

(12) **PATENTO APRAŠYMAS**

(21) Paraiškos numeris: **2025 516**
(22) Paraiškos padavimo data: **2025-04-11**
(41) Paraiškos paskelbimo data: **2025-08-25**
(45) Patento paskelbimo data: **2025-09-10**
(30) Prioritetas: **PL451263, 2025-02-21**
PL

(73) Patento savininkas:
ŚLĄSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY W
KATOWICACH, ul. Księcia Józefa Poniatowskiego 15,
40-055 Katowice, PL

(72) Išradėjas:
Marzena WYSOCKA-KOSMULSKA, PL
Dariusz DOBROWOLSKI, PL
Zenon CZUBA, PL
Anita LYSSEK-BOROŃ, PL
Edward WYLĘGAŁA, PL

(74) Patentinis patikėtinis/atstovas:
Gediminas PRANEVIČIUS, 54, Advokatų profesinė
bendrija IP FORMA, Užupio g. 30, LT-01203 Vilnius, LT

(54) Pavadinimas:
Homogeninių amniono membranos homogenatų gavimo būdas

(57) Referatas:
Homogeniškų amniono membraną homogenatų gavimo būdas prasideda nuo jų surinkimo, dekontaminavimo ir skalavimo steriliomis sąlygomis. Tada audinys kriogeniškai užkonservuojamas, pirmiausia -20 °C temperatūroje, o vėliau -80 °C temperatūroje su sausu ledu. Užšaldyta medžiaga susmulkinama ir homogenizuojama skystame azote, naudojant specializuotą malūnėlį. Po sauso ledo sublimacijos homogenatas išgryninamas daugiapakopiu žemos temperatūros centrifugavimu, kuris leidžia atskirti norimas frakcijas. Pagrindiniai etapai taip pat apima sterilų filtravimą ir ultracentrifugavimą, siekiant gauti labai gryną supernatantą. Gautasis homogeniškas homogenatas laikomas -80 °C temperatūroje, užtikrinant jo stabilumą ir biologinių savybių išsaugojimą tolesniam naudojimui.

TECHNIKOS SRITIS

Išradimas apima biologiškai aktyvias medžiagas.

TECHNIKOS LYGIS

Amniono membrana (AM, *angl. amniotic membrane*) pasižymi regeneracinėmis savybėmis, o amniono membranos panaudojimas, chirurginiu būdu prisiviant tvarstį su AM prie akies paviršiaus (AMT, *angl. amniotic membrane transplantation*), yra įprasta procedūra oftalmologijos srityje. Nepaisant daugelio potencialių ambulatorinio gydymo lašais privalumų, palyginti su chirurginiu AM naudojimu, jų naudojimas nėra plačiai paplitęs. Išradimas susijęs su homogenizuotos žmogaus AM, skirtos naudoti akių lašų pavidalu, paruošimo technologija, ypač panaudojant homogenizavimo procese sausą ledą. Metodas pagrįstas AM homogenizavimu, mišinio centrifugavimu, viršnuosėdinio sluoksnio surinkimu ir pakartotiniu supernatanto centrifugavimu. Be sausojo ledo, prieš homogenizavimą naudojamas skystas azotas. Homogenizuojama ne aukštesnėje nei sausojo ledo temperatūroje ($-55\text{ }^{\circ}\text{C}$), o lašų paruošimo procesas vyksta $\leq +4\text{ }^{\circ}\text{C}$ temperatūroje. Akių lašų sudėtyje yra šių baltymų: IL-10 (interleukinas 10), PDGF-BB (*angl. platelet-derived growth factor BB*, iš trombocitų išskiriamas augimo faktorius BB), bFGF (*angl. basic fibroblast growth factor*, pagrindinis fibroblastų augimo faktorius), NGF (*angl. nerve growth factor*, nervų augimo faktorius).

Iki šiol amniono membrana buvo naudojama kaip akies obuolio lęšio formos tvarstis:

kriokonservuoti produktai (Prokera, BioTissue, Majamis, JAV),

liofilizuotas (XcellerEYES, Oculus Biologics, Willowbrook, JAV),

džiovintas (Omnigen, Notingemas, Jungtinė Karalystė) - patento paraiška WO2014195699A3 - patento paraiška yra susijusi su amniono membranos produktu, pagamintu taikant vakuuminio džiovinimo (ne homogenizavimo) būdą.

Rinkoje žinomi šie akių lašų tyrimai: „Amniotic Membrane Treatment for Hyposecretory Dry Eye“, tyrimas atliktas Argentinoje (3 etapas), „Utilization of Amniotic Membrane Extract Eye Drop (AMEED) on Human Corneal Healing“, atliktas Irane (2 etapas), „The Improvement of Limbal Stem Cell Deficiency (LSCD) in Unilateral Stem

Cell Damage by Amniotic Membrane Extract Eye Drop (AMEED)”, atliktas Irane (1 etapas), „Study of ST266 Eye Drops in Treating Dry Eye”, tyrimas susijęs su iš AM ląstelių gautu citokinų tirpalu, tyrimą finansavo „Noveome Biotherapeutics”, JAV (1 etapas).

Žinomas išradimas, aprašytas WO2014195699A3, susijęs su konservuota amniono membrana, t.y. vakuume džiovinta amniono membrana. Jame taip pat aptariami vakuume džiovintos amniono membranos naudojimo būdai ir vakuume džiovintos amniono membranos gamybos būdai. Amniono membranos apdorojimo metodas, skirtas gauti vakuume džiovintą amniono membraną, apima amniono membranos džiovinimo vakuume etapą. Amniono membrana (AM) yra vidinė ekstraembrioninė membrana, kuri supa vaisių amniono maiše ir veikia kaip apsauginis barjeras nuo infekcijų ir traumų nėštumo metu.

Lenkijos patento paraiškoje P.433677 aprašytas amniono membranos produkto gavimo būdas, kurį sudaro šie nuoseklūs etapai: paėmimas, kvalifikavimas, gryninimas, antibiotikų vonelė, smulkinimas, pirminis pakavimas, liofilizavimas, uždarymas, pasižymintis tuo, kad I- ojo etapo metu paimama šviežia amniono membrana iš karto po cezario pjūvio; II-ajame kvalifikacijos etape atliekami diagnostiniai tyrimai, kad būtų atmesta ŽIV, HBV, HCV ir sifilio infekcijos galimybė, ir vizualinis testas, po kurio atmetami matomi morfologiniai pakitimai; III-ajame gryninimo etape atliekami bent du plovimo steriliame fiziologiniame tirpale kambario temperatūroje ciklai, pageidautina priverstinai maišant amniono membraną talpykloje mentele, dar geriau – rankiniu būdu sukant uždarytą talpyklą su amniono membrana, kol gaunamas skaidrus tirpalas; IV-ajame antibiotikų vonelės etape audinys visiškai panardinamas į tirpalą, kurio sudėtyje yra 10000 vienetų/mL penicilino, 10000 µg/ml streptomicino ir 25 µg/ml amfotericino B, ne trumpiau kaip 2 valandoms kambario temperatūroje; V-ajame smulkinimo etape tirpalas užšaldomas žemesnėje nei -150 °C temperatūroje inde, pagamintame pageidautina iš polistireninio putplasčio, pripildytame skysto azoto iki tokio lygio, kad skystas azotas nesiliestų su tirpalu, vėliau amniono membrana toliau šaldoma ir užšaldytas tirpalas smulkinamas malūnėlyje, nuolat papildant garuojantį iš talpyklos skystą azotą, kol iš amniono membranos gaunami smulkūs milteliai; VI-ajame pirminio pakavimo etape amniono membrana sverinama ir patalpinama į sterilizacijai arba liofilizacijai atsparias talpyklas; VII-ajame liofilizacijos etape amniono membrana liofilizuojama liofilizatoriuje, esant tokiems

nustatytiems parametrams: kondensatoriaus temperatūra -45 °C, lentynos temperatūra – 18 °C, vakuumo slėgis – 0,040 mbar pirmąsias 24 valandas, lentynos temperatūra – 24 °C, vakuumo slėgis – 0,001 mbar kitas 24 valandas; o VIII-ajame uždarymo etape amniono membrana hermetiškai uždaroma į talpyklas. Išradimo objektas taip pat yra produktas, gautas, taikant išradimo gamybos būdą.

IŠRADIMO ESMĖ

Šio išradimo tikslas yra sukurti homogeniškų amniono membrano homogenatų, skirtų naudoti akių lašuose, gavimo būdą.

Išradimas leidžia homogenizuoti ne aukštesnėje nei sausojo ledo temperatūroje (-55 °C), o lašai gaminami ne aukštesnėje nei +4°C temperatūroje. Žemos temperatūros išlaikymas vėlesniuose galutinio produkto gamybos etapuose leidžia lašuose išsaugoti didesnę baltymų koncentraciją. AM, kaip neimunogeninis audinys, idealiai tinka naudoti plačiai suvokiamoje regeneracinėje medicinoje. Būdinga tai, kad medžiagą lengva gauti ir yra maža rizika donorui ir recipientui. Tai biologiškai suderinamas audinys, kuriame gausu kamieninių ląstelių, citokinų ir augimo faktorių. Biologinės AM savybės apima regeneracinį poveikį, kuris, be kita ko, pasižymi ragenos epitelio augimą skatinančiomis savybėmis, slopina randų susidarymo procesus, turi imunomoduliacines, priešuždegimines, antimikrobines, antivirusines, antiangiogenines ir audinių augimą skatinančias savybes. Dėl AM savybių, siekiant paskatinti ragenos epitelio gijimo procesus, taikomas amniono membranos paviršinis akies obuolio tvarstis (angl. *amniotic membrane transplantation*, AMT). Procedūra atliekama, taikant vietinę nejautrą ir stacionaro režime. Paprastai tvarstis sugyja po dviejų savaitių, tada siūlus galima išimti. Neretai ši procedūra kartojama pacientams, kuriems ji duoda akivaizdžios naudos. Ši gydymo forma yra įprasta oftalmologinėje chirurgijoje. Gydymui galima naudoti AM lašų pavidalo preparatą, kuris gali būti alternatyva chirurginei operacijai. Tokio gaminio pateikimo rinkai privalumai galėtų būti dar didesni, nes būtų sudaryta galimybė AM gydyti daug platesnę pacientų grupę. Galimos AM lašų taikymo sritys – visos akių paviršiaus ligos, kai sutrinka ragenos gijimas (pvz., neurotrofinė keratopatija), ragenos randai ir drumstumas, būklės po operacijų, nudegimų ir ragenos traumų, lėtiniai uždegimai, įskaitant pacientus, turinčius sausų akių sindromą, kurio paplitimas pasaulyje vertinamas iki 50 % populiacijos.

AM lašuose esančių baltymų poveikis

Randėjimo procesų slopinimas. PDGF-BB ir bFGF veikimo mechanizmas pagrįstas miofibroblastų (ląstelių, susijusių su randiniu audiniu) diferenciacijos slopinimu, paveikiant šių ląstelių proliferaciją ir migraciją, kartu palengvinant žaizdos uždarymą. Be to, AM geba paversti su randu susijusius diferencijuotus miofibroblastus atgal į fibroblastus, t. y. IL-10 turi imunomoduliacinį ir priešuždegiminį poveikį, nes slopina NK ląstelių citotoksiškumą ir mažina IFN- γ raišką.

NGF reikalingas normaliam ragenos ląstelių augimui, išgyvenimui ir diferenciacijai. Skatina ragenos epitelio gijimą ir nervų regeneraciją.

Išradimo esmė – homogeniškų amniono membranų homogenatų gavimo būdas, kuriam būdinga tai, kad amniono membrana surenkama žinomomis priemonėmis, po to žinomomis priemonėmis neutralizuojama ir išvaloma antibiotikų vonelėje, paimami mėginiai mikrobiologiniam ir histopatologiniam tyrimui, audiniai dedami į sterilias talpyklas su PBS tirpalu (angl. *phosphate-buffered saline*, PBS), viskas apdorojama steriliai A klasės laminarinio srauto spintose, esančiose B klasės švariose patalpose, po to mėginiai kriokonservuojami, patalpinant į -20 °C temperatūrą 24 valandoms, po to atšaldomi žemos temperatūros šaldiklyje -80 °C temperatūroje teriozoliacinėje pakuotėje sausu ledu apsuptame konteineryje, o iš karto po išėmimo iš žemos temperatūros šaldiklio mėginys susmulkinamas PBS be Ca ir Mg, dedamas ant sauso ledo ir laikomas stiklinėje taroje arba steriliose vienkartinėse talpyklose ant sauso ledo, tada mėginiai dedami į skystą azotą ir homogenizuojami malūnėlyje su smulkintuvu ir 2-15 minučių smulkinami su sausu ledu, dedami į stiklinį indą arba sterilias vienkartinės talpyklas ir laikomi -55 °C temperatūroje, kol sausas ledas sublimuojasi, tada pasveriami ir centrifuguojami 2-5 minutes, geriausiai 3 minutes, esant homogenato ir sausojo ledo santykiui nuo 1:1 iki 1:1,5, pageidautina 1:1, tuomet homogenatas dedamas į laboratorinę centrifugą +4 °C temperatūroje ir centrifuguojamas nuo 1 iki 3 minučių, geriausia 2 minutes, nuo 3000 iki 8000 aps/min, geriausiai 5000 aps/min greičiu, santykinė išcentravimo jėga nuo 1000 g iki 1800 g, geriausiai 1400 g, tada šaldomas nuo -30 iki -10 °C, geriausia -20 °C temperatūroje nuo 15 iki 48 val., geriausiai 24 val., po to homogenatas centrifuguojamas žemos temperatūros šaldiklyje -20° C temperatūroje, papildžius 5 ml atšaldyto PBS tirpalo be

Ca ir Mg, mišinys 30 sekundžių maišomas sūkuriais, po to 2 minutes centrifuguojamas +4 °C temperatūroje, esant 5000 aps/min greičiui ir 1400 g santykinei išcentrinei jėgai, tada mėginys išvalomas steriliais 0,22 µm porų dydžio švirkštiniais filtrais, supernatantas perpilamas į sterilius mėgintuvėlius, iš kurių surenkama 1 ml supernatanto, kuris 5 minutes ultracentrifuguojamas +4 °C temperatūroje 14000 aps/min greičiu ir su 14000 g santykine išcentravimo jėga, po to užšaldomas laboratoriniame šaldiklyje -80 °C temperatūroje.

IŠRADIMO REALIZAVIMO PAVYZDYS

Amniono membranos paėmimas, apdorojimas ir paruošimas

Amniono membranos paėmimas ir apdorojimas atliekamas, laikantis taisyklių, reglamentuojančių šio audinio surinkimo, apdorojimo, laikymo ir platinimo kokybės ir saugos standartus. Pagrindiniai šios srities teisės aktai yra 2005 m. liepos 1 d. ląstelių, audinių ir organų paėmimo, laikymo bei transplantacijos įstatymas ir 2004 m. kovo 31 d. Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2004/23/EB. Pagal audinių ir ląstelių bankų taikomus reglamentus, AM paėmimas ir paruošimas pradedamas operacinėje, steriliomis sąlygomis atliekant planinį Cezario pjūvį.

Šiame etape atliekama papildoma makroskopinė medžiagos analizė, po to atliekamas AM nukenksminimas ir skalavimas antibiotikų vonelėje. Vėliau medžiaga surenkama mikrobiologiniams ir histopatologiniams tyrimams, kad audiniai galėtų būti toliau apdorojami. Taip paruošti tyrimui audiniai sudedami į sterilias talpyklas su PBS tirpalu. Visos operacijos atliekamos steriliai, A klasės oro tiekimo laminarinėse dėžėse, B klasės švariose patalpose, naudojant sterilius instrumentus ir sterilią vienkartinę chirurginę patalynę.

Amniono membranos laikymas

Surinktas ir paruoštas AM kriokonservuojamas. Paruošti audiniai 24 val. laikomi -20 °C temperatūroje, po to -80 °C temperatūroje šaldiklyje. Tokioje aplinkoje AM galima laikyti iki dvejų metų.

Audinių priėmimas ir tvarkymas bei jų apdorojimo sąlygos

Tolesni etapai atliekami steriliai, A klasės oro tiekimo laminarinėse dėžėse, B klasės švariose patalpose, naudojant sterilius instrumentus ir sterilią vienkartinę chirurginę patalynę. Kiekvieną kartą, gabenant amniono membranas ir ruošiant vėlesnius procesus, audinys laikomas šilumą izoliuojančioje pakuotėje, kurią supa sausas ledas, t.y. medžiaga laikoma žemiausioje įmanomoje temperatūroje. Iškart po to, kai AM išimamas iš žemos temperatūros šaldiklio (-80 °C), audiniai susmulkinami steriliomis, tiesiomis, 15 cm ilgio bukomis Mayo tipo chirurginėmis žirkklėmis (termostabiliuose konteineriuose su sausu ledu).

Amniono membranos svėrimas

Medžiaga pasveriama („Mettler Toledo“ svarstyklės, Šveicarija, JAV). Buvo sveriami atskiri amniono membranos tvarsčiai, atsižvelgiant į grynąjį audinio svorį. Audiniai buvo dedami ant sterilaus pagrindo, kuris taip pat buvo pasvertas atskirai. Tada medžiaga buvo perkelta tiesiai į sauso ledo temperatūros aplinką, kur ji buvo laikoma iki kitų procesų.

Pasiruošimas amniono membranos homogenizavimui

Visi homogenizavimo proceso etapai pradedami amniono membranos išėmimu iš žemos temperatūros šaldiklio (-80 °C). AM audiniai laikomi PBS be Ca ir Mg. Pakuotėje medžiaga susmulkinta steriliomis Mayo tipo žirkklėmis, kurių ilgis 15 cm. Tada audiniai sveriami. Vėliau medžiaga dedama ant sterilių polistireno plokštelių. Panaudotos plokštelės sveriamos atskirai, kad būtų nustatytas grynasis AM svoris. Šilumos izoliacinėje pakuotėje sauso ledo aplinkoje kartu su medžiaga iki homogenizavimo laikomi:

50 ml talpos sterilūs „Falcon“ mėgintuvėliai,

sterilūs stikliniai laboratoriniai piltuvėliai birioms medžiagoms, kurių kaklelio skersmuo yra 20 mm,

40 ml talpos sterilios vienkartinės pakuotės (homogenizatoriaus rinkinio),

AM audiniai ant sterilių polistireno plokštelių.

Amniono membranos homogenizavimas

Operacijos atliekamos B klasės švariose patalpose laminarinėse dėžėse su A klasės oro tiekimu. Tokiu būdu paruošta medžiaga homogenizuojama malūnėlyje, turinčiame smulkintuvą, nuo 2 iki 15 minučių, pavyzdžio gamybos atveju - 5 minutes. Į 100 ml talpos laboratorinę menzurą pilamas skystas azotas tiesiogiai iš 3,7 l talpos Dewaro indo. Tada AM dedama į menzurą su skystu azotu (ne atvirkštine tvarka, nes tada audinių medžiaga priliptų prie indo dugno). Jei skystis visiškai nepadengia audinio, įpilama tiek skysto azoto, kad skystis visiškai padengtų medžiagą. Tokiu būdu AM temperatūra pasikeičia daugiausiai iki skysto azoto virimo temperatūros (-196°C) ir audinys tampa trapesnis. AM temperatūros kitimo procesas pasireiškia dujų burbuliukų išsiskyrimu audinio ir skysto azoto sąveikos srityje. Burbuliukų nebuvimas panardinto audinio riboje (nepainioti su burbuliukais, išsiskiriančiais tarp skysto azoto ir laboratorinio stiklo bei skysto azoto ir oro sąlyčio zonoje) reiškia, kad AM pasiekė skysto azoto temperatūrą. Tuo tarpu į smulkinimo kameras pridėjama 3 laboratoriniai šaukštai sauso ledo (iš viso 15 g). Tada audinys perkeliamas į smulkinimo kamerą su sausu ledu. Audiniai homogenizuojami 3 minutes 25000 aps/min greičiu, tada laboratoriniu šaukštu paimti homogenizuoti audiniai perpilami per iš anksto atšaldytą stiklinį laboratorinį piltuvėlį į atšaldytus 50 ml talpos „Falcon“ mėgintuvėlius. Į mėgintuvėlį supilamas visas homogenatas. Jei homogenato su sausu ledu yra daugiau, nei telpa mėgintuvėlyje, reikėtų palaukti, kol sausasis ledas sublimuos, t. y. pereis iš kietos būsenos į dujinę, aplenkdamas skystąją formą. Viso proceso metu AM kontaktavo tik su steriliais, sausos ledo temperatūroje atšaldytais instrumentais (-55°C).

Paskesni galutinio produkto paruošimo etapai

Siekiant subalansuoti mėgintuvėlius centrifugoje, amniono membranos buvo homogenizuotos. Abiejuose mėgintuvėliuose homogenato su sausu ledu tūris turėjo būti panašus. Jei sauso ledo su AM homogenatu buvo per mažai, pridėta 5 g sauso ledo. Dauguma sauso ledo prieš centrifugavimą nebuvo sublimuota, nes tokiu atveju kiltų rizika, kad centrifuguojant mėgintuvėliuose padidėtų AM temperatūra. Siekiant išvengti mėgintuvėlių įtrūkimo ar sprogo centrifuguojant, į centrifugą buvo įleidžiami mėgintuvėliai su sandariai neuždarytu dangteliu. Pažeidimo rizika yra susijusi su slėgio

padidėjimu mėgintuvėlyje, sublimuojant sausą ledą centrifugavimo metu.

I-asis centrifugavimas

Mėgintuvėliai sudėti į laboratorinę centrifugą su aušinimo iki +4 °C funkcija. Iš anksto atvėsinus centrifugą iki +4 °C, homogenatas centrifuguotas 2 minutes 5000 aps/min greičiu ir 1400 g santykinė išcentravimo jėga (RCF). Homogenatai prieš ir po I-ojo centrifugavimo: skiriasi medžiagos kiekis. Po sausojo ledo sublimacijos medžiagos lieka mažiau. Centrifuguojama ne aukštesnėje kaip +4 °C temperatūroje, kad būtų užtikrinta žema homogenatų temperatūra. Amniono membranos homogenatas mėgintuvėliuose sudėtas į laboratorinį šaldiklį -20 °C temperatūroje 24 valandoms, kad sausasis ledas visiškai sublimuotų.

II-asis centrifugavimas

Centrifuguoti AM homogenatai, patalpinti į žemos temperatūros šaldiklį (-20 °C) 50 ml talpos „Falcon“ mėgintuvėliuose, po sauso ledo sublimacijos buvo patalpinti į laminarines dėžes kambario temperatūroje. Į kiekvieną mėgintuvėlį įpilta po 5 ml PBS tirpalo be Ca ir Mg (prieš tai tirpalas buvo atšaldytas iki +4 °C temperatūros) ir mišinys 30 sek maišytas sukuriniu maišytuvu VX-200 „Labnet Vortex Mixer“ („Corning BV“, Amsterdamas, Nyderlandai). Homogenatai buvo centrifuguojami +4 °C temperatūroje 2 minutes 5000 aps/min greičiu, kai santykinė išcentravimo jėga (RCF) yra 1400 g.

Filtravimas

Mėginiui valyti buvo naudojami sterilūs, atskirai supakuoti švirkštiniai filtrai, kurių porų dydis 0,22 μm, skersmuo 33 mm. Tai dvipusiai filtrai, kuriuose medžiaga gali būti filtruojama dviem kryptimis. Po II-ojo homogenato centrifugavimo iš kiekvieno „Falcon“ mėgintuvėlio 18G adata į 5 ml vienkartinius švirkštus buvo paimtas supernatantas. Tuomet ant švirkštų buvo uždėti filtrai, o filtratai perkelti į sterilius 50 ml talpos „Falcon“ mėgintuvėlius. Tuomet pipete po 1 ml supernatanto iš „Falcon“ mėgintuvėlių perpilta į 1,5 ml talpos „Eppendorf“ mėgintuvėlius.

III-asis centrifugavimas

Kitas etapas – supernatanto centrifugavimas (ultracentrifugavimas). Centrifugos nustatymai: greitis 14000 aps/min, RCF – 14000 g, laikas – 5 minutės, temperatūra – +4 °C (MPW-350R, MPW MED. INSTRUMENTS, Lenkija). Iš kiekvieno centrifuguoto mėgintuvėlio supernatantas surinktas į 1,5 ml „Eppendorf“ mėgintuvėlius. Tokiu būdu iš kiekvieno „Falcon“ mėgintuvėlio (vieno homogenato) buvo gauti 4-5 1,5 ml supernatanto mėgintuvėliai. Mėgintuvėliai buvo iš karto sudėti į laboratorinį šaldiklį -80 °C.

Remiantis šiuo pavyzdžiu, buvo gauti homogeniški AM homogenatai, skirti naudoti kaip akių lašai sausų akių sindromui gydyti. Išradimas leidžia homogenizuoti ne aukštesnėje nei sauso ledo temperatūroje (-55 °C), o sukurtas būdas kartu su filtravimu (0,22 µm švirkštiniai filtrai) leidžia išlaikyti produkto mikrobiologinį grynumą.

Aprašomoji statistika su atskirų AM įverčiais

Atlikti 77 tyrimai ir nustatyta vidutinė baltymų koncentracija gautuose homogenatuose siekė $0,68 \pm 1,26$ mg/mL. Koncentracijos atskiruose amniono preparatuose pateiktos 1 lentelėje.

1 lentelė. Aprašomoji baltymų koncentracijos [mg/ml] statistika, įskaitant atskirų amniono preparatų rezultatus. 1-5 AM preparatai buvo saugomi PBS terpėje, 6-9 AM preparatai – Dulbeko modifikuotoje Eagle terpėje (DMEM, *angl. Dulbecco's Modified Eagle Medium*) + glicerolio terpėje.

AM numeris	AM pavadinimas	N-tinkami	Vidutinė baltymų koncentracija [mg/mL]	Mažiausia baltymų koncentracija [mg/mL]	Didžiausia baltymų koncentracija [mg/mL]
1	O218	14	$2,58 \pm 1,0$	1,67	4,46
2	O223	15	$0,9 \pm 1,21$	0,3	4,09
3	O224	4	$0,85 \pm 0,44$	0,48	1,48

4	O226	4	$0,53 \pm 0,4$	0,26	1,19
5	O230	16	$1,49 \pm 1,21$	0,27	3,66
6	O231	16	$0,1 \pm 0,15$	0,04	0,45
7	O229	5	$0,06 \pm 0,01$	0,04	0,08
9	O228	3	$0,07 \pm 0,01$	0,06	0,07
VISO		77	$0,68 \pm 1,26$	0,04	4,46

Baltymų koncentracijos verčių palyginimas pagal AM tipą

Kadangi buvo homogenizuotos skirtingų donorų AM, buvo nuspręsta palyginti skirtingų audinių baltymų koncentracijos vertes. Dėl mažo kai kurių grupių dydžio statistinei analizei buvo naudojama neparametrinė Kruskal-Wallis dispersinė analizė ir daugkartinio palyginimo testas. Remiantis gautais rezultatais, baltymų koncentracija buvo statistiškai reikšmingai didesnė ($p < 0,01$), atliekant šiuos tyrimus:

AM O218, palyginime su O231, O229 ir O228.

AM O223, palyginime su O231 ir O229.

AM O30, palyginime su O231 ir O229.

Šiuos rezultatus patvirtina 1 pav.

Baltymų koncentracijos verčių palyginimas pagal terpės tipą.

Tiriamos AM buvo suskirstytos į dvi grupes pagal terpę, kurioje jos buvo laikomos:

1 grupė: AM – PBS terpėje

2 grupė: AM – DMEM+glicerolio terpėje

53 mėginiai buvo laikomi PBS, 24 mėginiai - DMEM + glicerolio terpėje.

Atlikus analizę (Mann-Whitney U testas), padaryta išvada, kad terpė reikšmingai diferencijavo baltymų koncentracijos skirtinguose mėginiuose rezultatus, o 1 grupės rezultatai buvo statistiškai reikšmingai didesni, nei 2 grupės. Tai patvirtina

toliau pateiktas 2 pav..

BRĖŽINIŲ APRAŠYMAS

1 pav. baltymų koncentracijos verčių palyginimas pagal AM tipą;

2 pav. baltymų koncentracijos verčių palyginimas pagal terpės tipą.

IŠRADIMO APIBRĖŽTIS

1. Homogeniškų amniono membranų homogenatų gavimo būdas, apimantis amniono membranos (AM) paėmimą žinomomis priemonėmis, jos neutralizavimą ir išvalymą antibiotikų vonelėje, smulkinimą, pirminį pakavimą, liofilizavimą ir hermetišką uždarymą sandariose talpyklose, b e s i s k i r i a n t i s t u o, kad paimami AM mėginiai mikrobiologiniam ir histopatologiniam tyrimui, audiniai dedami į sterilias talpyklas su PBS tirpalu,

viskas apdorojama steriliai A klasės laminarinio srauto spintose, esančiose B klasės švariose patalpose,

po to mėginiai kriokonservuojami, patalpinant į -20°C temperatūrą 24 valandoms,

po to atšaldomi žemos temperatūros šaldiklyje -80°C temperatūroje teroizoliacinėje pakuotėje sausu ledu apsuptame konteineryje, o iš karto

po išėmimo iš žemos temperatūros šaldiklio mėginys susmulkinamas PBS be Ca ir Mg,

dedamas ant sauso ledo ir laikomas stiklinėje taroje arba steriliose vienkartinėse talpyklose ant sauso ledo, tuomet mėginiai dedami į skystą azotą ir homogenizuojami malūnėlyje su smulkintuvu ir 2-15 minučių smulkinami su sausu ledu,

dedami į stiklinį indą arba sterilias vienkartinės talpyklas ir laikomi -55°C temperatūroje, kol sausas ledas sublimuojasi,

tuomet pasveriami ir centrifuguojami 2-5 minutes, geriausia 3 minutes, esant homogenato ir sausojo ledo santykiui nuo 1:1 iki 1:1,5, pageidautina 1:1,

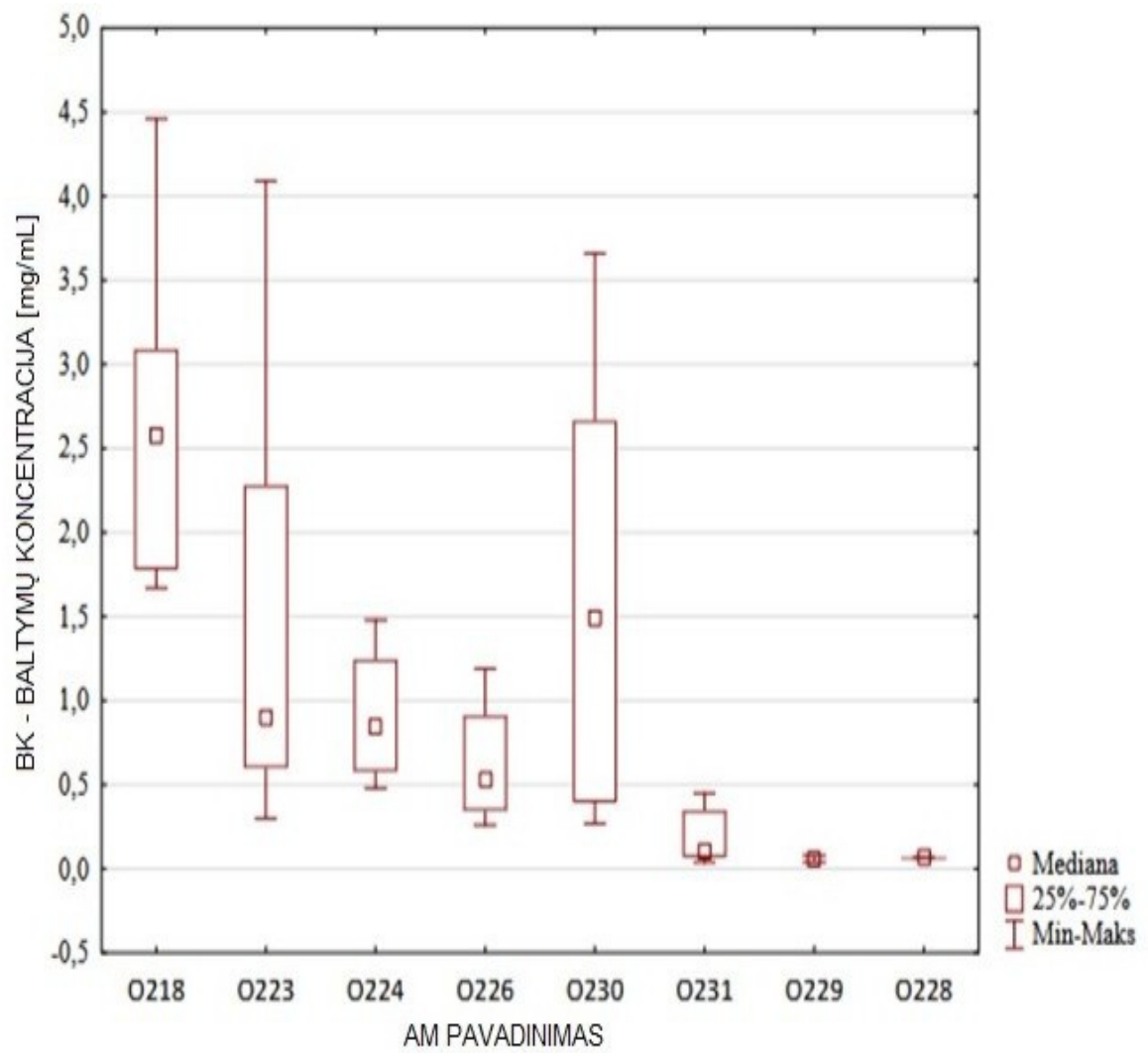
tuomet homogenatas dedamas į laboratorinę centrifugą $+4^{\circ}\text{C}$ temperatūroje ir centrifuguojamas nuo 1 iki 3 minučių, geriausiai 2 minutes, nuo 3000 iki 8000 aps/min, geriausia 5000 aps/min greičiu, santykinė išcentravimo jėga nuo 1000 g iki 1800 g, geriausia 1400 g,

tada šaldomas nuo -30 iki -10 , geriausia -20°C temperatūroje nuo 15 iki 48 val., geriausia 24 val., po to homogenatas centrifuguojamas žemos temperatūros šaldiklyje -20°C temperatūroje, papildžius 5 ml atšaldyto PBS tirpalo be Ca ir Mg,

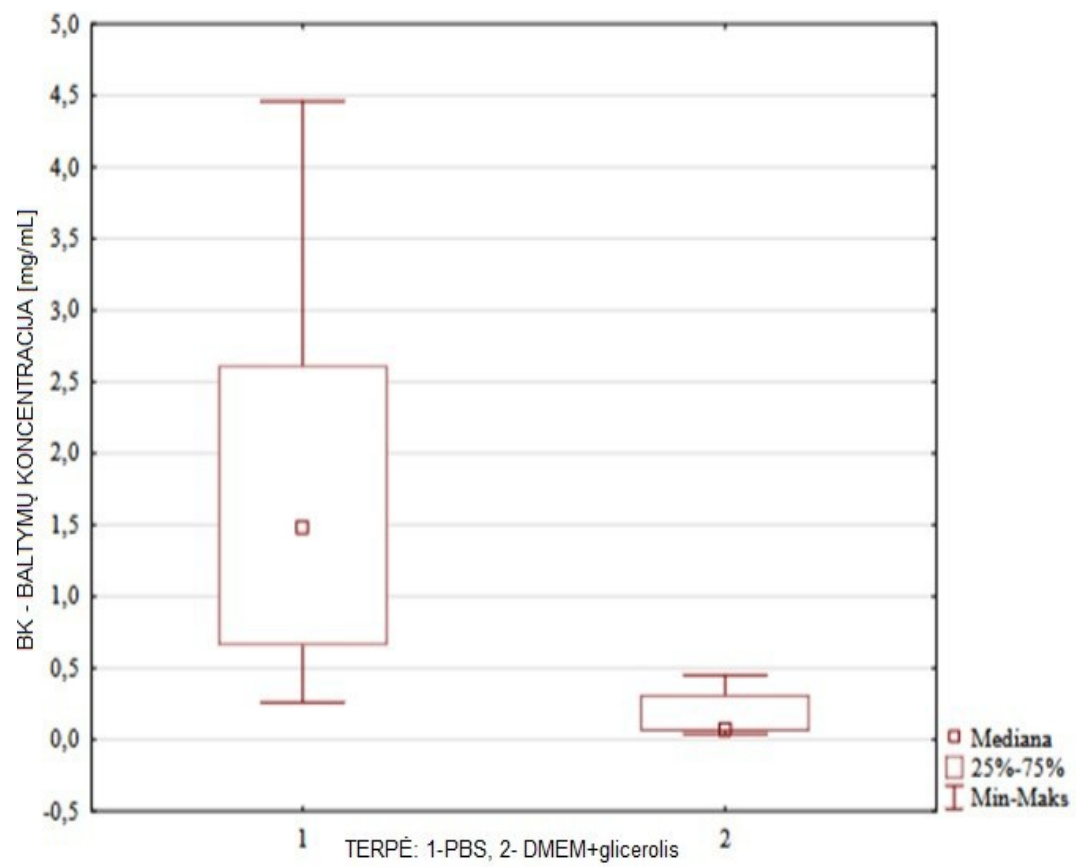
mišinys 30 sekundžių maišomas sūkuriais, po to 2 minutes centrifuguojamas $+4^{\circ}\text{C}$ temperatūroje, esant 5000 aps/min greičiui ir 1400 g santykinėi išcentrinei jėgai,

tada mėginys išvalomas steriliais $0,22\text{ }\mu\text{m}$ porų dydžio švirkštiniais filtrais, supernatantas perpilamas į sterilius mėgintuvėlius, iš kurių surenkama 1 ml supernatanto, kuris 5 minutes ultracentrifuguojamas $+4^{\circ}\text{C}$ temperatūroje 14000 aps/min greičiu ir su 14000 g santykinėi išcentravimo jėga,

po to užšaldomas laboratoriniame šaldiklyje -80°C temperatūroje.



1 pav.



2 pav.