



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **115102** (13) **U**
(51) МПК**A61F 2/28** (2006.01)
A61L 2/04 (2006.01)
A61L 27/36 (2006.01)
A61L 27/54 (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)
C12N 5/077 (2010.01)ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

(21) Номер заявки: u 2016 06126	(72) Винахідник(и): Голюк Євген Леонтійович (UA), Остапенко Тетяна Анатоліївна (UA), Бездєнєжних Наталя Олександрівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 06.06.2016	(73) Власник(и): Голюк Євген Леонтійович, вул. Григоровича-Барського, 3, кв. 356, м. Київ, 03154 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.04.2017	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.04.2017, Бюл.№ 7	

(54) СПОСІБ ПРИГОТУВАННЯ КІСТКОВОГО МАТРИКСУ**(57) Реферат:**

Спосіб приготування кісткового матриксу включає підбір донорів, дослідження донорів на наявність інфекційних захворювань, взяття матеріалу, поміщення його в контейнер разом зі стерильною рідиною, що достатня для покриття матеріалу, при цьому контейнер спочатку нагрівають при заданій температурі стерилізації на перший певний період часу, а потім підтримують на цій заданій температурі другий проміжок часу, що залежить від розміру забраного матеріалу; отриманий матрикс переносять у іншу ємкість та заморожують, а рідину, що залишилася у першому контейнері, аналізують на наявність інфекційних агентів. Взяття матеріалу виконують під час резекції головки стегнової кістки при ендопротезуванні. Після взяття матеріалу його транспортують в стерильних умовах в транспортних контейнерах з можливістю підтримання низької температури під час транспортування від -10 до -40 градусів Цельсія та утримання в контейнері до 20 годин. Подальшу обробку проводять шляхом термостерилізації, застосовуючи контейнер для стерилізації, виготовлений з термостійкого матеріалу. Контейнер наповнюють кріопротекторним антисептичним розчином, що містить повідон, який повинен покривати голівку стегнової кістки, контейнер переносять до пристрою для стерилізації, що забезпечує температуру від 82,6 до 83 градусів Цельсія на 90 хвилин; після закінчення стерилізації проводять аналіз на присутність інфекції шляхом мікробіологічного дослідження розчину, в якому відбувалася стерилізація, розчин відбирають з контейнера для стерилізації шприцом, поміщають в стерильну лабораторну пробірку та направляють на аналіз. До отримання результатів мікробіологічного аналізу контейнер з матриксом поміщають у холодильне обладнання для тимчасового карантину з неможливістю клінічного застосування та зберігають при температурі -20...-80 градусів Цельсія. Після отримання негативних результатів мікробіологічного дослідження розчину проводять кріоконсервацію матриксу при температурі -20...-80 на строк до 5 років.

UA 115102 U

Корисна модель належить до галузі біотехнології та медицини, а саме до способів виготовлення кісткового матриксу із застосуванням біотехнологічних методів. При цьому отриманий кістковий матрикс зі знезараженням від інфекцій, зберігає свою просторову структуру та є неімунотенним відносно до пацієнта, якому буде застосований.

З рівня техніки відомий спосіб приготування кісткових імплантів, як описано в патенті US 2485791, 25.10.1949, що включає підбір за критеріями за типом крові, дослідження донорів на наявність інфекційних захворювань, взяття матеріалу, поміщення його в контейнер з антибіотичним агентом, утримання матеріалу, тестування матеріалу на фізіологічні показники, що вказують на процеси атрофії та некрозу і таким чином забезпечується зберігання кісткової тканини для трансплантації на невизначений час. Цей спосіб має недолік у тому, що з метою стерилізації використовують антибактеріальний компонент, що не забезпечує повної стерилізації кісткового імплантата.

Також, відомий спосіб RU 1724206, 07.04.1992 виготовлення кісткового трансплантата шляхом очищення вихідного матеріалу, депротейнізації, промивання, сушіння та знежирення, в якому з метою прискорення процесу виготовлення кісткового трансплантата, після його очищення виконують депротейнізацію в 0,01 % розчині хімопсину та 10 % розчином перексиду водню і 10 % розчином хлористого літію. Однак, цей спосіб має недолік у тому, що для обробки застосовують хімічні речовини, що в подальшому погано впливають на якість кісткового трансплантата.

Відомим є спосіб виготовлення кісткового алотрансплантата, як зазначено у документі RU2147800, 27.04.2000, що включає механічну обробку та промивання заготовок із кісткового матеріалу, їх демінералізацію в розчині соляної кислоти, нейтралізацію залишків в них соляної кислоти, стерилізацію, консервацію й герметизацію демінералізованої заготовки. В способі перед демінералізацією в заготовці виконують чисельні отвори, консервацію проводять за допомогою ліофільного сушіння, стерилізують шляхом опромінення заготовки, яка поміщена до герметичної упаковки, пучком прискорених електронів. Недоліком даного способу є те, що при виготовленні алотрансплантата застосовують окремо стадії промивання, демінералізації, нейтралізації залишків розчинів для демінералізації. Демінералізацію проводять хімічним способом, а стерилізують опроміненням, що негативно впливає на якість та безпеку отриманого біологічного матеріалу.

Відомий інший спосіб виготовлення кісткових трансплантантів RU 2440730, 27.01.2012. в якому матеріал витримують в розчині перекису водню та мурашиної кислоти з метою стерилізації. Цей спосіб також має недолік в тому, що застосовують хімічну обробку для стерилізації, що також погано впливає на фізичні та біологічні властивості готового трансплантату.

Найбільш близьким до заявленого способу є метод, який описаний в документі US 5591398, 7.01.1997, де розкритий спосіб стерилізації кісткових трансплантів із застосуванням пристрою з герметичним контейнером, в який поміщують кістковий трансплантат, що потребує стерилізації, разом зі стерильною рідиною, що достатня для покриття кісткового трансплантата. При цьому контейнер спочатку нагрівають при заданій температурі стерилізації на перший певний період часу, а потім підтримують на цій заданій температурі другий проміжок часу, що залежить від розміру кісткового трансплантата. Потім кістковий трансплантат переносять у іншу ємкість та заморожують, а рідину, що залишилася у першому контейнері аналізують на наявність інфекційних агентів.

Описаний у документі US 5591398 метод є найбільш близьким за послідовністю виконання, але не передбачає індивідуального підходу при виготовленні трансплантата з урахуванням імунологічних та регенераційних властивостей при його застосуванні.

Однак, є очевидним, що успішне застосування кісткових імплантів базується на забезпеченні зберігання біологічних та фізичних властивостей, серед яких обов'язковими є наступні вимоги: матеріали для трансплантації повинні бути доступними, не псуватися при зберіганні, характеризуватися відсутністю імуногенних реакцій та забезпечувати органотипічну регенерацію кісткової тканини у найкоротші строки.

З рівня техніки відомі способи, в яких з метою підвищення якості трансплантата при індивідуальному застосуванні покращують відбір кісткового матеріалу, де окрім розміру кісткового трансплантата ще визначають вміст оксилороліну, тирозину, аргініну, об'ємний вміст колагену, а також середню щільність та вік донорського трансплантата та кістки реципієнта і по величині їх відбирають трансплантат (SU833204, 30.05.1981).

Також, відомі способи підбору донора, наприклад в документі SU1106508, 07.08.1984. при трансплантації мертвих тканин опорно-рухового апарата шляхом визначення in-vitro бластної

трансформації лімфоцитів периферійної крові реципієнта на трансплантаційні антигени донора з додатковим визначенням макрофагальної трансформації мононуклеарів.

Також, з метою покращення якості трансплантатів, відоме використання остеоіндуктивного антисептичного покриття для імплантів, що містить збагачену тромбоцитами плазму та аутологічний кістковий мозок (EP 1846055 A1, 24.10.2007).

Відомі з рівня техніки способи недостатньою мірою забезпечують доступність матеріалів для трансплантації, збереження якості кісткових трансплантатів при приготуванні та консервуванні, при подальшому застосуванні відсутність імунотипічних реакцій та забезпечення органотипічної регенерації кісткової тканини у найкоротші строки. Вирішення цих проблем було задачею корисної моделі.

Поставлена задача вирішується шляхом виконання способу приготування кісткового матриксу, що включає підбір донорів, дослідження донорів на наявність інфекційних захворювань, взяття матеріалу, поміщення його в контейнер разом зі стерильною рідиною, що достатня для покриття матеріалу, при цьому контейнер спочатку нагрівають при заданій температурі стерилізації на перший певний період часу, а потім підтримують на цій заданій температурі другий проміжок часу, що залежить від розміру забраного матеріалу; отриманий матрикс переносять у іншу ємкість та заморожують, а рідину, що залишилася у першому контейнері аналізують на наявність інфекційних агентів. Взяття матеріалу виконують під час резекції головки стегнової кістки при ендопротезуванні, при цьому головка стегнової кістки повинна бути не більше 56 мм в діаметрі. Після взяття матеріалу його транспортують в стерильних умовах в транспортних контейнерах з можливістю підтримання низької температури під час транспортування від -10 до -40 градусів Цельсія та утримання в контейнері до 20 годин.

Подальшу обробку проводять шляхом термостерилізації, застосовуючи контейнер для стерилізації, виготовлений з термостійкого матеріалу; контейнер наповнюється кріопротекторним антисептичним розчином, що містить повідон, який повинен покривати голівку стегнової кістки, контейнер переносять до пристрою для стерилізації, що забезпечує температуру від 82,6 до 83 градусів Цельсія на 90 хвилин.

Після закінчення стерилізації проводять аналіз на присутність інфекції шляхом мікробіологічного дослідження розчину, в якому відбувалася стерилізація, розчин відбирають з контейнера для стерилізації шприцом, поміщають в стерильну лабораторну пробірку та направляють на аналіз; до отримання результатів мікробіологічного аналізу контейнер з матриксом поміщають у холодильне обладнання для тимчасового карантину з неможливістю клінічного застосування та зберігають при температурі -20...-80 градусів Цельсія. Після отримання негативних результатів мікробіологічного дослідження розчину проводять кріоконсервацію матриксу при температурі -20...-80 на строк до 5 років.

Перед використанням матрикс обробляють біотехнологічними продуктами пацієнта, якому він імплантується, які після забору центрифугують при обертах від 1 до 6 тисяч, відбирають необхідний прошарок утвореної рідини та проводять подальшу обробку в залежності від виду аутологічного матеріалу та показань до пацієнта.

При виконанні способу як кріопротекторний антисептичний розчин використовують суміш, що містить повідон. Також, ця суміш може містити, крім повідону, натрію хлорид, калію хлорид, кальцію хлорид гексагідрату, магнію хлорид гексагідрат, натрію гідрокарбонат, натрію гідроксид у воді для ін'єкцій.

При виконанні способу як аутологічні продукти використовують аутологічну кров, жирову тканину, кістковий мозок пацієнта, мононуклеари або застосовують у комбінації.

В іншому варіанті виконання способу перед використанням матрикс обробляють продуктами біотехнологічної обробки пацієнта з його жирової тканини, які після забору, промивають у фосфатному буфері, виконують аспірацію буфера, отриману тканину розчиняють у 0,1 % розчині колагенази в шейкері при температурі 37 градусів, зрілі адипоцити та сполучну тканину відділяють від стромальної васкулярної фракції (SVF) шляхом центрифугування при 800 об./хв. протягом 10 хв.; для видалення еритроцитів отримані клітини ресуспендують у лізуючому буфері (155 /mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 , 0.1 mM EDTA) протягом 5 хв. при кімнатній температурі; клітини промивають у фосфатному буфері та центрифугують при 800 о./хв. протягом 10 хвилин; проводять подальшу обробку в залежності від виду аутологічного матеріалу та показань до пацієнта.

Технічним результатом використання корисної моделі є покращення властивостей матриксу, а саме: збереження первинної форми, антисептичність матеріалу, збереження властивостей при низьких температурах та анімуногенність завдяки виконанню запропонованої послідовності дій та використанню засобів зі спеціально підібраним складом компонентів.

Терміни, які використані в матеріалах опису корисної моделі

Термін "матрикс" стосується засобу кісткового походження, до якого застосовано специфічну обробку, спосіб якої описаний в даному документі. Цей засіб не є в повному розумінні біологічною тканиною з причин того, що не є системою клітин та міжклітинної речовини, а лише матриксом органічного походження. Цей термін також відповідає іншим

5 термінам, застосованим в матеріалах даного документу, таким як біологічний матеріал або кістковий імплант.

Біологічний матеріал, який використано для приготування матриксу, не є біопсійним матеріалом з причин того, що не використовується з метою дослідження або діагностики.

10 "Біотехнологічна обробка матеріалу" означає проводити певні процедури, що надають матеріалу певних біологічних властивостей, що не потребує обов'язкового використання біотехнологічних лабораторій.

Під "продуктами біотехнологічної обробки" слід розуміти продукти, що отримані в результаті певних процедур із застосуванням спеціалізованого обладнання - відділення прошарків біологічної рідини (крові, кісткового мозку, клітинного субстрату) або інших складових організму

15 за допомогою центрифугування на різних обертах та подальша спеціальна обробка отриманих компонентів в залежності від подальшого застосування.

"Термостерилізація" означає використання температурного впливу на отриманий матеріал з метою знезараження від патогенних чинників.

Термін "карантин" означає тимчасове обмеження використання отриманого матеріалу.

20 Для забезпечення безпеки використання отриманих матриксів перед взяттям кісткового матеріалу від донорів проводять відбір пацієнтів, застосовуючи опитувальник, що містить 30 запитань, що стосуються анамнезу життя та анамнезу захворювання. По результатах проводять подальший скринінг донора за допомогою експрес-аналізів на ВІЛ, гепатити В та С, сифіліс.

Взяття матеріалу виконують під час резекції головки стегнової кістки при ендопротезуванні кульшового суглоба за допомогою відповідного хірургічного інструментарію, наприклад осциляційна пила, долото, остеотом тощо.

Головка стегнової кістки повинна бути не більше 56 мм в діаметрі.

Термостерилізація

30 Після взяття матеріалу його транспортують в стерильних умовах в спеціальних транспортних контейнерах, які поміщені в упаковку, виготовлену з медичного пластику. Матеріал може знаходитися в цьому контейнері біля 20 годин. Контейнер має здатність підтримувати температуру від -10 до -40.

Подальшу обробку проводять шляхом термостерилізації, застосовуючи контейнер для стерилізації, виготовлений з медичного пластику.

35 Перед початком стерилізації контейнер наповнюється розчином, який повинен покривати голівку стегнової кістки.

Щоб запобігти негативному впливу при подальшому заморожуванні, а саме формування внутрішньоклітинного льоду та зневоднення, використовують кріопротектори.

40 Як найкращий варіант кріопротектора був вибраний повідон, що є розчинний у воді та інших полярних розчинниках, за рахунок утворення водорозчинних комплексів покращує розчинність та біодоступність лікарських речовин, має адсорбуючі, антисептичні, а також кріопротекторні властивості. Розчин повідану є термостійким при температурах до 200 °С, є безпечним та не викликає побічних ефектів.

45 Експериментальним шляхом було встановлено, що найкращі результати показав комплексний кріопротектор такого складу на 100 мл/г:

повідон	6
натрію хлорид	0,550
калію хлорид	0,042
кальцію хлорид гексагідрату	0,050
магнію хлорид гексагідрату	0,0005
натрію гідрокарбонат	0,023
та 1М натрію гідроксид.	

Цей розчин має кріопротекторні та антисептичні властивості, покращує здатність зв'язувати біологічні компоненти, що є важливим для подальшого застосування матриксу для тканинної інженерії.

50 Можливий діапазон термостерилізації від 35 до 140 градусів Цельсія. Час стерилізації залежить від застосованої температури. Підвищення температури скорочує час. Найкраща термостерилізація відбувається при температурі 82,6-83 градусів. Час стерилізації 90 хв.

Аналіз на присутність інфекцій

Після закінчення стерилізації проводять аналіз на присутність інфекції шляхом мікробіологічного дослідження розчину, в якому відбувалася стерилізація. Розчин відбирають з контейнера для стерилізації шприцом, поміщають в стерильну лабораторну пробірку та направляють на аналіз в об'ємі 5-10 мл.

До отримання результатів мікробіологічного аналізу контейнер з матриксом поміщають у холодильне обладнання для тимчасового карантину з неможливістю клінічного застосування та зберігають при температурі -20...-80 градусів Цельсія.

В разі отримання негативних результатів мікробіологічного дослідження розчину та при відсутності негайного використання проводять кріоконсервацію матрикса при температурі -20 - -80 на строк до 5 років.

Подальша обробка матриксу безпосередньо перед використанням матриксу.

За показаннями готують наступні препарати для обробки матриксу

1. Беруть венозну кров пацієнта, якому будуть застосовувати матрикс, центрифугують на низьких обертах до 10 хв. Отриману плазму центрифугують на низьких обертах до 10 хв. Виконують забір верхніх прошарків плазми. Нижній прошарок ретельно перемішують з клітинним осадом на дні пробірки. Отримують збагачену тромбоцитами плазму.

2. Беруть венозну кров пацієнта, якому будуть застосовувати матрикс, у стерильну вакуумну пробірку з діоксидом кремнію, центрифугують на низьких обертах до 10 хв. Отриманий фібриновий згусток вкладається на сітчасту поверхню та притискається до отримання мембрани. Отримують багату тромбоцитами мембрану.

3. Беруть аспірат кісткового мозку, центрифугують на низьких обертах. Плазму, відібрану після осадження формених елементів кісткового мозку центрифугують на високих обертах до 10 хв. Осад формених елементів аспірату розводили 0,9 % NaCl. Мононуклеари з утвореної суспензії клітин виділяли шляхом центрифугування до 15 хв. на низьких обертах.

Отримують концентрат мононуклеарів з аспірату кісткового мозку.

4. Беруть жирову тканину, промивають у фосфатному буфері. Виконують аспірацію буфера. Жирову тканину розчиняють у 0,1 % розчині колагенази в шейкері при температурі 37 градусів. Зрілі адіпоцити та сполучну тканину відділяють від стромальної васкулярної фракції (SVF) шляхом центрифугування при 800 об./хв. Протягом 10 хв. Для видалення еритроцитів отримані клітини ресуспендують у лізуючому буфері (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0.1 mM EDTA) протягом 5 хв. при кімнатній температурі. Клітини промивають у фосфатному буфері та центрифугують при 800 об./хв. протягом 10 хвилин.

За показаннями обробляють або поєднують матрикс з цими препаратами, що забезпечує необхідні індивідуальні відносно до пацієнта імунологічні та регенераційні властивості матриксу.

В результаті проведеної роботи було створено ефективний, доступний та безпечний спосіб приготування кісткового матеріалу, який завдяки розробленій схемі дозволяє без попередньої демінералізації та окремих стадій дезінфекції отримати матрикс кісткового походження, який можна застосовувати при терапії кісткових патологій, враховуючи індивідуальні особливості пацієнтів.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

1. Спосіб приготування кісткового матриксу, що включає підбір донорів, дослідження донорів на наявність інфекційних захворювань, взяття матеріалу, поміщення його в контейнер разом зі стерильною рідиною, що достатня для покриття матеріалу, при цьому контейнер спочатку нагрівають при заданій температурі стерилізації на перший певний період часу, а потім підтримують на цій заданій температурі другий проміжок часу, що залежить від розміру забраного матеріалу; отриманий матрикс переносять у іншу ємкість та заморожують, а рідину, що залишилася у першому контейнері, аналізують на наявність інфекційних агентів, який **відрізняється** тим, що взяття матеріалу виконують під час резекції головки стегнової кістки при ендопротезуванні, при цьому головка стегнової кістки повинна бути не більше 56 мм в діаметрі; після взяття матеріалу його транспортують в стерильних умовах в транспортних контейнерах з можливістю підтримання низької температури під час транспортування від -10 до -40 градусів Цельсія та утримання в контейнері до 20 годин; подальшу обробку проводять шляхом термостерилізації, застосовуючи контейнер для стерилізації, виготовлений з термостійкого матеріалу; контейнер наповнюють кріопротекторним антисептичним розчином, що містить повідон, який повинен покривати голівку стегнової кістки, контейнер переносять до пристрою для стерилізації, що забезпечує температуру від 82,6 до 83 градусів Цельсія на 90 хвилин; після закінчення стерилізації проводять аналіз на присутність інфекції шляхом мікробіологічного дослідження розчину, в якому відбувалася стерилізація, розчин відбирають з контейнера для

- стерилізації шприцом, поміщають в стерильну лабораторну пробірку та направляють на аналіз; до отримання результатів мікробіологічного аналізу контейнер з матриксом поміщають у холодильне обладнання для тимчасового карантину з неможливістю клінічного застосування та зберігають при температурі -20...-80 градусів Цельсія; після отримання негативних результатів
- 5 мікробіологічного дослідження розчину проводять кріоконсервацію матриксу при температурі -20...-80 на строк до 5 років; перед використанням матрикс обробляють біотехнологічними продуктами пацієнта, якому він імплантується, які після забору центрифугують при обертах від 1 до 6 тисяч, відбирають необхідний прошарок утвореної рідини та проводять подальшу обробку в залежності від виду аутологічного матеріалу та показань до пацієнта.
- 10 2. Спосіб приготування кісткового матриксу за п. 1, де як кріопротекторний антисептичний розчин використовують повідон та натрію хлорид, калію хлорид, кальцію хлорид гексагідрату, магнію хлорид гексагідрату, натрію гідрокарбонат, натрію гідроксид у воді для ін'єкцій.
3. Спосіб приготування кісткового матриксу за п. 1, де аутологічні продукти вибирають з групи, до якої входить аутологічна кров, кістковий мозок пацієнта, або застосовують у комбінації.
- 15

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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