



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **108813** (13) **C2**

(51) МПК (2015.01)

**A61K 35/32** (2015.01)

**A61F 2/28** (2006.01)

**A61P 19/00**

**A01N 1/00**

**A61L 27/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД**

<p>(21) Номер заявки: <b>а 2014 03313</b></p> <p>(22) Дата подання заявки: <b>01.04.2014</b></p> <p>(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: <b>10.06.2015</b></p> <p>(41) Публікація відомостей про заяву: <b>25.11.2014, Бюл.№ 22</b></p> <p>(46) Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.06.2015, Бюл.№ 11</b></p>	<p>(72) Винахідник(и): <b>Корж Микола Олексійович (UA), Вирва Олег Євгенович (UA), Воронцов Петро Михайлович (UA), Хмизов Сергій Олександрович (UA), Сербін Максим Євгенович (UA), Тімченко Дмитро Сергійович (UA), Кур'ята Ольга Петрівна (UA), Максименко Оксана Михайлівна (UA)</b></p> <p>(73) Власник(и): <b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ ПАТОЛОГІЇ ХРЕБТА І СУГЛОБІВ ІМЕНІ ПРОФЕСОРА М.І. СИТЕНКА НАМНУ", вул. Пушкінська, 80, м. Харків, 61024 (UA)</b></p> <p>(74) Представник: <b>Євтушенко Тамара Григорівна</b></p> <p>(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: RU 2342162 C1, 27.12.2008 RU 2172104 C1, 20.08.2001 RU 2495567 C1, 20.10.2013 Сербин М.Е. Некоторые свойства кострой ткани после обработки химическим способом / М.Е. Сербин, П.М. Воронцов // Український морфологічний альманах. - 2011. - № 3 (додаток). - С. 123-125</p>
--	---

**(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ БІОМАТЕРІАЛУ З КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ**

**(57) Реферат:**

Винахід належить до медицини, а саме до технології виготовлення біоматеріалів, які використовують як пластичний матеріал при оперативних заміщеннях кісткових дефектів в ортопедії, травматології та інших галузях відновної хірургії. Спосіб виготовлення біоматеріалу із кісткової тканини включає очищення кістки природного походження та її здрібнювання до необхідних розмірів, обробку кісткових фрагментів перекисом водню та сумішшю етанолу із хлороформом, а також стерилізацію та герметизацію, де обробку кісткових фрагментів здійснюють 10 % перекисом водню протягом доби об'ємом розчину до об'єму тканини 5:1 зі зміною розчину 1-2 рази; обробку кісткових фрагментів виконують сумішшю 96 % етанолу із хлороформом в пропорції 1:1 протягом 8 годин та додатково витримують кісткові фрагменти при температурі мінус 25 °С протягом 20 годин у розчині 0,45 М NaCl з об'ємом розчину до об'єму тканин 5:1, потім протягом 8 годин кісткові фрагменти витримують при температурі мінус 25 °С в розчині 0,1 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> об'ємом розчину до об'єму тканини 5:1, після чого кістковий

UA 108813 C2

матеріал витримують у розчині цефтриаксону та 0,9 % NaCl з додаванням диметилсульфоксиду та насичують аскорбіною кислотою.

Винахід належить до медицини, а саме до технології виготовлення біоматеріалів, які використовують як пластичний матеріал при оперативних заміщеннях кісткових дефектів в ортопедії, травматології та інших галузях відновної хірургії.

Відомо, що успіх трансплантації залежить не тільки від правильних показань до пересадки і дотримання бездоганної техніки, але й від особливостей самого трансплантата, що обумовило необхідність регулювання властивостей трансплантата, його якості. Технології створення трансплантатів направлені на підвищення їх механічної міцності, підвищення їх остеоіндуктивних властивостей, збільшення терміну збереження кісткової тканини та біоматеріалів, виготовлених з неї, підвищення якості антисептики і зниження антигенних властивостей трансплантата.

Так, наприклад, відомий спосіб виготовлення трансплантата, який полягає в послідовно проведених механічному очищенні отриманої від донора заготовки з кісткової тканини, обробці її розчином перекису водню, стерилізації парами формаліну, розміщенні в скляні ампули, що герметизуються, заморожуванні в холодильній камері при температурі мінус 70 °С і зберіганні заготовленого трансплантата до його клінічного використання при температурі мінус 30 °С [Имамалиев А.С. Биологическая оценка трансплантируемых тканей / А.С. Имамалиев. - М.: Наука, 1975. - 183 с]. Отриманий за даним способом заморожений кортикальний алотрансплантат відрізняється високою механічною міцністю, але не має, однак, помітних остеоіндуктивних властивостей, не забезпечуючи при клінічному використанні швидкої перебудови й високої регенерації кісткової тканини в області пересадження.

Відомий спосіб виготовлення кісткових трансплантатів, у якому для підвищення механічної міцності фіксації відламків у післяопераційному періоді алотрансплантат знежирюють у суміші ефіру і етанолу. Потім виконують електрохімічне осадження металевого хрому на поверхні трансплантата при щільності струму 0,01-0,07 А/см<sup>2</sup> протягом 1-3 годин [Пат. № 1357012 А1, SU, МПК А61В17/56. Способ изготовления костных аллотрансплантатов / Державин А.Е., Соколюк А.М., Терновой Н.К., Турчанинов Р.О.; Киевский научно-исследовательский институт ортопедии. - З. № 3904717/28-14; заявл. 29.05.1985; опубл. 07.12.1987, Бюл. № 45]. Спосіб підвищує механічну міцність фіксації відламків у післяопераційному періоді.

Відомий спосіб виготовлення трансплантата, що включає механічну обробку отриманої від донора заготовки з кісткового матеріалу, промивання її холодною водою, демінералізацію в 1,2-3,6 М розчині соляної кислоти, промивання демінералізованої заготовки в дистилаті і у фізіологічному розчині, стерилізацію і консервацію заготовки шляхом розміщення й витримування її у відповідній герметичній тарі (упаковці), залитій розчином формаліну з добавкою антибіотика [Савельев В.И. Деминерализованная кость как особая разновидность костнопластического материала // Сб. науч. тр.: "Заготовка и пересадка деминерализованной костной ткани в эксперименте и клинике". - Л.: НИИТО, 1983. - С. 3-12]. Спосіб дозволяє за рахунок демінералізації кісткової тканини отримати алотрансплантати з високою остеоіндуктивністю, якої практично не мають заморожені недемінералізовані трансплантати.

Відомий спосіб виготовлення кісткового трансплантата, що включає виконання механічної обробки й промивання заготовки з кісткового матеріалу, виконання в ній наскрізних отворів, демінералізацію в розчині соляної кислоти, консервацію демінералізованої заготовки за допомогою ліофільного сушіння, стерилізацію після закінчення сушіння, яку виконують шляхом опромінення заготовки, розміщеної в герметичній упаковці, пучком прискорених електронів дозою 15-18 кгр протягом 16-20 с [Пат. № 2147800, RU, МПК А01N1/00. Способ изготовления костного аллотрансплантата / Лекишвили М.В., Касымов Ильгар Абульфас оглы; Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. - З. № 99102801/14; заявл. 17.02.1999; опубл. 27.04.2000]. Спосіб забезпечує підвищення якості алотрансплантата.

Теоретичною передумовою винаходу стала та обставина, що зріла компактна кістка ссавців вміщує біля 3 грамів неколагенових білків у 100 грамах сухої знежиреної тканини, які являють собою не менше ніж чотири десятки індивідуальних поліпептидів, які відрізняються за молекулярною масою, розчинністю, зарядом, спорідненістю до колагену та обумовлюють антигенність кісткової тканини. Зниження імуногенних властивостей матеріалу досягають шляхом деконтамінації матеріалу в ультразвукових мийках, розчинами повідону-йоду, аскорбіновою кислотою, перекисом водню та іншими антисептиками. Елімінація тканин, що розпались, згустків крові і жиру, що знаходяться в поверхневих шарах трансплантата, дозволяє в подальшому спростити задачу макрофагам сприймаючого ложа та прискорити приживлення трансплантата. Лабораторний регламент препаративного виділення кісткових неколагенових білків включає кислотну декальцинацію кістки, дисоціативне екстрагування демінералізованого матриксу зворотнo денатуруючим білки реагентом та інше, що дозволяє змінювати властивості

кісткової тканини, в тому числі, управляти антигенністю трансплантата, тобто змінювати саму тканину таким чином, щоб її антигенні властивості понижувалися або навіть зникали.

Так, наприклад, відомий спосіб одержання кісткового трансплантата для заміщення дефектів кісток черепа. Спосіб полягає в проведенні механічної обробки, знежиренні, демінералізації, заморожуванні, ліофілізації, стерилізації. Як алотрансплантат використовують кістки склепіння черепа. Демінералізацію виконують до 83-94 %, а заморожування проводять у фізіологічному розчині при температурі (-30)-(-35) °С протягом 24-72 годин з 5-кратним розморожуванням і зміною фізіологічного розчину [Пат. № 2279281, RU, МПК А61К35/32. Спосіб получения костного аллотрансплантата для замещения дефектов костей черепа / Лекишвили М.В., Васильев М.Г., Баракина О.Ю., Горбунова Е.Д., Панкратов А.С. - З. № 2004112186/15; заявл. 22.04.2004; опубл. 10.07.2006]. Спосіб забезпечує одержання алогенного трансплантата, зі зниженими антигенними властивостями й здатного тимчасово замінити дефекти кісток черепа різної етіології, розмірів і локалізації з наступним формуванням власної кісткової тканини органотопічної будови.

Відомий спосіб одержання біосумісного матеріалу для стоматології. Спосіб одержання біосумісного матеріалу полягає в розпилюванні шматочків розміром 1×1×1 см до обробки ферментами, додатково їх знежирюють, подрібнюють у рідкому азоті до одержання кісткової крихти розміром 7-700 мкм, а після обробки 1 %-им перекисом водню центрифугують, повторно обробляють розчином папаїну, промивають водою очищеною, кип'ятять не менше 1 разу протягом 1 години, висушують при температурі 110-120 °С, змішують із матеріалом, що складається із солей дво- і/або тривалентних металів, колагену, сульфатованих глікоаміногліканів і води, взятих у визначених кількісних співвідношеннях [Пат. № 2155025, RU, МПК А61К6/097. Спосіб получения биосовместимого материала для стоматологии / Панасюк А.Ф., Ларионов Е.В., Шехтман М.А., Якобашвили Р.Д., Савашук Д.А. - З. № 99126221/14; заявл. 14.12.1999; опубл. 27.08.2000]. Запропонований спосіб дозволяє підвищити ступінь очищення кістки від фібрилярного білка-колагену й глікопротеїнів, які обумовлюють антигенність тканини.

Відомий спосіб одержання біоматеріалу, який полягає в тому, що після очищення кістку природного походження розпилюють на пластини товщиною від 0,2 до 2,0 см, відмивають нагрітим до 65 °С 0,1 М фосфатним буфером рН 5,8-6,0, переварюють у розчині активованого 0,1-0,4 % папаїну при 65 °С протягом 24 годин, потім пластини промивають п'ятьма об'ємами води при 40-80 °С, обробляють розчином 0,4 N луку при кімнатній температурі протягом 10-24 годин, відмивають проточною водою, знежирюють у сумішах етанол/хлороформ спочатку в співвідношенні 1:2, а потім у співвідношенні 2:1, виконують декальцинацію в 0,4-1 N соляної кислоти, обробляють 1,5-3 % перекисом водню протягом 4 годин, відмивають очищеною водою, потім етанолом, висушують при кімнатній температурі, упаковують і стерилізують [Пат. № 2342162, RU, МПК А61L27/24, А61L27/36, А61К35/32. Спосіб получения биоматериалов из костной ткани и полученный этим способом материал для остеопластики и тканевой инженерии / Савашук Д.А., Панасюк А.Ф. - З. № 2007126721/15; заявл. 27.10.2005; опубл. 27.12.2008]. Спосіб дозволяє отримати з'єднання з невеликою кількістю неколагенових білків.

Даний спосіб виготовлення біоматеріалу із кісткової тканини є найбільш близьким до того, що заявляється, за технічною суттю і результатом, який може бути досягнутим, тому його вибрано за прототип.

В основу винаходу поставлено задачу підвищення якості клінічних та експлуатаційних властивостей біоматеріалу із кісткової тканини шляхом зниження антигенних властивостей кісткової тканини при високому терміні зберігання та спрощеній технології підготовки трансплантата до клінічного використання.

Задачу, яку поставлено в основу винаходу, вирішують тим, що у відомому способі виготовлення біоматеріалу із кісткової тканини, який включає очищення кістки природного походження та її здрібнювання до необхідних розмірів, обробку кісткових фрагментів перекисом водню та сумішшю етанолу із хлороформом, а також стерилізацію та герметизацію, згідно з винаходом, обробку кісткових фрагментів здійснюють 10 % перекисом водню протягом доби об'ємом розчину до об'єму тканини 5:1 зі зміною розчину 1-2 рази; обробку кісткових фрагментів виконують сумішшю 96 % етанолу із хлороформом в пропорції 1:1 протягом 8 годин та додатково витримують кісткові фрагменти при температурі мінус 25 °С протягом 20 годин у розчині 0,45 M NaCl з об'ємом розчину до об'єму тканин 5:1, потім протягом 8 годин кісткові фрагменти витримують при температурі мінус 25 °С в розчині 0,1 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> об'ємом розчину до об'єму тканини 5:1, після чого кістковий матеріал витримують у розчині цефтриаксону та 0,9 % NaCl з додаванням диметилсульфоксиду та насичують аскорбіновою кислотою.

Технічний ефект винаходу досягають за рахунок синергізму сукупності етапів способу, порядку їх виконання та умов, при яких кожен із етапів може бути виконаним. Одержання

збереженого за архітектонікою кісткового біоматеріалу та чистого кісткового колагену з низькоантигенними властивостями дозволить використовувати його як матеріал для заміщення кісткових дефектів, а також як носій біологічно активних речовин і клітин.

Спосіб виконують наступним чином.

5 Із детриту після реконструктивно-пластичних операцій, що звичайно піддається утилізації, здійснюють виділення фрагментів кісткової тканини, придатної для переробки в компонент біокомпозиційних препаратів.

При цьому процес переробки включає наступні етапи:

10 1. Видалення з поверхні кісткових фрагментів м'яких тканин, хряща, окістя, здрібнювання кістки до необхідних розмірів.

2. Обробка кісткових фрагментів 10 % перекисом водню  $H_2O_2$  протягом доби. Об'єм розчину до об'єму тканини 5:1. Розчин замінують 1-2 рази. Після закінчення часу експозиції тканину промивають 45 хвилин під проточною водою та висушують марлею. Етап забезпечує видалення елементів крові та первинну стерилізацію кісткового матеріалу.

15 3. Обробка кісткових фрагментів сумішшю 96 % етанолу із хлороформом (пропорція 1:1) протягом 8 годин. Обробку виконують у герметично зачиненому ексикаторі, у витяжній шафі. Після закінчення часу експозиції тканину промивають 1 годину під проточною водою та висушують марлею. Етап забезпечує видалення жирових компонентів - ліпідів, ліпопротеїдів й т.д., та вторинну стерилізацію.

20 4. Витримування кісткових фрагментів при температурі  $(-25)^\circ C$  протягом 20 годин в розчині 0,45 М NaCl. Об'єм розчину до об'єму тканини 5:1. Після закінчення часу експозиції розморожують та відмивають тканину у дистилляті. Етап забезпечує зниження антигенних властивостей за рахунок екстракції неколагенових білків.

25 5. Витримування кісткових фрагментів при температурі  $(-25)^\circ C$  протягом 8 годин в розчині 0,1 М  $Na_2HPO_4$ . Об'єм розчину до об'єму тканини 5:1. Після закінчення часу експозиції тканину відмивають у дистильованій воді. Етап забезпечує подальше зниження антигенних властивостей за рахунок екстракції неколагенових білків, що залишилися.

Після проведення кісткового матеріалу через етапи вищеписаної переробки на виході отримують біоорганічну фазу (мінеральна частина кістки плюс колаген), що далі є основою для біоматеріалу. Біоматеріал виготовляють у процесі насичення основи антибіотиками та аскорбіновою кислотою:

35 1. Препарат насичують антибіотиком цефтриаксоном, що здійснюють хімічним способом шляхом витримування препарату в розчині цефтриаксону з 0,9 % NaCl та з додаванням диметилсульфоксиду. Додавання диметилсульфоксиду посилює проникнення цефтриаксону. Етап також забезпечує третинну стерилізацію.

2. Насичення аскорбіновою кислотою здійснюють електрофізичним методом за допомогою електрофорезу.

40 Після насичення антибіотиками і аскорбіновою кислотою біоматеріал в стерильних умовах упаковують в медичний пакувальний матеріал (пакети) одноразового використання "STERIKING" виробництва фірми "Wipak Oy" (Держ. реєстрація № 4099/2005 від 25.06.2010 р. № 134), що пройшов стерилізацію в автоклаві відповідно до інструкції виробника цих пакетів. Упаковані препарати зберігають в морозильній камері при  $(-25)^\circ C$ . Експериментально встановлено, що протягом місяця препарати зберігають антибактеріальну активність.

45 Перед упаковкою виконують змиви з кожної порції препарату окремо, змиви передають на мікробіологічне дослідження в бактеріологічну лабораторію. Мікробіологічне дослідження полягає в подобовому моніторингу факту росту або відсутності росту мікрофлори. Після встановлення факту відсутності росту мікрофлори протягом 72 годин роблять висновок про стерильність препарату, однак моніторинг звичайно триває до 11 діб.

50 У випадку встановлення факту росту мікрофлори, виконують аналіз мікрофлори, а сам препарат вилучають і утилізують.

При обробці кісткового матеріалу використовують наступні засоби, пристрої та матеріали: пінцет хірургічний, кісткоутримувач, бинт ГОСТ 1172-93, вата ТУ У 24.4-31301408-002-2001 ГОСТ 5556-81, марля, ексикатор, кювети, витяжна шафа, бікс, перекис водню ГОСТ 177-88, етанол 96 %, хлороформ ТУ 6-09-4263-76 чи ВР 2002, натрію хлорид (NaCl), натрій фосфорнокислий двозамісний ( $Na_2HPO_4$ ), дистильована вода ГОСТ 6709-72.

Маніпуляції виконують при температурі навколишнього середовища  $(20\pm 5)^\circ C$ , атмосферному тиску  $(84,0-106,7)$  кПа, відносній вологості 30-80 %.

Одержаний із кісткової тканини біоматеріал зберігає нативну структуру кісткового колагену та просторову організацію кісткової тканини, що необхідно для її наступної клітинної колонізації,

підвищення приживлення за рахунок зниження антигенних характеристик та підвищення тим самим біосумісності і біоінтеграції.

Винахід промислово придатний, освоєний в лабораторних умовах, результати випробувань доказують практичну цінність одержаного біоматеріалу.

5

## ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб виготовлення біоматеріалу із кісткової тканини, який включає очищення кістки природного походження та її здрібнювання до необхідних розмірів, обробку кісткових фрагментів перекисом водню та сумішшю етанолу із хлороформом, а також стерилізацію та герметизацію, який **відрізняється** тим, що обробку кісткових фрагментів здійснюють 10 % перекисом водню протягом доби об'ємом розчину до об'єму тканини 5:1 зі зміною розчину 1-2 рази; обробку кісткових фрагментів виконують сумішшю 96 % етанолу із хлороформом в пропорції 1:1 протягом 8 годин та додатково витримують кісткові фрагменти при температурі мінус 25 °С протягом 20 годин у розчині 0,45 М NaCl з об'ємом розчину до об'єму тканин 5:1, потім протягом 8 годин кісткові фрагменти витримують при температурі мінус 25 °С в розчині 0,1 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> об'ємом розчину до об'єму тканини 5:1, після чого кістковий матеріал витримують у розчині цефтриаксону та 0,9 % NaCl з додаванням диметилсульфоксиду та насичують аскорбіновою кислотою.

20

---

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601