благодаря их механическим свойствам в сравнении с другими металлами, высокому индексу прочности, их химической инертности, коррозионной стойкости и совместимостью с живыми тканями (см. Liu X.Y., Chu P.K., Ding C.X. Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications // Mater Sci Eng R Rep. - 2004. - 47: 49e121; см. Geetha M., Singh A.K., Asokamani R., Gogia A.K. Ti based biomaterials, the ultimate choice for orthopaedic implants e a review // Prog Mater Sci. - 2009. - 54: 397e425).

Исследования in vitro биосовместимости титановых подложек показали не только их нетоксичность, но и положительное влияние на клетки: клеточную адгезию, пролиферацию, дифференциацию и миграцию (см. Lia J.P., Wijna J.R., Blitterswijk C.A.,

Groota K. Porous Ti6Al4V scaffold directly fabricating by rapid prototyping: Preparation and in vitro experiment // *Biomaterials*. - 2006. - 27. - P. 1223-1235).

Известен способ трансплантации крысам скаффолдов из ТА6V, содержащего костные морфогенетические белки BMP-2 и культуру миобластов C2C12, между мышцами и апоневротическим слоем (см. Guillot R., Gilde F., Becquart P., Sailhan F., Lapeyriere A., Logeart-Avramoglou D., Picart C. The stability of BMP loaded polyelectrolyte multilayer coatings on titanium // *Biomaterials*. - 2013. - 34: 5737e5746). Преимуществом этого способа является покрытие скаффолда костными морфогенетическими белками, вызывающими остеиндукцию. Недостатком метода является имплантация скаффолда в мышечном слое без какого-либо закрепления, из-за чего трансплантант может во время мышечной работы перемещаться, вызывая болевые ощущения и мешая быстрому заживлению послеоперационной раны и сращению с окружающими тканями.

Известен способ трансплантации скаффолда цилиндрической формы с первичными мышинными остеобластами MC3T3-E1 в просверленное отверстие диафизарной части бедренной кости кролика (см. Fu Q., Hong Y., Liu X., Fan H., Zhang X. A hierarchically graded bioactive scaffold bonded to titanium substrates for attachment to bone // *Biomaterials*. - 2011. - 32. - 7333e7346). Преимущество данного способа заключается в надежной фиксации скаффолда. Данная модель наиболее проста и не способна продемонстрировать тканезамещение в наиболее сложных по форме костях.

Известен способ трансплантации скаффолда с заселенными мышинными остеобластами MC3T3-E1 в нижнюю челюсть кроликов, в которой предварительно был сделан прямоугольный дефект (см. Cao H., Feng L., WuaZh., Houb W., Li Sh., Hao Y., Wua L. Effect of low-intensity pulsed ultrasound on the biological behavior of osteoblasts on porous titanium alloy scaffolds: An in vitro and in vivo study // *Materials Science and Engineering*. - 2017. - C 80. - P. 7-17; Feng L., Liu X., Cao H., Qin L., Hou W., Wu L. A Comparison of 1- and 3.2-MHz Low-Intensity Pulsed Ultrasound on Osteogenesis on Porous Titanium Alloy Scaffolds An In Vitro and In Vivo Study // *J Ultrasound Med*. - 2019. - 38. - P. 191-202). При этом скаффолд вкладывался в полученное углубление кости без закрепления, что является ненадежным способом фиксации имплантируемого материала.

Существенным недостатком перечисленных выше способов является создание либо аллогенной модели, либо ксеногенной, но с мышинными клетками, а не человеческими. Подобные модели не способны адекватно отражать процессы, протекающие в организме человека. Эту задачу способны решать ксеногенные модели с использованием скаффолдов и человеческих культур клеток, в том числе и опухолевых - с целью моделирования опухолевого процесса в различных тканях.

Техническим результатом предлагаемого изобретения является разработка способа трансплантации скаффолда из сплава титана с заселенной культурой опухолевых клеток в нижнюю челюсть иммунодефицитных мышей для получения ортотопической модели опухолевого роста в костях и мягких тканях нижнечелюстной и шейной области мышей, наиболее адекватно отражающей клиническую картину развития злокачественных новообразований в данной анатомической области у человека.

Технический результат изобретения достигается тем, что разрез кожи производят параллельно телу нижней челюсти на протяжении 15 мм, начало разреза расположено на средней линии тела на расстоянии 5 мм от нижней губы, отодвигая анатомическим пинцетом подкожную мышцу шеи, осуществляют тупое выделение жевательной мышцы, которую рассекают параллельно телу нижней челюсти, при помощи хирургического бура производят повреждение надкостницы и верхнего слоя костной ткани тела нижней челюсти диаметром 2 мм и глубиной 1 мм в области жевательного гребня, прошивают

лигатурой скаффолд из сплава титана с заселенной культурой опухолевых клеток и обвивают этой же лигатурой тело нижней челюсти, завязывают узел, сшивают разрезанную жевательную мышцу одним узловым швом, ушивают послеоперационную рану непрерывным швом.

5 Способ осуществляют следующим образом.

Предварительно скаффолд заселяют необходимой культурой опухолевых клеток человека, после чего инкубируют в стандартных условиях (в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре плюс 37°C).

10 Реципиентами опухолевого материала являются иммунодефицитные мыши Balb/c Nude.

Для осуществления трансплантации животных вводят в наркоз. Для этого используют в качестве премедикации ксилазин концентрацией 20 мг/мл. Мышей наркотизируют при помощи золетила концентрацией 22,57 мг/мл.

15 Для обеспечения доступа к нижней челюсти делают разрез кожи параллельно телу нижней челюсти на протяжении 15 мм. Разрез начинается на средней линии тела на расстоянии 5 мм от нижней губы. Отодвигая анатомическим пинцетом подкожную мышцу шеи, осуществляют тупое выделение жевательной мышцы. Последнюю рассекают параллельно телу нижней челюсти. С помощью хирургического бура повреждают надкостницу и верхний слой костной ткани тела нижней челюсти диаметром 2 мм и  
20 глубиной 1 мм в области жевательного гребня. Скаффолд из сплава титана с заселенной культурой опухолевых клеток прошивают лигатурой, которой также обвивают тело нижней челюсти, завязывают узел. Разрезанную жевательную мышцу сшивают одним узловым швом. Послеоперационную рану ушивают непрерывным швом.

Изобретение иллюстрируется фигурами (1-7).

25 На Фиг. 1 изображено повреждение надкостницы и верхнего слоя костной ткани тела нижней челюсти иммунодефицитной мыши Balb/c Nude при помощи хирургического бура.

На Фиг. 2 показано обвитие лигатурой тела нижней челюсти иммунодефицитной мыши Balb/c Nude.

30 На Фиг. 3 изображено расположение скаффолда из сплава титана с заселенной культурой опухолевых клеток на нижней челюсти иммунодефицитной мыши Balb/c Nude.

На Фиг. 4 изображена фиксация скаффолда из сплава титана с заселенной культурой опухолевых клеток на теле нижней челюсти иммунодефицитной мыши Balb/c Nude при  
35 помощи лигатуры.

На Фиг. 5 показано ушивание жевательной мышцы иммунодефицитной мыши Balb/c Nude.

На Фиг. 6 изображено ушивание послеоперационной раны у иммунодефицитной мыши Balb/c Nude.

40 На Фиг. 7 изображен финальный вид иммунодефицитной мыши Balb/c Nude после трансплантации скаффолда из сплава титана с заселенной культурой опухолевых клеток.

Данным способом произведена трансплантация скаффолдов из сплава титана с заселенной культурой опухолевых клеток в нижнюю челюсть 30 иммунодефицитным мышам Balb/c Nude.

45 Приводим пример применения способа.

Данным способом была прооперирована самка мыши линии Balb/c Nude возрастом 7 недель массой 23 г.

Скаффолд заселили культурой клеток остеосаркомы человека HOS, после чего

инкубировали их в стандартных условиях (в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при температуре плюс 37°C) в течение 3 суток.

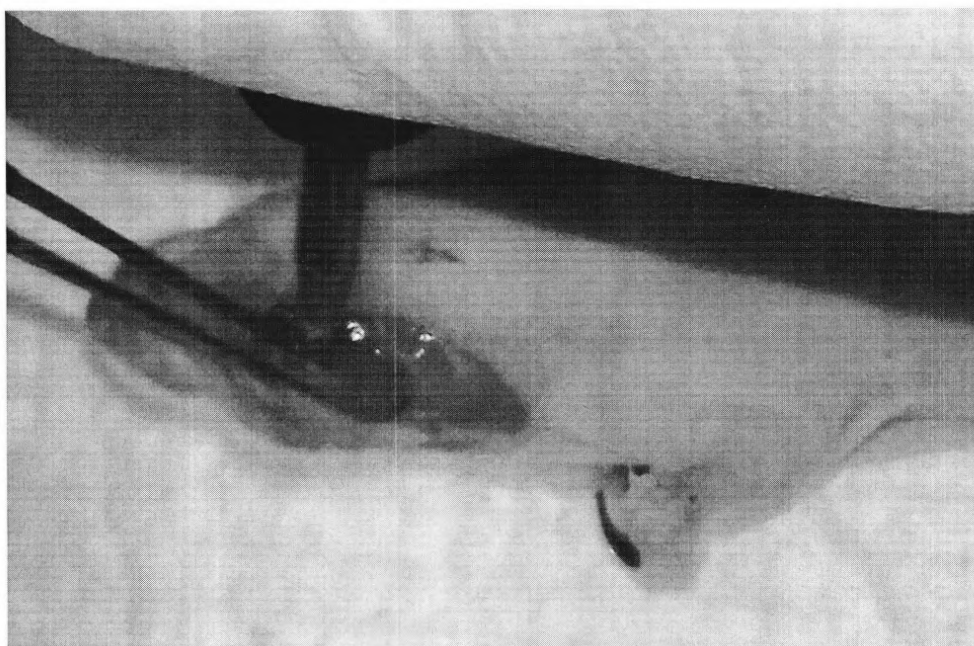
Наркоз животного осуществляли с использованием ксилазина концентрацией 20 мг/мл и зоветила концентрацией 22,57 мг/мл. Для обеспечения доступа к нижней челюсти разрезали кожу мыши параллельно телу нижней челюсти на протяжении 15 мм. Разрез начинался на средней линии тела на расстоянии 5 мм от нижней губы. Отодвигая анатомическим пинцетом подкожную мышцу шеи, осуществили тупое выделение жевательной мышцы, которую рассекали параллельно телу нижней челюсти. Используя хирургический бур, повредили надкостницу и верхний слой костной ткани тела нижней челюсти диаметром 2 мм и глубиной 1 мм в области жевательного гребня. Скаффолд из сплава титана с заселенной культурой опухолевых клеток прошивали лигатурой, которой также обвивали тело нижней челюсти, завязали узел. Разрезанную жевательную мышцу сшивали одним узловым швом. Послеоперационную рану ушивали непрерывным швом.

Технико-экономическая эффективность данного способа заключается в том, что он позволяет создать ортотопическую модель злокачественного роста в костях и мягких тканях нижнечелюстной и шейной области, трансплантируя опухолевые клетки в костную ткань, и исключает элиминацию опухолевого материала, создавая оптимальные условия для роста имплантируемых клеток.

#### (57) Формула изобретения

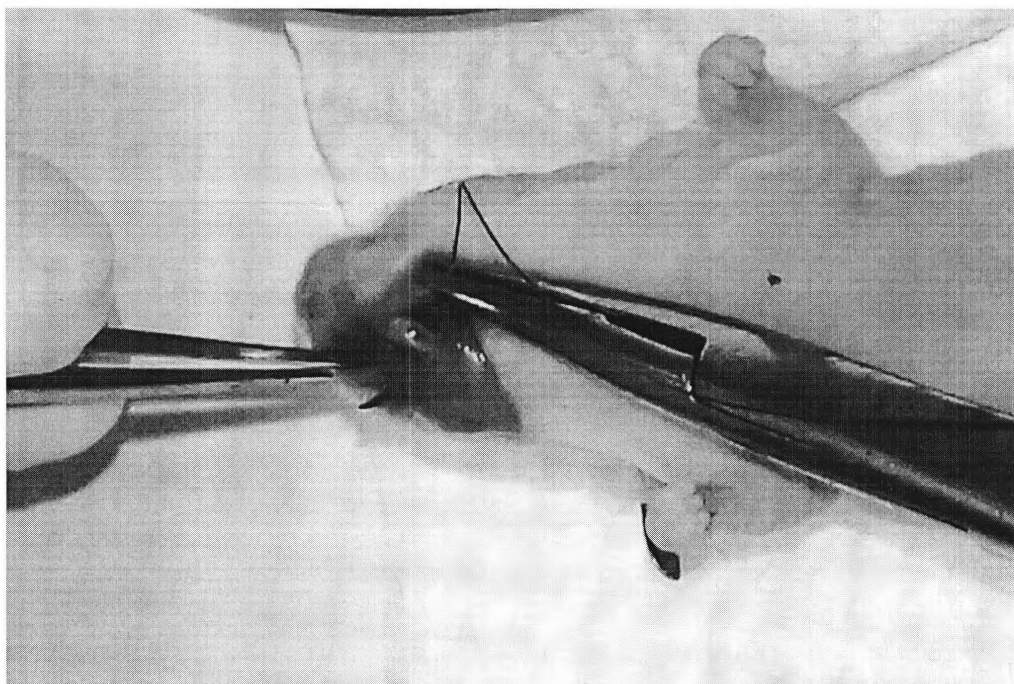
Способ трансплантации скаффолда из сплава титана с заселенной культурой опухолевых клеток в нижнюю челюсть иммунодефицитных мышей, включающий наркоз иммунодефицитных мышей, рассечение кожи и мышц нижней челюсти, послойное ушивание послеоперационной раны, отличающийся тем, что разрез кожи производят параллельно телу нижней челюсти на протяжении 15 мм, начало разреза расположено на средней линии тела на расстоянии 5 мм от нижней губы, отодвигая анатомическим пинцетом подкожную мышцу шеи, осуществляют тупое выделение жевательной мышцы, которую рассекают параллельно телу нижней челюсти, при помощи хирургического бура производят повреждение надкостницы и верхнего слоя костной ткани тела нижней челюсти диаметром 2 мм и глубиной 1 мм в области жевательного гребня, прошивают лигатурой скаффолд из сплава титана с заселенной культурой опухолевых клеток и обвивают этой же лигатурой тело нижней челюсти, завязывают узел, сшивают разрезанную жевательную мышцу одним узловым швом, ушивают послеоперационную рану непрерывным швом.

1

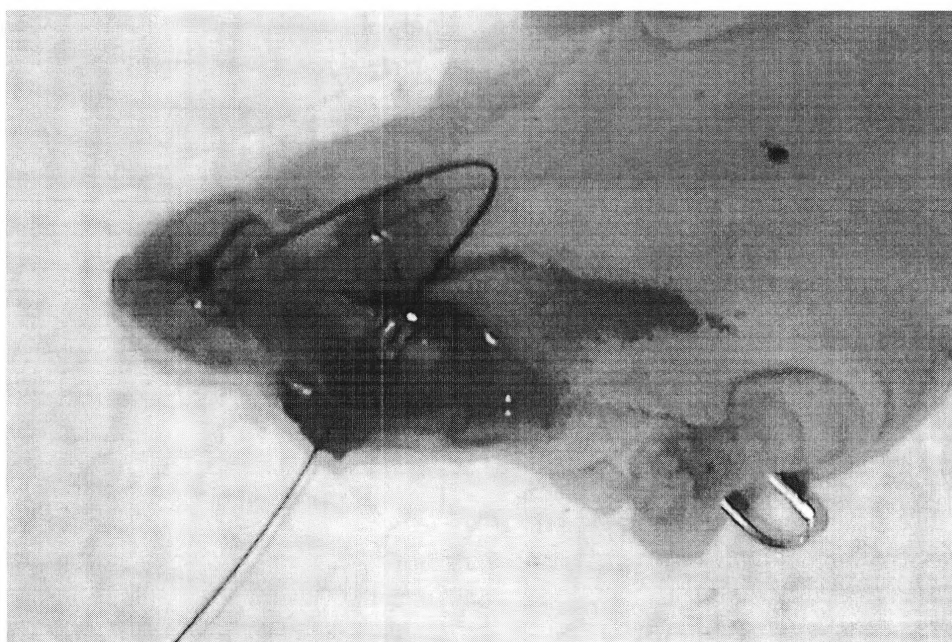


Фиг. 1

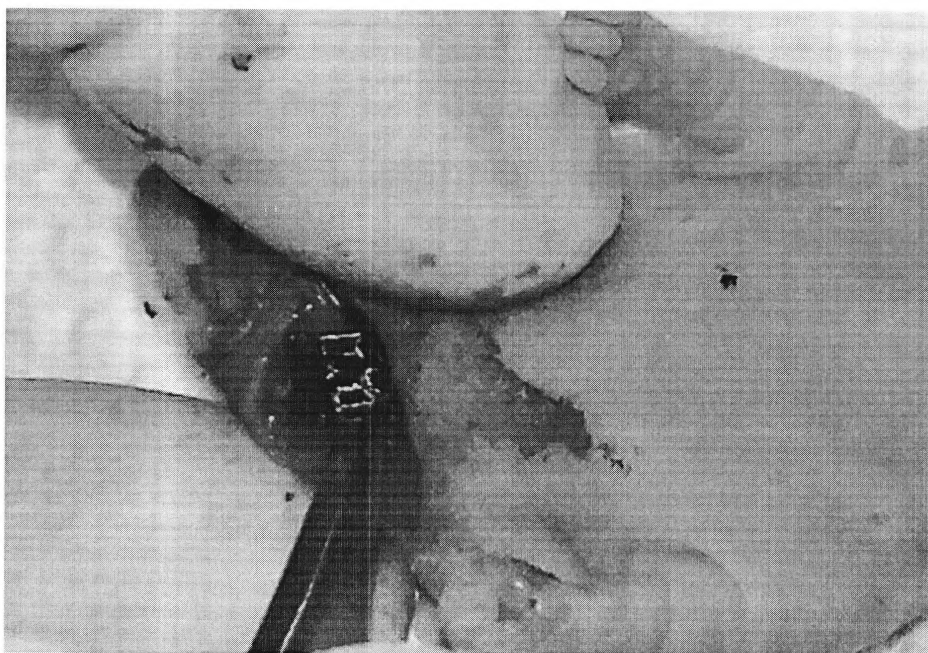
2



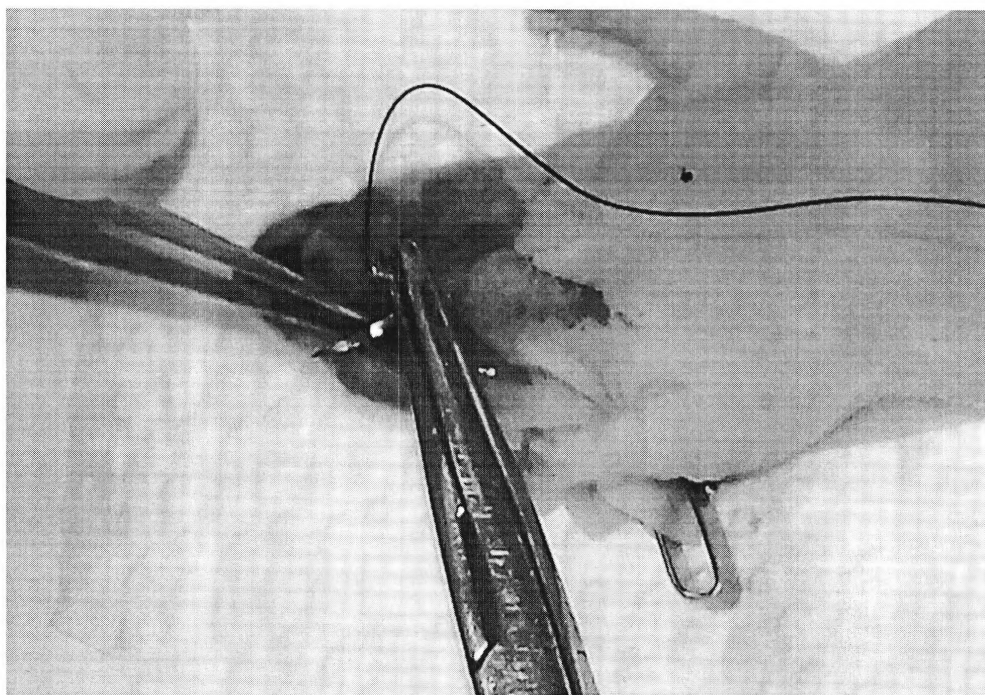
Фиг. 2



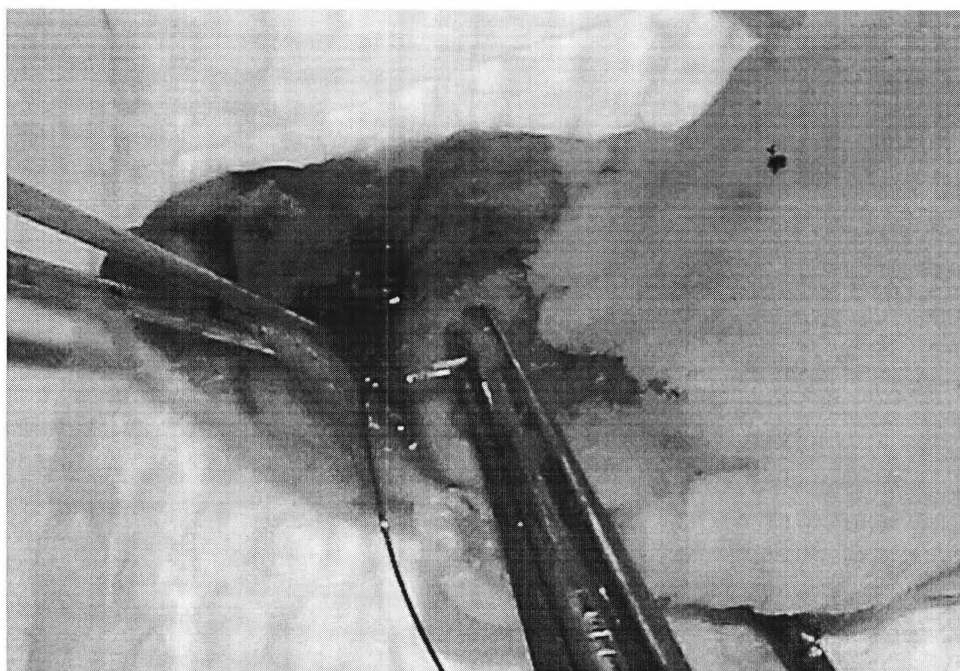
Фиг. 3



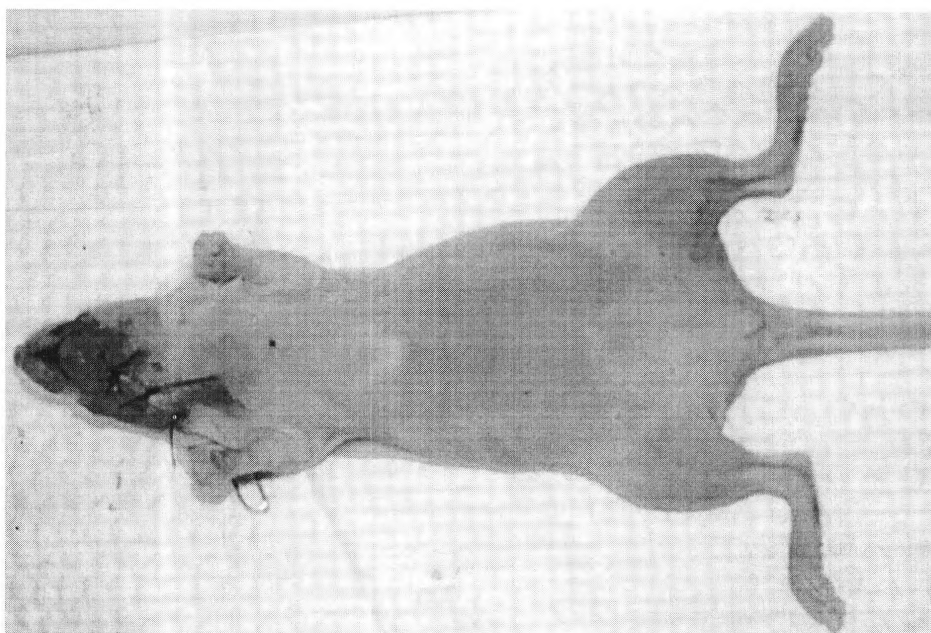
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7.