



УКРАЇНА

(19) UA (11) 88344 (13) C2
(51) МПК (2009)
A61N 5/01
A61K 36/8962 (2009.01)
A61P 43/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ВИГОТОВЛЕННЯ КСЕНОДЕМОТРАНСПЛАНТАТІВ

1

(21) а200708395
(22) 23.07.2007
(24) 12.10.2009
(46) 12.10.2009, Бюл.№ 19, 2009 р.
(72) БІГУНЯК ВОЛОДИМИР ВАСИЛЬОВИЧ, ГУДА
НАТАЛЯ ВОЛОДИМИРІВНА, БІГУНЯК ГАННА ВО-
ЛОДИМИРІВНА
(73) ПРИВАТНЕ ПІДПРИЄМСТВО "КОМБУСТІО-
ЛОГ"
(56) UA 65673 A, 15.04.2004
UA 50619 A, 15.10.2002
UA 65152 A, 15.03.2004
UA 56172 C2, 15.05.2003
UA 62943 C2, 15.01.2004
RU 2 134 134 C1, 10.08.1999
RU 2 117 505 C1, 20.08.1998
CA 2 346 644 A1, 20.04.2004
(57) 1. Спосіб виготовлення ксенодермотрансплан-
татів, що включає криогенну обробку тканинного

2

субстрату ксеногенної шкіри та наступну його ліо-
філізацію з попередньою обробкою фізичним чин-
ником і просоченням його водним розчином актив-
ної сполуки, який **відрізняється** тим, що клапті
ксеногенної шкіри після завершення етапу криоген-
ної обробки спочатку піддають впливові фізичного
чинника – енергії оптичного випромінювання в
ультрафіолетовій ділянці спектра при дозі опромі-
нення 12000-24000 Джм⁻², потім опромінені клапті
переносять у водний розчин активної сполуки і
інкубують упродовж 30 хв., після чого виконують
етап ліофільного сушіння.

2. Спосіб виготовлення ксенодермотрансплантатів
за п. 1, який **відрізняється** тим, що інкубацію кріо-
консервованих і опромінених клаптів ксеногенної
шкіри здійснюють у водному екстракті цибулини
часнику, взятому у співвідношенні в межах від 1:50
до 1:70 включно.

Винахід стосується медицини і медичної про-
мисловості, зокрема виробництва біопрепаратів, і
може бути використаний у виробництві консерво-
ваних біотрансплантатів.

Відомий спосіб виготовлення ксеродермо-
трансплантатів, що включає криогенну обробку
тканинного субстрату ксеногенної шкіри та наступ-
ну його ліофілізацію з попередньою обробкою фі-
зичним чинником і просоченням його водним роз-
чином активної сполуки [1]. За відомим способом,
клапті шкіри свині після попередньої обробки охо-
лоджують при температурі рідкого азоту, а після
розморожування вносять у розчин активної сполу-
ки і в зануреному в стані піддають впливові енергії
оптичного випромінювання в ультрафіолетовій
ділянці спектру.

Недоліком відомого способу є недостатній рі-
вень біологічної ефективності отриманого ксенот-
рансплантату, що впливає з обмеженої антимік-
робної резистентності накладеного на поверхню
опікової рани клаптя консервованої ксеношкіри.
Недостатня антимікробна резистентність ксено-
генної шкіри може спричинити бактерійну забруд-
неність препарату ще до його застосування з ліку-

вальною метою, особливо, при недотриманні умов
зберігання, а відтак призвести до небажаного при-
скорення відторгнення аплікованого на поверхню
рани тканинного клаптя.

В основу винаходу поставлено завдання вдос-
коналити відомий спосіб, в якому шляхом зміни
послідовності технологічних етапів виготовлення
ксенотрансплантатів і обробки їх активною сполу-
кою з ефективнішою антимікробною активністю
досягають підвищення біологічної ефективності
готового продукту.

При вирішенні поставленого завдання була
взята до уваги здатність фізичних чинників інакти-
вувати молекули біологічних сполук внаслідок їх
біохімічної деградації в результаті індукованих
іонізаційних процесів. Особливо, це стосується
ультрафіолетових променів з високою енергією
фотонів. Натомість, обробка ультрафіолетовими
променями біосубстрату у висушеному стані су-
проводжується переважною активацією молекуляр-
них зв'язків з накопиченням потенціальної енергії
молекулами поверхневого шару опроміненої по-
верхні біосубстрату, зокрема ксеногенної шкіри [2].
Утворені при цьому активні форми кисню (атомар-

(13) C2

(11) 88344

(19) UA

ний, синглетний збуджений молекулярний та озон) забезпечуватимуть додаткову антимікробну резистентність ксеношкіри, а наступна обробка її активною сполукою поза впливом ультрафіолетового опромінювання не буде супроводжуватися фотоінактивацією її молекул вільнорадикальними сполуками, які утворюються зазвичай внаслідок фотогідролізу молекул води та наступних актів її іонізації [3].

До активних сполук, яким притаманні поліпотентні біологічні властивості, серед яких найважливішими є антимікробна, імуномодуляторна та антиоксидна дія, традиційно відносять компоненти часнику (*Alium sativum*), що містяться в його цибулині. Цілющих властивостей надають часнику глікозид аліїн і інші сірковмісні речовини (S-метил-, S-етил-, S-бутил-, S-алкілцистеїнсульфоксиди, S-метилцистеїн та ін.), фітостерини, вітаміни (C, B₁, B₂, B₆, нікотинова кислота), ряд органічних кислот, полісахарид інулін. До складу ефірної олії часнику входять такі органічні сполуки як алкілпохідні цистеїну, диваїнілсульфіди та алілвінілсульфоксид. До характерних відмінностей часнику слід віднести його мінеральний склад, а саме калій, кальцій, натрій, магній, фосфор, залізо, марганець, цинк, йод і мідь [4]. З врахуванням наведеного, стає очевидним, що доцільне з лікувальних позицій збагачення компонентами часнику клаптів ксеношкіри вимагає збереження названих властивостей в ході її виготовлення. Це стосується, перш за все, сірковмісних ефірних сполук з антимікробною та антиоксидною активністю. Для їх збереження і забезпечення біопротекторного ефекту готового препарату ксеношкіри важливим є захист названих сполук від безпосереднього впливу ультрафіолетових променів.

Виходячи з наведених міркувань, поставлене завдання вирішують тим, що у відомому способі виготовлення ксенодермотрансплантатів, що включає кріогенну обробку тканинного субстрату ксеногенної шкіри та наступну його ліофілізацію з попередньою обробкою фізичним чинником і просочення його водним розчином активної сполуки, відповідно до винаходу клапті ксеногенної шкіри після завершення етапу кріогенної обробки спочатку піддають впливові фізичного чинника, зокрема енергії оптичного випромінювання в ультрафіолетовій області спектру при дозі опромінення 12000-24000 Дж·м⁻², а опромінені клапті інкубують у водному розчині активної сполуки, зокрема у водному екстракті цибулини часнику, взятому у співвідношенні в межах від 1:50 до 1:70 включно упродовж 30 хв, після чого виконують етап ліофільної сушки.

Перелік фігур.

Фіг.1. Поляризаційна флуоресценція біологічно активних сполук цибулини часнику;

Фіг.2. Поляризаційна флуоресценція клаптя консервованої ксеношкіри:

1 - контрольний - не просочений водним екстрактом часнику препарат;

2 - дослідний - просочений екстрактом часнику препарат.

Спосіб здійснюють наступним чином. Із завершенням етапу кріоконсервування тканинного субстрату при температурі рідкого азоту розморожені

клапті ксеношкіри розкладають моношаром на спеціальних решітках і обробляють ультрафіолетовими променями ($\lambda_{\text{max}} = 253,7$ нм) від розрядної лампи низького тиску при дозі опромінення 12000-24000 Дж·м⁻². Після цього опромінені клапті занурюють у водний екстракт цибулини часнику, взятому в розведенні в межах від 1:50 до 1:70 та інкубують упродовж 30 хв, після чого проводять етап ліофільної сушки. Контроль технологічного процесу здійснюють за показниками поляризаційної флуоресценції, оскільки сік з цибулини часнику містить компоненти з рідкокристалічними властивостями (сірковмісні S-метил-, S-етил-, S-бутил-, S-алкілцистеїнсульфоксиди, S-метилцистеїн та ін., фітостерини, вітаміни C, B₁, B₂, B₆ та нікотинова кислота, а також алкілпохідні цистеїну, диваїнілсульфіди та алілвінілсульфоксид). Наявність вказаних сполук у водному екстракті проявляється характерною картиною флуоресценції у поляризованому світлі (Фіг.1), а саме у вигляді окремих флуоресціюючих зерен розміром від 1 до 20 мкм. Збагачення клаптів ксеногенної шкіри біологічно активними компонентами екстракту цибулини часнику контролюють шляхом порівняння картини поляризаційної флуоресценції непросочених 1 і просочених 2 мікропрепаратів (Фіг.2). Оброблені водним екстрактом часнику клапті ксеношкіри світяться у поляризованому світлі інтенсивніше, ніж контрольні, що свідчить про накопичення ними високоенергетичних сполук з рідкокристалічними властивостями, що, власне, і є відображенням досягнення потрібного рівня біофізіологічної активності готового продукту.

Приклад 1.

Клапті тканинного субстрату безпосередньо після завершення етапу кріоконсервування при температурі рідкого азоту розклали моношаром на спеціальних решітках і обробляли ультрафіолетовими променями від розрядної лампи низького тиску типу БУВ-15 з відстані 20 см на площі (20×40) см відповідно до проекції лампи упродовж 10 хв, що відповідало сумарній дозі опромінення 15000 Дж·м⁻². Після цього опромінені клапті помістили у водний екстракт цибулини часнику, взятому в розведенні 1:60, і утримували в ньому протягом 30 хв. Інкубовані клапті ксеношкіри розклали на решітці і перенесли в сублиматор для ліофілізації. Готовий продукт помістили у стерильний бокс і відібрали зразки для проведення передбачених технологічним процесом морфологічного і бактеріологічного аналізів. Контроль рівня збагачення ксеногенної шкіри компонентами екстракту часнику провели за характером поляризаційної флуоресценції отриманого взірця препарату. Спостерегали посилення поляризаційної флуоресценції мікроstruktur препарату ксеношкіри, що засвідчило досягнення потрібного рівня збагачення її компонентами екстракту часнику.

Приклад 2.

Готовий продукт - збагачену компонентами екстракту часника ліофілізовану ксеношкіру досліджували на бактерійну чистоту. На чашки Петрі з живильним середовищем вміщували по 5 клаптиків ксеношкіри у вигляді кружечків діаметром 5 мм. Чашки з клаптиками витримували в термостаті при

37 °C впродовж 24 год. Із 40 проб у жодній не відмічено росту мікроорганізмів.

Приклад 3.

На чашки Петрі з живильним середовищем засівали культуру палички Протея, після чого на кожну з чашок вміщували (накладали зверху в центрі чашки) по одному клаптику ксеношкіри діаметром 15 мм. В усіх тестових пробах (18 чашок) спостерігали затримку росту культури мікроорганізму у вигляді крайового лізису довкола кружечків ксеношкіри. Середній діаметр зони лізису мікроорганізмів в чашках Петрі (вимірюючи від центру кружечків) склав $(28,6 \pm 3,1)$ мм, що перевищувало діаметр кружечків на $(46,6 \pm 8,6)\%$.

Приклад 4.

Рівень антиоксидного потенціалу виготовленої за запропонованим способом ксеношкіри визначали за показником резистентності мембран еритроцитів у стандартизованій суспензії до кислотного чинника [5]. Для цього до контрольної і дослідної проб крові у розведенні 1: 50 на ізотонічному розчині натрію хлориду в фотометричних кюветах вносили рівні за масою два клаптики ксеношкіри: контрольний, виготовлений за відомим способом, та дослідний. Після 10-хвилинної інкубації клаптики виймали, а до обох кювет з суспензією еритроцитів вносили рівний за об'ємом розчин гемолітика, а саме розчин 10^{-3} М HCl на ізотонічному розчині натрію хлориду, та реєстрували реакцію кислотного гемолізу. Резистентність еритроцитів виявилася на $(19,4 \pm 2,1)\%$ вищою в тестових пробах з дослідною ксеношкірою, порівняно з виготовленою за відомим способом, що слід поставити у зв'язок з дією компонентів екстракту часнику завдяки їх вираженій антиоксидній активності.

Приклад 5.

В експерименті на 5 морських свинках дослідили ефективність приживлення виготовлених за запропонованим способом клаптиків ксеношкіри до пошкодженої в результаті глибокого опіку (ІІІАБ-ІV ст.) поверхні шкіри.

Зокрема, встановлено, що застосування виготовлених за запропонованим способом ксенотрансплантатів для закриття ран після ранньої некректомії в лікуванні глибоких опіків суттєво покращує стан опікової рани.

Так, спостерігали активний регенераційний процес, перш за все, у вигляді формування соковитої грануляційної тканини та інтенсивного зменшення площі рани за три тижні на $(30 - 46)\%$ за рахунок вираженої крайової епітелізації. Значною

мірою цьому сприяє інтенсивний розвиток колатеральних гемокапілярів у пошкодженій шкірі лабораторних тварин, що покращує трофіку уражених тканин і сприяє швидкій епітелізації ранової поверхні. Збагачені активними сполуками екстракту часнику, ліофілізовані ксенодермотрансплантати виявили виражені адсорбційно-антиоксидні та антимікробні властивості. Накладені відразу після некректомії на рани, вони залишалися фіксованими на них упродовж трьох тижнів, а після видалення з рани останні були чистими, повністю готовими до наступного лікувального етапу у вигляді аутодермопластики.

Таким чином, запропонований спосіб забезпечує виготовлення ксенотрансплантату з вищим, ніж за відомим способом, рівнем біологічної ефективності, що проявляється надійною антимікробною резистентністю клаптів ксеношкіри як готового препарату медичного призначення, так і під час застосування з лікувальною метою, а також високим рівнем антиоксидної спроможності, завдяки чому виготовлений за запропонованим способом препарат ксеногенної шкіри знайде застосування в широкій медичній практиці.

Джерела інформації:

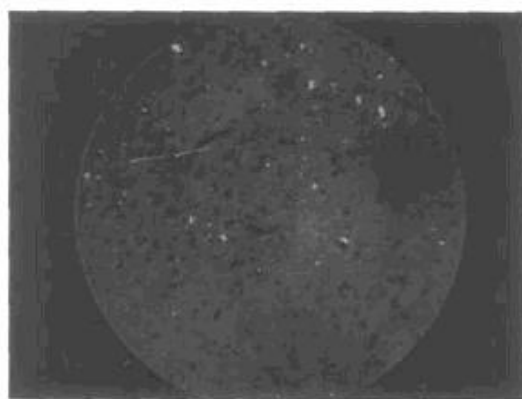
1. Пат. 65673 А, Україна. А01N1/02, А61Н39/00. Спосіб виготовлення ксенодермотрансплантатів /Бігуняк В.В., Бігуняк Н.В. - № 2000105763; Заявл. 11.10.2000; Опубл. 15.04.2004, Бюл. № 4.

2. Пат. 36811 А, Україна. Спосіб визначення антиоксидної здатності замінників шкіри. Дем'яненко В.В., Бех М.Д., Кулянда І.С., Бігуняк Н.В. - № 2000020758; 11.02.2000; Опубл. 16.04.2001, Бюл. № 2.

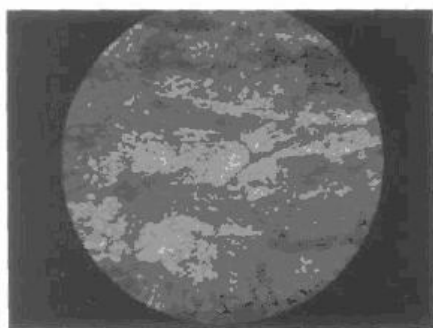
3. Пат. 62943, Україна. А61L2/10, А61В17/322. Спосіб передопераційної підготовки консервованих ксенодермотрансплантатів та пристрій для його здійснення /Бігуняк В.В., Ковальчук Н.А., Дем'яненко В.В., Яцкевич А.Я., Бігуняк Н.В. - № 99042360; Заявл. 27.04.99; Опубл. 15.01.2004, Бюл. № 1.

4. Лікарські рослини. Енциклопедичний довідник. За ред. акад. А.М. Гродзінського. - К., 1989. - С. 222.

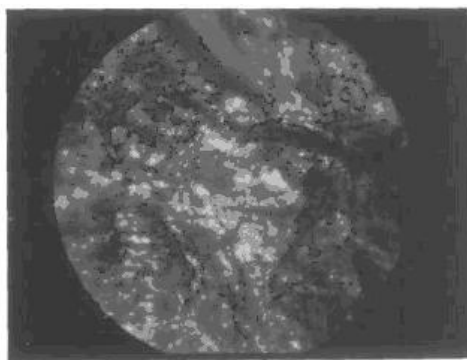
5. Пат. 7217, Україна. А01N1/00, G05D11/16. Спосіб визначення оптимального режиму криогенної обробки біотрансплантатів /Бігуняк Н.В., Бігуняк Т.В. - № 20041108922; Заявл. 01.11.2004; Опубл. 15.06.2005, Бюл. № 6.



Фиг. 1



1



2

Фиг. 2