



(51) МПК  
*A61L 27/24* (2006.01)  
*A61L 27/56* (2006.01)  
*B01D 11/02* (2006.01)  
*A61F 2/28* (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА  
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ**

(52) СПК

*A61L 27/24* (2019.02); *B01D 11/02* (2019.02); *A61F 2/28* (2019.02)

(21) (22) Заявка: 2018139204, 07.11.2018

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:  
 07.11.2018

Дата регистрации:  
 25.04.2019

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 07.11.2018

(45) Опубликовано: 25.04.2019 Бюл. № 12

Адрес для переписки:

142290, Московская обл., г. Пушкино, мкр. "Д",  
 21, кв. 49, Фадеевой Ирине Сергеевне

(72) Автор(ы):

Сенотов Анатолий Сергеевич (RU),  
 Акатов Владимир Семенович (RU),  
 Фадеева Ирина Сергеевна (RU),  
 Кирсанова Полина Олеговна (RU),  
 Минайчев Владислав Валентинович (RU),  
 Фадеев Роман Сергеевич (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Акатов Владимир Семенович (RU),  
 Сенотов Анатолий Сергеевич (RU),  
 Фадеева Ирина Сергеевна (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете  
 о поиске: RU 2342162 C1, 27.12.2008. RU  
 2609201 C1, 30.01.2017. WO 2005082432 A1,  
 09.09.2005. Кирилова И.А. КОСТНАЯ  
 ТКАНЬ КАК ОСНОВА  
 ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ  
 МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ  
 ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОЙ  
 СТРУКТУРЫ. "Хирургия позвоночника".  
 2011; (1):068-074., doi.org/10.14531/ss2011.1.68-  
 74.

(54) СПОСОБ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА ИЗ КОСТНОЙ ТКАНИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к способу изготовления коллагенового остеопластического материала из костной ткани, заключающемуся в том, что после механической очистки и фрагментации материал отмывают нагретым до 45-50°C физраствором в течение 30 мин, выполняют обработку раствором 3% пероксида водорода в воде в виде 3 циклов по 10 минут с отмывкой физраствором при 45-50°C, а вместо обработки папаином выполняют обработку раствором 0.1-0.5% липазы в забуференном физиологическом растворе при pH 8.0 в течение 2 суток, затем промывают физиологическим раствором, обрабатывают смесью хлороформа с водой (1:1) в течение 1-3 суток с периодической заменой смеси по мере ее помутнения, отмывают

хлороформ раствором 20-30% этанола в воде в течение 6-12 часов, а затем физиологическим раствором при пятикратной смене растворов, выполняют деминерализацию материала раствором 0.6 М соляной кислоты в воде в течение 0,25-1 часа при температуре 4-6°C в условиях перемешивания и смене раствора на свежий каждые 15 мин, затем обрабатывают раствором 5% тиосульфата натрия в воде в течение 3 ч, промывают 10-кратной сменой дистиллированной воды, и нормализуют в забуференном физиологическом растворе pH7.4 в течение 7 суток при комнатной температуре и при смене раствора на свежий 3 раза в сутки, причем соотношение объемов костной ткани и смесей или растворов для обработки или отмывки

составляет 1:4-1:6, обработку и отмывку выполняют в условиях перемешивания при 40-50°C, если не указана другая температура, а деминерализацию выполняют при периодическом вакуумировании до 10-30 мм рт.ст. и нормализации давления газовой фазы над

материалом с периодом 2-10 мин. Способ позволяет получить материал с высокой степенью сохранения структуры коллагенового матрикса, биосовместимости, биоинтеграции, и остеопластического потенциала. 3 ил., 3 пр.

RU 2686309 C1

RU 2686309 C1



FEDERAL SERVICE  
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**(19) **RU** (11) **2 686 309**<sup>(13)</sup> **C1**

(51) Int. Cl.  
*A61L 27/24* (2006.01)  
*A61L 27/56* (2006.01)  
*B01D 11/02* (2006.01)  
*A61F 2/28* (2006.01)

(52) CPC

*A61L 27/24 (2019.02); B01D 11/02 (2019.02); A61F 2/28 (2019.02)*(21) (22) Application: **2018139204, 07.11.2018**(24) Effective date for property rights:  
**07.11.2018**Registration date:  
**25.04.2019**

Priority:

(22) Date of filing: **07.11.2018**(45) Date of publication: **25.04.2019** Bull. № 12

Mail address:

**142290, Moskovskaya obl., g. Pushchino, mkr. "D",  
21, kv. 49, Fadeevoy Irine Sergeevne**

(72) Inventor(s):

**Senotov Anatolij Sergeevich (RU),  
Akotov Vladimir Semenovich (RU),  
Fadeeva Irina Sergeevna (RU),  
Kirsanova Polina Olegovna (RU),  
Minajchev Vladislav Valentinovich (RU),  
Fadeev Roman Sergeevich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Akatov Vladimir Semenovich (RU),  
Senotov Anatolij Sergeevich (RU),  
Fadeeva Irina Sergeevna (RU)**(54) **METHOD FOR PRODUCING OSTEOPLASTIC MATERIAL FROM BONE TISSUE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; biochemistry.

SUBSTANCE: invention relates to a method for production of collagenous osteoplastic material from bone tissue, consisting in the fact that after mechanical cleaning and fragmentation material is washed up heated to 45–50 °C saline solution for 30 minutes is treated with solution of 3 % hydrogen peroxide in water in form of 3 cycles for 10 minutes with washing with saline solution at 45–50 °C, and instead of papain treatment, treating with 0.1–0.5 % lipase in buffered physiologic saline at pH 8.0 for 2 days, then washed with physiologic saline, treated with a mixture of chloroform with water (1:1) for 1–3 days with intermittent replacement of the mixture as it becomes turbid, chloroform is washed with solution of 20–30 % ethanol in water for 6–12 hours, and then with physiological solution at fivefold change of solutions, material is demineralised with solution of 0.6 M hydrochloric acid in water for 0.25–1 hours at

temperature 4–6 °C under conditions of mixing and changing solution to fresh solution every 15 minutes, then treated with 5 % sodium thiosulphate solution in water for 3 hours, washed with 10-fold change of distilled water, and normalized in buffered physiological solution of pH 7.4 for 7 days at room temperature and with change of solution to fresh 3 times a day, wherein ratio of volumes of bone tissue and mixtures or solutions for treatment or washing is 1:4–1:6, treatment and washing are performed in conditions of mixing at 40–50 °C, unless other temperature is specified, and demineralisation is performed at periodic evacuation to 10–30 mm Hg and gas phase pressure normalization over material with period of 2–10 minutes.

EFFECT: method enables to obtain material with high degree of preservation of collagen matrix structure, biocompatibility, bio-integration, and osteoplastic potential.

1 cl, 3 dwg, 3 ex

RU 2 686 309 C 1

RU 2 686 309 C 1

Изобретение относится к области регенеративной медицины и предназначено для хирургического лечения дефектов костной ткани в травматологии, ортопедии, челюстно-лицевой хирургии и стоматологии в качестве способа изготовления коллагенового остеопластического материала.

5 Известно, что кость обладает ограниченным регенеративным потенциалом, особенно в дефектах большого, критического, размера, и поэтому для хирургического восстановления утраченной костной ткани используют остеопластические материалы. Остеопластические материалы должны обладать набором характеристик, обеспечивающих их биосовместимость и биоинтеграцию, остеокондуктивные свойства,  
10 миграцию мезенхимальных клеток в материал и сбалансированное построение костной ткани, процессы ее ремоделирования, а также остеоиндуктивными свойствами, вызывая дифференцировку прогениторных клеток, мигрирующих в материал, в остеогенные (остеобласты, остеокласты). Остеопластические материалы не должны вызывать бурной провоспалительной реакции, быстрой резорбции. В настоящее время недостаточно  
15 знаний для точного расчета характеристик остеопластических материалов, и поэтому они разрабатываются на основе общих принципов.

Одним из наиболее распространенных остеопластических материалов является деминерализованный костный матрикс аллогенного и ксеногенного происхождения. Для изготовления таких материалов из донорской кости удаляют жировые клеточные  
20 компоненты, протеогликаны, чтобы исключить провоспалительную реакцию, а также проводят частичную или полную деминерализацию, полагая, что гидроксиапатит, с одной стороны является важным компонентом в индукции остеогенных свойств, а с другой стороны большое количество гидроксиапатита может сильно затормозить остеогенез в материале. Способы получения остеопластических материалов на основе  
25 деминерализованного костного матрикса должны эффективно удалять провоспалительные компоненты, а с другой стороны, сохранять остеоиндуктивные факторы, такие как морфогенетические белки, ассоциированные с матриксом костной ткани, не нарушать пространственную структуру коллагенового матрикса, поскольку ее повреждение способно инициировать быструю резорбцию материала и  
30 провоспалительную реакцию. К настоящему времени предложен ряд способов получения остеопластического материала на основе деминерализованной костной ткани различной формы (крошка, блоки, пластины), направленных на решение этой комплексной задачи.

Известен способ получения деминерализованного костного матрикса в виде крошки (патент РФ №2456003, опубл. 20.07.2012), в котором после механической очистки и  
35 фрагментации костной ткани проводят ее обработку водным раствором 2% неионного детергента Tween-80 в течение 12-24 ч, затем материал обрабатывают 24-48 ч смесью изопропанол-хлороформ (1:1) в ультразвуковой ванне, отмывают водой, выполняют деминерализацию раствором 0.6 М соляной кислоты, в течение 30-90 мин, и далее материал промывают дистиллированной водой, этиловым спиртом, высушивают и  
40 дополнительно измельчают до необходимых размеров.

Недостатком этого способа является то, что удаление жировой компоненты костной ткани путем обработки смесью изопропанол-хлороформ вызывает удаление воды из матрикса, его избыточное высушивание, делает его хрупким, нарушая его  
межмолекулярную структуру и тем самым усиливает реакцию организма против  
45 имплантата, ускоряет его резорбцию, нарушает остеокондуктивные свойства материала.

Известен способ получения остеопластического материала (патент РФ №6092012, опубл. 30.01.2017), согласно которому губчатую костную ткань после механической обработки и фрагментации обрабатывают гипертоническим раствором хлористого

натрия (1-10%) 1-8 суток, затем выполняют глубокую очистку путем удаления жировых компонент неколлагеновых белков методом сверхкритической флюидной экстракции, а после этого выполняют деминерализацию раствором соляной кислоты (0.5-4 М) 15-300 мин и лиофилизацию в течение 1-48 ч.

5 Недостатком этого способа является то, что обработка в сверхкритической жидкости двуокиси углерода способна обеспечить глубокую очистку материала, но при этом происходит значительное повреждение структуры коллагенового матрикса. Обработка в сверхкритической жидкости вызывает даже стерилизацию материала, повреждая микроорганизмы и вирусы. Механизм повреждения субмолекулярных структур (вирусы,  
10 бактерии, коллагеновый матрикс) связан, в частности, с градиентами давления, возникающими в процессе установления сверхкритических условий (Сулов А.В. и др. Инактивация микроорганизмов в среде сверхкритического CO<sub>2</sub>. Сверхкритические флюиды. Теория и практика, 2008, т. 3 №3, с. 3-11), что особенно значимо может проявляться в неоднородных средах, к которым можно отнести и костную ткань. Кроме  
15 того, глубокая очистка в сверхкритических условиях будет удалять из материала остеоиндуктивные факторы, такие как морфогенетические белки, ростовые факторы, и тем самым подавлять остеопластические свойства материала. Другой недостаток способа состоит в том, что обработка раствором 0.6 М HCl будет усиливать повреждения коллагенового матрикса, вызванные обработкой костной ткани в сверхкритической  
20 среде CO<sub>2</sub>, и тем самым усиливать реакцию организма против имплантата, ускорять его резорбцию, нарушать остеопластические свойства материала.

Наиболее близким, принятым за прототип, является способ получения биоматериалов из костной ткани и полученный этим способом материал для остеопластики и тканевой инженерии (патент РФ №2342162, опубл. 27.12.2008), в котором костную ткань после  
25 механической очистки и фрагментации отмывают нагретым до 65°C 0,1 М фосфатным буфером с рН 5,8-6,0, затем обрабатывают в растворе 0.1-0.4% папаина при 65°C в течение 24 часов, затем промывают водой при 40-80°C, обрабатывают раствором 0.4 М щелочи в течение 10-24 часов, отмывают в проточной воде, высушивают и  
30 обезжиривают в смесях этанол-хлороформ, проводят частичную или полную декальцинацию в кислотной среде, обрабатывают раствором пероксида водорода, отмывают водой, высушивают, упаковывают и стерилизуют.

Недостатком известного способа, принятого за прототип, является то, что обработка в растворе 0.1-0.4% папаина при 65°C в течение 24 часов повреждает коллагеновый  
35 матрикс материала, переваривает его, нарушая тем самым его структуру и усиливая реакцию организма на материал, снижая его остеопластический потенциал. Еще одним недостатком является длительная обработка в растворе 0.4 М щелочи, способном вызывать повреждение коллагенового матрикса. Другим недостатком является то, что обработка в смесях этанол-хлороформ вызывает удаление воды из матрикса, высушивает  
40 его, делает более хрупким и более чувствительным к повреждающему действию кислотных растворов в последующем процессе деминерализации и в целом усиливает реакцию организма на материал, ускоряет резорбцию материала и снижает его остеопластические свойства.

Задачей настоящего изобретения является создание способа изготовления  
45 остеопластического материала из костной ткани на основе разработки щадящих методов очистки от жира и неколлагеновых белков, деминерализации, обеспечивающих сохранение структуры коллагенового матрикса, его биосовместимость, биоинтеграцию и остеопластические свойства материала.

Решение поставленной задачи и технический результат достигаются тем, что в

известном способе, включающем механическую очистку, фрагментацию, удаление жировых и белковых неколлагеновых составляющих, ее деминерализацию, сопровождающихся отмывками реагентов, после механической очистки и фрагментации материал отмывают нагретым до 45-50°C физраствором, выполняют обработку раствором 3% пероксида водорода в воде в виде 3 циклов по 10 минут в течение 30 мин, далее выполняют обработку раствором 0.1-0.5% липазы в забуференном физиологическом растворе при рН 8.0 в течение 2 суток, затем промывают физиологическим раствором, обрабатывают смесью хлороформа с водой (1:1) в течение 1-3 суток с периодической заменой смеси по мере ее помутнения, отмывают хлороформ раствором 20-30% этанола в воде в течение 6-12 часов, а затем физиологическим раствором при пятикратной смене растворов, выполняют деминерализацию материала раствором 0.6 М соляной кислоты в воде в течение 0,25-1 часа при температуре 4-6°C в условиях перемешивания и смене раствора на свежий каждые 15 мин, затем обрабатывают раствором 5% тиосульфата натрия в воде в течение 3 ч, промывают 10-кратной сменой дистиллированной воды, и нормализуют в забуференном физиологическом растворе рН7.4 в течение 7 суток при комнатной температуре и при смене раствора на свежий 3 раза в сутки, причем соотношение объемов костной ткани и смесей или растворов для обработки или отмывки составляет 1:4-1:6, а обработку и отмывку выполняют в условиях перемешивания при 40-50°C, если не указана другая температура, и обработку пероксидом водорода и деминерализацию выполняют при периодическом вакуумировании до 50-100 мм рт.ст. и нормализации давления газовой фазы над материалом с периодом 2-10 мин.

Первичная обработка раствором при 45-50°C в течении 0.5 ч обеспечивает вытекание легкоплавких жиров, а последующая обработка раствором пероксида водорода в условиях вакуумирования и нормализации давления над обрабатываемым материалом и отмывкой физраствором при 45-50°C позволяет быстро и эффективно очистить поверхность и убрать жир из приповерхностных областей материала и обеспечить его первичную стерилизацию. Указанное время является оптимальным и определено экспериментально. Снижение температуры раствора до 45-50°C также является фактором, способствующим сохранению структуры коллагенового матрикса, поскольку известно, что обработка при 65°C и рН 5.8-6.0, как предложено в прототипе, способна вызывать повреждение коллагена. Использование раствора липазы в физрастворе рН 8.0 при 45-50°C позволяет сочетать удаление легкоплавких жиров и расщепление жиров на глицерин и высшие жирные кислоты, ускоряя их выход из толщи ткани, и эмульгирование в растворе без повреждения коллагенового матрикса. Последующая обработка материала в двухфазной смеси хлороформа и воды (1:1) при 45-50°C позволяет извлекать расщепленные жирные кислоты из материала без пересушивания и повреждения его матрикса, как это происходит при обработке в смесях хлороформа с этанолом или пропанолом в прототипе. Быстрая (15-60 мин) деминерализация при 4-6°C также является важной составляющей предложенного способа, обеспечивает эффективное удаление минеральной составляющей при сохранении структуры коллагенового матрикса даже во фрагментах кости толщиной 1 см, длиной/шириной 3-5 см. При такой температуре происходит меньшее повреждение коллагена в растворе кислоты. Варьируя время обработки раствором HCl можно регулировать частичную или полную деминерализацию материала. Последующая обработка тиосульфатом обеспечивает первичную нейтрализацию хлора, который имеет высокое сродство к коллагену и связывается с ним в ходе деминерализации. Именно поэтому, в отличие от прототипа, в предлагаемом способе используется обработка тиосульфатом натрия в

течение 4 часов. Последующая многосуточная отмывка определена экспериментально под контролем тестов изменений рН отмывочной, а также токсикологических тестов материала после отмывок. Важное значение для изготовления материала имеет порядок и временные характеристики способа, в том числе и заключительной отмывки, а также

5 выполнение обработки растворами пероксида водорода и соляной кислоты в условиях периодического вакуумирования и нормализации давления газа и паров растворов над материалом, поскольку это значительно повышает эффективность процессов очистки и деминерализации материала, и снижает время воздействия, например, соляной кислоты, на коллагеновый матрикс.

10 Способ изготовления остеопластического материала из костной ткани осуществляется следующим образом.

Ксеногенный костный материал полученный от сельскохозяйственных животных, прошедших ветеринарный контроль, или донорскую кость человека после необходимых анализов механически очищают от мышц и сухожилий, фрагментируют путем

15 распиливания на блоки толщиной 1 см, шириной и длиной в диапазоне от 1 до 10 см, либо путем дробления на частицы 0,3-2 мм в условиях охлаждения в диапазоне 0-6°C. Полученные фрагменты промывают нагретым до 45-50°C физраствором в течение 0.5 часа, затем обрабатывают раствором 3% пероксида водорода в воде, 3 цикла по 10 минут с отмывкой физраствором при 45-50°C в условиях периодического

20 вакуумирования до 50-100 мм рт.ст и нормализации давления газовой фазы над материалом до 1 атм, после этого выполняют обработку раствором 0.1-0.5% липазы в забуференном физиологическом растворе при рН 8.0 в течение

2 суток при температуре 40-50°C, затем промывают физиологическим раствором, обрабатывают смесью хлороформа с водой (1:1) в течение 1-3 суток при 45-50°C с

25 периодической заменой смеси по мере ее помутнения, отмывают хлороформ раствором 20-30% этанола в воде в течение 6-12 часов, а затем физиологическим раствором при пятикратной смене растворов при 45-50°C, затем выполняют деминерализацию материала раствором 0.6 М соляной кислоты в воде в течение 0,25-1 часа при температуре 4-6°C в условиях периодического вакуумирования - нормализации давления

30 и смены раствора на свежий каждые 15 мин, затем обрабатывают раствором 5% тиосульфата натрия в воде в течение 3 ч, промывают 10-кратной сменой дистиллированной воды, и нормализуют в забуференном физиологическом растворе рН7.4 в течение 5-9 суток при комнатной температуре и при смене раствора на свежий 3 раза в сутки, причем соотношение объемов костной ткани и смесей или растворов

35 для обработки или отмывки составляет 1:4-1:6. После этого обработанные фрагменты подвергают сушке, лиофилизации, упаковывают и стерилизуют.

После обработки материал подвергают тестированию на содержание минерализованного кальция, гликозаминогликанов и жиров спектрофотометрическими способами, на биосовместимость, биоинтеграцию и остеопластические свойства

40 методами культуры клеток животных и гетеротопической имплантации экспериментальным животным с последующим гистологическим анализом эксплантированных образцов.

Представленный способ обеспечивает получение остеопластического материала, характеризующегося высокой степенью очистки от жировых компонентов,

45 протеогликанов, сохранением структуры коллагенового матрикса, низкой степенью иммуногенности, высокой степенью биосовместимости, биоинтеграции и остеогенности.

Ниже представлены примеры реализации способа изготовления остеопластического материала из костной ткани.

Пример 1. Получение деминерализованной костной крошки размером 0.3 мм - 2 мм из костей крупного рогатого скота.

Кости крупного рогатого скота, на которую имеются документы ветеринарного контроля, получают в течение 24 часов после забоя. Полученные кости механически очищают от мягких тканей (мышц, сухожилий), на фрагменты размерами 2-5 см и дробят их в условиях охлаждения до 4-6°C на фрагменты размером 0.3-2 мм. Полученные фрагменты помещают в сосуд, заливают физиологическим раствором (0.9% хлористого натрия) при соотношении объемов кости и раствора 1:5, нагретого до 50°C и инкубируют при этой температуре в условиях перемешивания 15 мин, затем физраствор меняют на свежий и повторяют цикл обработки. После этого физраствор сливают, заливают раствор 3% пероксида водорода в воде, нагретый до 45°C, подключают к системе вакуумирования, вакуумируют до 70 мм рт.ст., инкубируют 10 мин при 45°C, нормализуют давление до 1 атм, сливают раствор пероксида водорода, промывают физраствором, заливают свежий раствор пероксида водорода и повторяют такой цикл обработки еще 1 раз. После этого фрагменты ткани заливают раствором 0.25% липазы в забуференном физиологическом растворе при рН 8.0, при соотношении объемов фрагментов и раствора 1:5 и инкубируют в условиях перемешивания в течение 1 суток при температуре 45°C, затем промывают физиологическим раствором при 50°C, физраствор удаляют и наливают в сосуд с фрагментами смесь хлороформа и воды (соотношение объемов 1:1), инкубируют в течение 1 суток с периодической заменой смеси по мере ее помутнения, отмывают хлороформ раствором 20% этанола в воде в течение 6 часов, а затем промывают физиологическим раствором при пятикратной смене растворов при 50°C. Затем к фрагментам материала добавляют раствор 0.6 М соляной кислоты, в воде, охлажденный до 4°C, подключают к системе вакуумирования, вакуумируют до 100 мм.рт.ст., инкубируют в условиях перемешивания 10 мин при 4°C, нормализуют давление, удаляют раствор, заливают свежий и повторяют этот цикл деминерализации 1 раз. После этого фрагменты промывают физраствором при комнатной температуре, заливают раствором 5% тиосульфата натрия (соотношение объемов кости и раствора 1:1), инкубируют в условиях перемешивания 10 мин при комнатной температуре, сливают раствор, ополаскивают дистиллированной водой, затем заливают свежий раствор тиосульфата натрия и повторяют этот цикл обработки еще 4 раза. Затем фрагменты заливают физраствором (0.9% хлористого натрия, соотношение объемов материала и раствора 1:5) и инкубируют при комнатной температуре, в условиях перемешивания, при смене раствора 3 раза в сутки, контролируя величину рН раствора после каждой инкубации и оценивая таким образом нормализацию материала. После этого фрагменты высушивают в лиофильной сушке 1 сут, упаковывают и подвергают стерилизации.

Окраска Суданом 3 показывает полное удаление липидов из фрагментов. Количественная оценка, выполненная по методу, описанному в патенте РФ №2456003, показала наличие 0,2 мг.липидов/г.материала, что в 8 раза меньше чем в материале изготовленном способом, предложенном в прототипе. Спектрофотометрический анализ с использованием набора Арсеназо III (Диакон, Москва), показал полное удаление минерализованного кальция (0,5±0,4 мг кальция /г сухого веса материала). Остаточная влага (оценивали по методу, описанному в пат. РФ №2456003) составляла 4%. Сканирующая электронная микроскопия свидетельствует о сохранении структуры коллагенового матрикса после обработки. Анализ цитотоксичности материала, выполненный на основе изучения роста культуры клеток пульпы зуба человека в питательной среде, предварительно инкубированной в течении суток с материалом,

при соотношении объемов материала и среды 1:1, показал сохранение пролиферации клеток на уровне 100 в сравнении с ростом клеток в контрольной питательной среде (без инкубации с материалом). Гистологическое исследование после подкожной имплантации материала экспериментальным животным (окраски по Мак Ги Расселу, гематоксилином Майера и эозином, Голднера-Масона), свидетельствует о высокой биосовместимости, биоинтеграции материала, об отсутствии резорбции материала, о построении структурированного неколлагенового матрикса после 6 и 13 недель имплантации.

На фиг 1. Представлена структура деминерализованного трабекулярного матрикса изготовленной костной крошки, указывающие на высокую степень очистки и сохранение структуры матрикса. На фиг. 2 представлен спектральный состав полученного коллагенового матрикса. На фиг. 3 представлены микрофотографии гистологических препаратов материала после 13 недель гетеротопической имплантации экспериментальным животным, свидетельствующий о высоком остеопластическом потенциале материала (построение неколлагенового структурированного матрикса).

Пример 2. Получение деминерализованных фрагментов губчатой кости быка размером 1 см × 1 см × 1 см

Кость крупного рогатого скота получают при наличии документов ветеринарного контроля в течение 24 часов после забоя. Полученную кость механически очищают от мягких тканей (мышц, сухожилий), распиливают таким образом, что получают фрагменты губчатой кости размером 1 см × 1 см × 1 см. Полученные фрагменты помещают в сосуд, заливают физиологическим раствором (0.9% хлористого натрия) при соотношении объемов кости и раствора 1:5, нагретого до 50°C и инкубируют при этой температуре в условиях перемешивания в термошейкере Biosun 100 при 100 об.

/ми 15 мин, затем физраствор меняют на свежий и повторяют цикл обработки. После этого физраствор сливают, заливают раствор 3% пероксида водорода в воде, нагретый до 45°C, подключают к системе вакуумирования, вакуумируют до 70 мм рт.ст., инкубируют 10 мин при 45°C, нормализуют давление до 1 атм, сливают раствор пероксида, промывают физраствором, заливают свежий раствор пероксида и повторяют такой цикл обработки еще 2 раза. После этого фрагменты ткани заливают раствором 0.25% липазы в забуференном физиологическом растворе при рН 8.0, при соотношении объемов фрагментов и раствора 1:5 и инкубируют в термошейкере в течение 2 суток при температуре 45°C, затем промывают физиологическим раствором при 50°C, физраствор удаляют и наливают в сосуд с фрагментами смесь хлороформа и воды

(соотношение объемов 1:1), инкубируют в течение 1 суток с периодической заменой смеси по мере ее помутнения, отмывают хлороформ раствором 20% этанола в воде в течение 6 часов, а затем промывают физиологическим раствором при пятикратной смене растворов при 50°C. Затем к фрагментам материала добавляют раствор 0.6 М соляной кислоты, в воде, охлажденный до 4°C, подключают к системе вакуумирования, вакуумируют до 100 мм.рт.ст., инкубируют 15 мин при 4°C, нормализуют давление, удаляют раствор, заливают свежий и повторяют этот цикл деминерализации еще 1 раз.

После этого фрагменты промывают физраствором при комнатной температуре, заливают раствором 5% тиосульфата натрия (соотношение объемов кости и раствора 1:1), инкубируют при комнатной температуре 10 мин, сливают раствор, ополаскивают дистиллированной водой, затем заливают свежий раствор тиосульфата натрия и повторяют этот цикл обработки еще 10 раз. Затем фрагменты заливают физраствором (0.9% хлористого натрия, соотношение объемов материала и раствора 1:5) и инкубируют при комнатной температуре, в условиях перемешивания на шейкере, при смене раствора

3 раза в сутки, в течение 5 суток, контролируя величину рН раствора после каждой инкубации и оценивая таким образом нормализацию материала. После этого фрагменты высушивают в лиофильной сушке 1 сут, упаковывают и подвергают стерилизации.

Характеристики материала по степени очистки от жиров, деминерализации, а также цитологический анализ на отсутствие цитотоксичности на высокую степень биосовместимости, биоинтеграции и остеопластических свойств в моделях имплантации экспериментальным животным показал характеристики сравнимые с тем, что описаны в примере 1.

Пример 3. Получение деминерализованных фрагментов губчатой кости быка размером 1 см × 2 см × 5 см

Изменения способа изготовления фрагментов такого размера в сравнении с фрагментами в примере 1 касаются в первую очередь временных режимов обработки и связаны с осложнением удаления жиров и деминерализации по мере увеличения размером фрагментов кости. Начальный этап выполняют, как и в примере 1, включая механическую очистку, распиливание образцов на фрагменты 1 см × 2 см × 5 см, обработку физиологическим раствором и раствором пероксида водорода при 45°C. Последующая обработка раствором липазы выполняется также, как и в примере 1, но время обработки увеличено до 2 суток в связи с увеличением размеров фрагментов. Также увеличено время обработки смесью флороформа и воды с 1 суток до 3 суток в сравнении с примером 1, время деминерализации с 30 до 60 мин., и время нормализации материала путем окончательного удаления реагентов из него с 5 суток до 7 суток. Химический анализ показал высокую степень удаления жиров, минерализованного кальция, протеогликанов. Цитологический анализ показал высокую степень биосовместимости и отсутствие токсичности. Гистологический анализ после гетеротопической имплантации материала экспериментальным животным, как и в примере 1, свидетельствует о высокой биосовместимости, биоинтеграции материала, об отсутствии резорбции материала, о построении структурированного неколлагенового матрикса.

Таким образом, приведенные примеры показывают, что заявляемый способ обеспечивает высокую степень очистки от жиров и провоспалительных факторов, высокую эффективность деминерализации при сохранении пространственной структуры коллагенового костного матрикса материала, высокую степень биосовместимости, биоинтеграции, высокий остеопластический потенциал получаемого этим способом материала в различных формах (блочные фрагменты различного размера, крошка).

#### (57) Формула изобретения

Способ изготовления остеопластического материала из костной ткани путем ее механической очистки, фрагментации, удаления жировых и белковых неколлагеновых составляющих, ее деминерализации, сопровождающихся отмывками реагентов, отличающийся тем, что после механической очистки и фрагментации материал отмывают нагретым до 45-50°C физраствором в течение 30 мин, выполняют обработку раствором 3% пероксида водорода в воде в виде 3 циклов по 10 минут с отмывкой физраствором при 45-50°C, а вместо обработки папаином выполняют обработку раствором 0.1-0.5% липазы в забуференном физиологическом растворе при рН 8.0 в течение 2 суток, затем промывают физиологическим раствором, обрабатывают смесью хлороформа с водой (1:1) в течение 1-3 суток с периодической заменой смеси по мере ее помутнения, отмывают хлороформ раствором 20-30% этанола в воде в течение 6-12 ч, а затем физиологическим раствором при пятикратной смене растворов, выполняют

деминерализацию материала раствором 0.6 М соляной кислоты в воде в течение 0,25-1 ч при температуре 4-6°C в условиях перемешивания и при смене раствора на свежий каждые 15 мин, затем обрабатывают раствором 5% тиосульфата натрия в воде в течение 3 ч, промывают 10-кратной сменой дистиллированной воды и нормализуют в 5 забуференном физиологическом растворе рН 7.4 в течение 5-9 суток при комнатной температуре и при смене раствора на свежий 3 раза в сутки, причем соотношение объемов костной ткани и смесей или растворов для обработки или отмывки составляет 1:4-1:6, обработку и отмывку выполняют в условиях перемешивания при 40-50°C, если не указана другая температура, а деминерализацию выполняют при периодическом 10 вакуумировании до 50-100 мм рт.ст. и нормализации давления газовой фазы над материалом с периодом 2-10 мин.

15

20

25

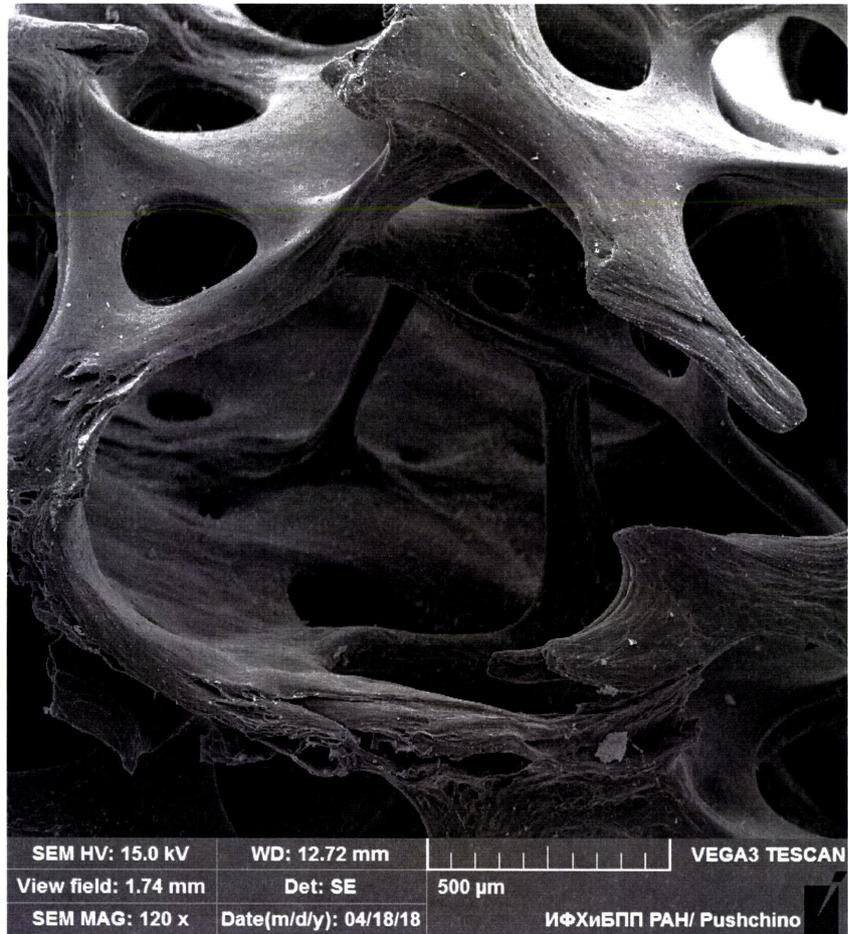
30

35

40

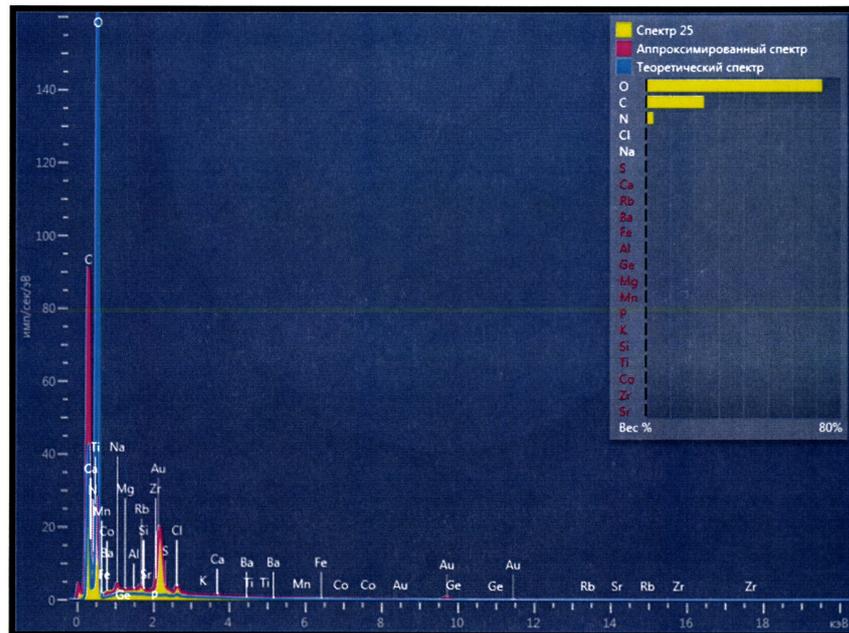
45

1

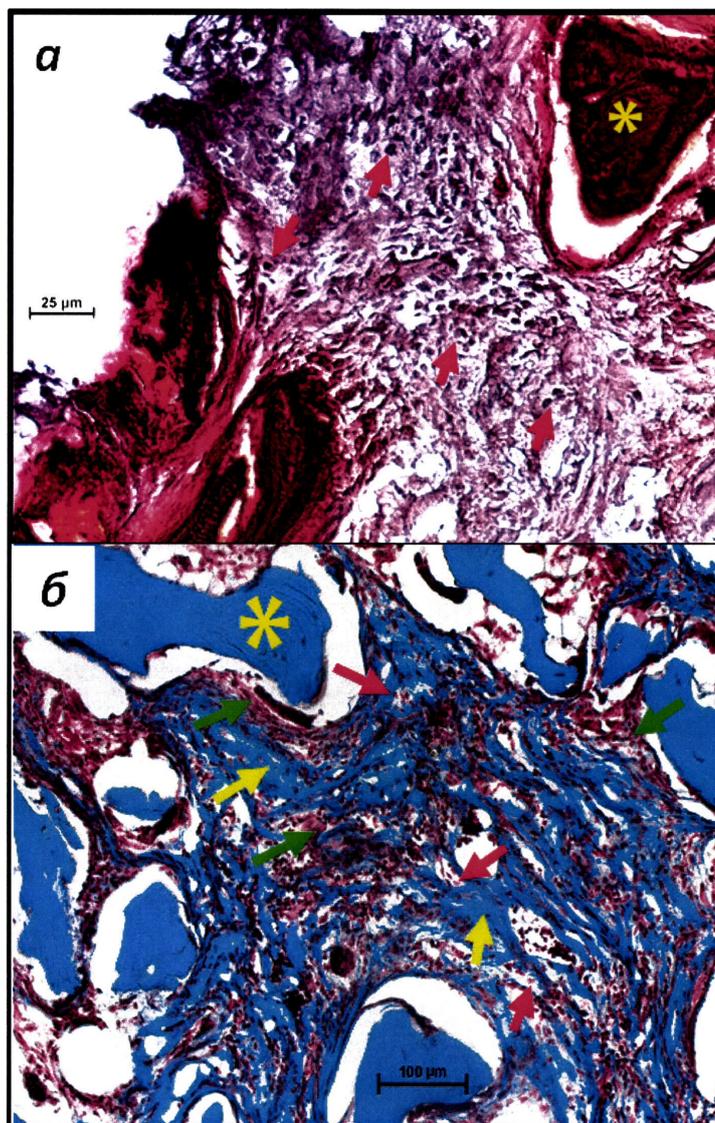


Фиг. 1 – SEM микрофотография образцов деминерализованной костной крошки, трабекулярная структура матрикса (сканирующая электронная микроскопия)

2



Фиг. 2 – Спектральный анализ образцов деминерализованной костной крошки



Фиг. 3 – Микрофотографии криосрезов образцов ДЖК после 13 недель имплантации крысам

а – окраска по МакГи-Расселу: красным цветом окрашены отложение кальция на деминерализованной костной крошкой, синим – неоколлагеновый матрикс, красными стрелками показаны ядра клеток; б – окраска по методу Голднера-Масона: зрелый коллаген окрашен в бирюзовый цвет, незрелый коллаген в красный цвет; ядра клеток – черный; \* – деминерализованный костный матрикс, красные стрелки – клеточные ядра, желтые стрелки – зрелый неоколлаген, зеленые стрелки – незрелый неоколлаген