



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **110386** (13) **C2**  
(51) МПК (2015.01)  
**A61L 27/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: **а 2013 15462**  
(22) Дата подання заявки: **30.12.2013**  
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **25.12.2015**  
(41) Публікація відомостей про заяву: **10.07.2015, Бюл.№ 13**  
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **25.12.2015, Бюл.№ 24**  
(72) Винахідник(и):  
**Суходуб Людмила Борисівна (UA),  
Суходуб Леонід Федорович (UA),  
Яновська Ганна Олександрівна (UA)**  
(73) Власник(и):  
**СУМСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ УНІВЕРСИТЕТ,  
вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007  
(UA)**

(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:  
Rusu V. M. Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic-inorganic composite materials / V.M Rusu, Chuen-How Ng, M. Wilke, B. Tiersch, P. Fratzl, M. G. Peter // Biomaterials. - Sep. 2005. - Vol. 26. - Iss. 26. - P. 5414-5426,  
Погорелов М.В. Матеріали для пластики кісткових дефектів – сучасний стан проблеми (огляд літератури та результати власних досліджень) / М.В. Погорелов, С.М. Данильченко, О.В. Клінкевич, Л.Ф. Суходуб [та ін.] // Вісник СумДУ. Серія Медицина. – 2011. - № 1. – С. 70-83  
JP 2001026408 A, 30.01.2001  
Zhang X. Repair of rabbit femoral condyle bone defects with injectable nanohydroxyapatite/chitosan composites / X. Zhang, L. Zhu, H. Lv, Y. Cao, W. Ye, J. Wang // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – Aug. 2012. – Vol, 23, Iss 8. – P. 1941-1949  
Tavakol S. Bone regeneration based on nano-hydroxyapatite and hydroxyapatite/chitosan nanocomposites: an in vitro and in vivo comparative study / S. Tavakol, M. R. Nikpour, A. Amani, M. Soltani // Journal of Nanoparticle Research. – Jan. 2013. Vol. 15. – Iss. 1  
CN 101376038 A, 04.03.2009  
UA 92027 C2, 27.09.2010  
CN 101401958 A, 08.04.2009  
Данильченко С.Н. Экспериментальное обоснование применения композитных материалов на основе хитозана и фосфатов кальция для замещения костных дефектов / С.Н. Данильченко, О.В. Калинкевич, Л.Ф. Суходуб [и др.] // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2009. - № 1. – С. 66-72  
Danilchenko S.N. Characterization and in vivo evaluation of chitosan-hydroxyapatite bone scaffolds made by one step coprecipitation method / S. N. Danilchenko, O. V. Kalinkevich, M. V. Pogorelov, A. N. Kalinkevich, A. M. Sklyar, L. F. Sukhodub // Journal of Biomedical Materials Research. Part A. – Mar. 2011. - Vol. 96A, - Iss. 4. P. 639–647  
Nikpour M.R. Synthesis and characterization of hydroxyapatite/chitosan nanocomposite materials for medical engineering applications / M.R. Nikpour, S.M. Rabiee, M. Jahanshahi // Composites Part B: Engineering. – 2012. – Vol. 43. – Iss. 4. – P. 1881-1886  
CN 1486753 A, 07.04.2004  
US 20070254007 A1, 01.11.2007  
UA 34899 U, 26.08.2008  
UA 63599 U, 10.10.2011  
UA 98888 C2, 25.06.2012  
RU 2376019 C2, 20.12.2007

**UA 110386 C2**

**(54) ГІДРОГЕЛЕВИЙ МАТЕРІАЛ ДЛЯ ВІДНОВЛЕННЯ КІСТКОВИХ ТКАНИН ТА СПОСІБ ЙОГО ОТРИМАННЯ**

---

**(57) Реферат:**

Гідрогелевий матеріал для відновлення кісткових тканин та спосіб його отримання належить до медицини, а саме до композитних полімер-неорганічних лікарських форм, призначених до використання в ортопедії та стоматології для заміщення ушкоджених чи видалених ділянок кісткової тканини.

Матеріал для відновлення кісткових тканин містить полімер хітозан та кальцій фосфатну сполуку, представлену гідроксіапатитом, при цьому масове співвідношення полімеру хітозану і гідроксіапатиту складає від 2:10 до 2:5, і вміст твердої фракції (гідроксіапатит + полімер хітозан) за масою складає 25-12 мас. % від маси готового продукту, а ступінь вологості готового продукту становить 75-88 %. Окрім цього гідроксіапатит знаходиться у вигляді наночастинок з розміром до 100 нм з характерно високою для таких часток реакційною здатністю.

Спосіб отримання гідрогелевого матеріалу для відновлення кісткових тканин включає наступні стадії:

- 1) утворення хітозанової полімерної матриці в 0,06М водному розчині ортофосфорної кислоти при її змішування з хітозаном в шейкері при температурі + 37 °С;
- 2) утворення кальцій-фосфатних кристалітів шляхом додавання хітозан-фосфатної суміші, зі стадії 1, до попередньо приготованого 0,1М водного розчину хлориду кальцію з рН=12 з наступним прогрівом суміші до +50 °С протягом 10 хвилин;
- 3) корегування рН суспензії, отриманої на стадії 2, від значення 5,5-6,0 до рН 7,0-7,4;
- 4) трансформація кальцій-фосфатних кристалітів, отриманих на стадії 3, в гідроксіапатиті протягом не менше 14 діб, утворення наночастинок гідроксіапатиту та іммобілізація їх в поровому просторі хітозанової матриці;
- 5) промивання суспензії, отриманої на стадії 4, деонізованою водою;
- 6) відділення твердої фракції, а саме продукту гідрогелевий нанокompозитний матеріал від рідкої фракції (вода та побічні продукти реакції) шляхом центрифугування;
- 7) визначення ступеня вологості готового гідрогелевого нанокompозитного матеріалу, його стерилізація та упаковка.

Отриманий матеріал у формі гелю для відновлення кісткових тканин можливо використовувати для нарощування тканини як додаткове джерело іонів кальцію або наносити на металевий імплантат, стимулюючи ріст нативної кістки, зменшуючи ризик післяопераційного відторгнення.

Винахід належить до медицини, а саме до композитних полімер-неорганічних лікарських форм, призначених для використання в ортопедії та стоматології для заміщення ушкоджених чи видалених ділянок кісткової тканини.

Статистична оцінка хірургії нещасних випадків свідчить, що близько 8 % всіх операцій спрямовано на нарощування кісток. Дефект кістки, викликаний видаленням пухлини, складним переломом, запаленням в навколо протезному просторі після імплантації протезу, повинен заповнюватися кістковим матеріалом для покращення регенерації кісткової тканини, оскільки в протилежному разі відбувається негативний процес заміщення кісткової тканини з'єднувальною. [Эппле М. Биоматериалы и биоминерализация / М. Эппле; [пер. с нем. подред В.Ф. Пичугина и др.//. - Томск: Ветер, 2007. - 165с]

Тому пошук універсального матеріалу для відновлення цілісності кісткової чи зубної тканини є однією з найгостріших проблем сучасної медицини. Існує цілий ряд матеріалів для лікування кістки, в тому числі кістковий матеріал тваринного походження, але при цьому є великий ризик інфекцій та імунних реакцій відторгнення. Щоб запобігти вказаним ускладненням, як заміники кісток найчастіше намагаються використовувати метали та синтетичні матеріали. Основними вимогами до таких матеріалів є достатня механічна стабільність, висока біологічна сумісність та пористість для надання кістковій тканині можливості вросли в матеріал та забезпечити механічну фіксацію. Кальцій-фосфатні сполуки мають суттєве значення в галузі інженерії кісткової тканини. Це, насамперед, гідроксіапатит (ГА)  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , що є основним неорганічним компонентом біогенної кісткової тканини та має такі цінні властивості, як біосумісність, біоактивність, остеокондуктивність та відсутність запальних та токсичних ефектів [Demirtas, T. Hydroxyapatite containing superporous hydrogel composites: synthesis and in-vitro characterization // T. Demirtas, A. Karakecili, M. Gumusderelioglu // J. MaterSci: MaterMed. - 2008. - V. 19, № 5-P. 729-735]. Останнім часом все більшої популярності набуває використання матеріалів у формі гідрогелів. Композитні матеріали, які моделюють кісткову тканину, складаються з полімерної матриці та неорганічного наповнювача.

Структура хімічно або фізично розгалужених полімерних ланцюгів, які утворюють тривимірну сітку, забезпечує гелям можливість іммобілізувати та утримувати достатню кількість води, біологічної рідини або лікарських засобів. Висока гідрофільність та низький міжповерхневий натяг при контакті з біологічними рідинами робить гідрогелі біосумісними та перспективними у використанні [Drury J.L Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications / Drury J.L., Mooney D.J.// Biomaterials. - 2003. - V. 24. - p. 4337-4351].

Багато розробок та досліджень присвячено використанню різних модифікацій гідрогелів для лікування кісткових та тканинних дефектів в людському організмі [Mann, B.K. Biologic gels in tissue engineering / Mann B.K.// ClinPlast Surg. - 2003. - V. 30. - P. 601-609]. На основі гідрогелів розробляють матеріали біомедичного призначення, сорбційні матеріали та скафолди для культивування клітин.

Так, відомий матеріал у формі гелю для регенерації кісткової тканини (патент 2360663 C1, Росія, МПК А61L27/12, А61K6/033/ Десятниченко К.С.(RU). 3. 2008118086/15, 08.05.2008. Опубл. 10.07.2009), отриманий змішуванням 20-40 мас. % розчину поліетиленгліколю, 10-50 мас. % суміші ортофосфатів кальцію (гідроксіапатит, фтор, карбонат апатити) з розміром частинок 20-1000 нм, розчину неколагенових білків, виділених із трубчатих кісток крупної рогатої худоби та домішками лікарських засобів. Основним недоліком даного виходу є значний вміст поліетиленгліколю, щодо якого існує застереження про його можливу токсичність, яка може викликати алергічний та канцерогенний вплив на організм людини, хоча поліетиленгліколь і дозволений до використання як харчова домішка. В патенті US2008063684(A1) (Formable and Settable Polymer Bone Composite and Methods of Production Thereof) описана технологія отримання біокомпозитного матеріалу для протезування кісткової тканини, за якої полімерні гранули крохмал-полікапролактону нагрівались в мікрохвильовій печі до температури 54,4 °С, з них вручну ліпився полімерний матеріал, до складу якого по мірі охолодження додавалася подрібнена кістка тваринного походження в кількості, що становила близько 50 % мас. полімеру. Композит знову нагрівали і надавали йому заданої форми, яка після охолодження мала жорстку конструкцію.

Даний винахід має ряд недоліків, а саме: в умовах організму полікапролактон відомий здатністю стимулювати ріст фіброзної тканини, а ксеногенні заміники кістки тваринного походження несуть високий ризик інфекцій і реакцій відторгнення.

Відома композиція для кісткової пластики, що створена на основі колагену та гідроксіапатиту (патент № 2274461 C2, Росія, А61K35/32, А61L 27/00 /Литвинов С.Д. (RU). - 3. № 2004105528/15. Заявл. 26.02.2004. Опубл. 20.04.2006.), яка наближена за своєю будовою до нативної кісткової тканини. Але хоча біологічний колаген є основною органічною складовою нативної кістки та має

ряд безперечно корисних властивостей, в умовах виробництва його добувають з матеріалу тваринного походження, тому він може викликати імунну реакцію відторгнення. Крім того, колаген є поживним середовищем для розмноження мікроорганізмів і не піддається паровій стерилізації внаслідок денатурації при підвищених температурах.

5 Відомо також гідрогелева кальцій-фосфатна композиція та спосіб її отримання згідно з патентом CN 101376038 A, опубл. 04.03.2009 року, за якою сполуки фосфору ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) та кальцію ( $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ ) в стехіометричному співвідношенні розчиняють в 2 % розчині оцтової кислоти ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ ) і таким чином, як свідчать автори, утворюється попередник гідроксіапатиту (далі ГА). Потім додають 4 % розчин хітозану, причому масове співвідношення хітозану до ГА складає 100:5 та 100:20, тобто основну частку у композиті складає хітозан. Після змішування невелику кількість суспензії наносять на поверхню спеціальної форми, яку поміщують в слабо лужну коагулюючу рідину ( $\text{NaOH}$ ,  $\text{KOH}$ ) для затвердіння. Далі суспензію помішують у прес-форму та витримують в коагулюючій рідині протягом 2-8 годин. Отриманий таким чином гель промивають дистильованою водою при 60-80 °C та висушують протягом 1-2 10 годин, обов'язково заморожують при -70 °C та висушують в вакуумі. В результаті отримують твердий високопористий матеріал у формі скафолда. Дана композиція та спосіб її отримання є найбільш близькими до заявлених технічних рішень, тому й вибрані за прототип.

Але при використанні даної композиції, основну частку якої складає хітозан, при такій технології її отримання, мають місце наступні недоліки. Так, суттєве зменшення частки гідроксіапатиту (до 5 %), на наш погляд, знижує якість продукту, оскільки саме гідроксіапатит є 20 основним "конструктивним" матеріалом, додатковим джерелом іонів кальцію при відновленні кісткової тканини та забезпечує механічні властивості імплантату, в той час як хітозан виконує роль матриці для утримання кристалітів ГА та надає матеріалові еластичності. У висушеному матеріалі, який має форму скафолда, кристаліти гідроксіапатиту агломеруються до стану 25 макрочастинок, на відміну від створеного нами гідрофільного матеріалу у вигляді гідрогелю з високим ступенем вологості, де ГА знаходиться у формі наночастинок з високою реакційною здатністю. Крім того, еластичний гідрогелевий матеріал легко заповнює дефекти складної геометрії на відміну від твердої форми матеріалу.

В основу запропонованого нами винаходу поставлено задачу створити біосумісний з 30 нативним оточенням гідрогелевий композит для лікування дефектів кісткових тканин, в тому числі складної геометрії, який повинен стимулювати ріст нової кісткової тканини, мати протизапальні властивості, не спричинювати побічних ефектів, не потребувати алергічних тестувань, піддаватися біорезорбції.

В основу запропонованого нами винаходу також поставлено задачу удосконалити спосіб 35 одержання матеріалу для відновлення кісткових тканин шляхом отримання просторово зшитих водневими зв'язками матриць на основі природного полімеру - хітозану та ортофосфорної кислоти, утворення та іммобілізації в їх поровому просторі нанорозмірних частинок ГА з отриманням гідрофільного матеріалу, реакційна здатність якого вища, ніж у порошоків та гранул.

Поставлена задача вирішується тим, що у гідрогелевому матеріалі для відновлення 40 кісткових тканин, який містить природний полімер хітозан та кальцій-фосфатну сполуку, представлену гідроксіапатитом (далі ГА), згідно з винаходом, масове співвідношення полімеру хітозану і ГА складає від 2:10 до 2:5, при цьому вміст твердої фракції (ГА + полімер хітозан) складає 25-12 мас. % від маси готового продукту і ступінь вологості готового продукту становить 75-88 мас. %. Окрім цього, ГА знаходиться у вигляді наночастинок з розміром до 100 нм з 45 характерно високою для таких часток реакційною здатністю.

Поставлена задача відносно способу отримання гідрогелевого матеріалу для відновлення кісткових тканин, згідно з винаходом, включає наступні стадії:

- утворення хітозанової полімерної матриці в 0,06 М водному розчині ортофосфорної кислоти при її змішуванні з хітозаном в шейкері при температурі + 37 °C;
- 50 - утворення кальцій-фосфатних кристалітів шляхом додавання хітозан-фосфатної суміші, утвореної на стадії 1, до попередньо приготованого 0,1 М водного розчину хлориду кальцію ( $\text{CaCl}_2$ ) з рН=12 при прогріванні суміші до +50 °C протягом 10 хвилин;
- корегування рН суспензії, отриманої на стадії 2, від значення 5,5-6,0 до рН 7,0-7,4;
- трансформація кальцій-фосфатних кристалітів зі стадії 3 в кристаліти ГА протягом не 55 менше 14 діб, з подальшим утворенням наночастинок ГА, та іммобілізація їх в поровому просторі хітозанової матриці, одержаної на стадії 1;
- промивання суспензії, отриманої на стадії 4, деонізованою водою;
- відділення твердої фракції, а саме продукту (гідрогелевий нанокompозитний матеріал) від рідкої фракції (вода та побічні продукти реакції) шляхом центрифугування;

- визначення ступеня вологості готового гідрогелевого матеріалу, його стерилізація та упаковка.

Відомо, що кальцій-фосфатні матеріали широко використовуються при виробництві штучних кісток, заміщенні кісткових дефектів, відновленні кістки, для обробки імплантатів в стоматології та ортопедії. ГА є однією з найбільш стабільних форм кальцій-фосфатів та складає 60-65 % кісткової тканини [Kim, S.K. Bioactive compounds from marine processing by products-A review/Kim, S.K., E. Mendis // Food Res. Int. - 2006. - V. 39. - p. 383-393]. Використання хітозану як полімерної складової обумовлене його біосумісністю та здатністю до біодеградації. Хітозан, похідне хітину, є лінійним кристалічним полісахаридом, що складається з мономерів  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4) N-ацетил-D-глюкозаміну [Z. Modrzejewska Determination of Hydrogel Chitosan Membrane Structure / Z. Modrzejewska, W. Maniukiewicz, A. Wojtasz-Pajak // Polish Chitin Society, Monograph XI. - 2006. - p. 113-121]. В фізіологічних умовах розщеплення хітозану до N-ацетил-D-глюкозаміну та D-глюкозаміну відбувається під дією таких ферментів, як хітинази та хітобіази. Загальновідомі протимікробні властивості хітозану. Завдяки наявності в його полімерному ланцюзі аміногруп, які в водно-кислотних середовищах при значенні рН<6,5 протонуються, утворюючи  $\text{NH}^{3+}$  групи, молекули хітозану набувають позитивного заряду, що сприяє їх локалізації біля негативно заряджених поверхонь, в тому числі поверхонь мікробних клітин. Один з механізмів його протимікробної дії полягає в здатності зв'язуватися з фосфоліпідами мембранної оболонки мікробної клітини, внаслідок чого відбувається порушення процесів метаболізму та загибель клітини [Nejati Hafdani, F. A Review on Application of Chitosan as a Natural Antimicrobial / F. Nejati Hafdani, N. Sadeghinia // World Academy of Science, Engineering and Technology. - V. 74. - 2011. - p. 257-261].

Технологія отримання гідрогелевого нанокompозитного матеріалу для відновлення, заміщення та нарощування кісткових тканин, який доставляється в зону тканини, де потрібне нарощування або додаткове джерело іонів кальцію, забезпечує на першому етапі утворення хелатного комплексу між функціональними групами хітозану та іонами кальцію з подальшим приєднанням фосфатних груп та формуванням ГА в період процесу "старіння". Лімітований розмір пор хітозанової матриці дозволяє керамічним частинкам залишатися в суспензії нанорозмірними (не агломерованими) протягом невизначеного часу до використання. Таким чином, утворюється нанокompозитний матеріал у формі гелю, який представляє тривимірну гідрогелеву сітку з молекул хітозану, в поровий простір якої інкорпоровані наночастинки ГА, синтезовані одночасно з формуванням хітозанової матриці.

Пояснюючи технічний результат звертаємо увагу, що він досягається не тільки за рахунок наявності у кальцій-фосфатному композиті полімеру хітозану, а особливо, за рахунок реакційно здатних наночастинок кальцій-фосфату, а саме ГА, в продукті з високим ступенем вологості, існування яких доведено інструментальними методами дослідження (просвічуюча електронна мікроскопія (ПЕМ), рентгенівська дифракція). Співвідношення полімеру хітозану до кальцій-фосфатної сполуки знаходиться в інтервалі значень "від 2:10 до 2:5", тобто від 20 до 40 мас. %. Пояснюється це тим, що від вмісту полімеру залежать властивості композиту та мета його застосування. Саме в даному діапазоні величин досягається такий розмір кристалітів ГА, який наближує продукт до біологічного апатиту (20-25 нм), а еластичність композиту є оптимальною. Створений композит з найменшим вмістом хітозану (20 мас% до вмісту ГА) та високим вмістом ГА (80 мас. %) може самостійно застосовуватись як для заповнення кісткових дефектів, в тому числі складної геометрії, так і нанесення на поверхню імплантата *in situ* (безпосередньо при проведенні операції). Композит з найбільшим вмістом хітозану (40 мас. % до вмісту ГА) та вмістом ГА 60 мас. % може застосовуватись як самостійно, так і в поєднанні, наприклад, з розробленими нами гранульованими формами ГА для заповнення пустот між гранулами та для кісткових дефектів складної геометрії, оскільки реакційна здатність таких композитів до резорбції вища, ніж у порошоків та гранул, тому вони починають "працювати" зразу після імплантації. Вміст твердої фракції (ГА+ полімер) складає 25-12 мас. % у складі готового гідрогелевого матеріалу, а вологість готового продукту складає 75-88 мас. %. Зміна граничних значень у бік зменшення або збільшення призводить до отримання більш густої або рідкої консистенції відповідно, що визначається потребами застосування матеріалу.

Знаходження ГА у вигляді наночастинок є важливим тому, що всі природні матеріали та біосистеми побудовані з нанооб'єктів, саме в інтервалі нанорозмірів (1-100 нм) природа "програмує" основні характеристики речовин та явищ. Для наночастинок взагалі характерна висока реакційна здатність і тому для їх стабілізації необхідні певні умови утримання. В запропонованому рішенні існування ГА у вигляді наночастинок з розміром до 100 нм забезпечується утворенням просторової сітки (матриці) в результаті міжмолекулярних

взаємодій (в тому числі водневих зв'язків) між макромолекулами полімерної сполуки - хітозану та води.

При отриманні нанокompозитного матеріалу в формі гелю на основі полімеру хітозану та кальцій-фосфатної сполуки, за яку представлено ГА, необхідно дотримуватись технології, яка сформульована в незалежному п. 4.

А саме, на першій стадії процесу необхідно для утворення хітозаної полімерної матриці процес здійснювати шляхом змішування хітозану з водним розчином ортофосфорної кислоти (0,06М) в шейкері при температурі, що дорівнює +37 °С. Пояснюється це наступним. Розчинення хітозану саме в ортофосфорній кислоті мінімізує введення до системи додаткових іонів ацетату (як загальноприйнято у літературі); дана концентрація кислоти, яка є прекурсором для створення ГА, забезпечує стехіометричне молярне співвідношення кальцію до фосфору 1,67; дане значення температури відповідає біоміметичним умовам синтезу. На другій стадії процесу бажано дотримуватись саме таких технологічних особливостей тому, що при заданому високолужному значенні рН відбувається зародкоутворення кристалітів ГА, рівень рН знижується поступово по мірі додавання суміші ортофосфорної кислоти та хітозану. Після цього необхідно відкорегувати значення рН отриманої суспензії до 7,0-7,4, яке вказано на третій стадії процесу, що відповідає фізіологічному стану організму людини. Прогрівання до температури +50 °С протягом 10 хвилин стимулює утворення кристалітів ГА.

На четвертій так званій стадії "старіння" протягом не менше 14 діб відбувається трансформація супутніх кальцій-фосфатів в ГА, що підтверджується даними рентгеноструктурного аналізу. На п'ятій стадії процесу отриману суспензію треба промивати деіонізованою водою для видалення побічних продуктів реакції.

Відділення готового продукту здійснюють шляхом центрифугування, що дозволяє отримати продукт з необхідним ступенем вологості, а саме 75-88 %, що попереджує агломерацію та забезпечує існування продукту у формі наночастинок завдяки гідратній оболонці, яка утворюється протягом процесу "старіння".

Загальновідомо, що наночастинок відзначаються високою реакційною здатністю порівняно з макрочастинками у випадку порошків. Доведено, що продукт у формі наночастинок з низькою кристалічністю має високий ступінь резорбції *in vivo* (на дослідних тваринах), що дуже важливо для імплантації, оскільки імплантат, як чужорідне тіло, повинен з часом резорбуватися (розчинятися), стимулюючи при цьому ріст нової кістки.

Попереднє вивчення особливостей реакції кісткової тканини на введення гелеподібної консистенції готового продукту, отриманого згідно з заявленим складом та заявленою технологією, було проведено на 20 білих щурах самцях 4-місячного віку, що знаходились в стаціонарних умовах виварію Сумського державного університету (вологість готового продукту складала 80 %). Ділянка дефекту великої гомілкової кістки щура на 14 добу після імплантації гелеподібним матеріалом була частково оточена сполучнотканинними клітинами, через які він безпосередньо взаємодіє з кістковою тканиною, яка росте від країв материнської кістки. Крім цього, з матеріалом через шар сполучнотканинних клітин (попередньо фібробластів) існує безпосередній контакт ретикулофіброзної кісткової і фіброретикулярної сполучної тканини, що у свою чергу оцінюється як позитивне явище.

Все вище сказане є якісною оцінкою регенераторного процесу в умовах знаходження у кістковому дефекті гелеподібного матеріалу та підтверджує можливість використання заявленого продукту та технології її отримання як лікувального засобу.

Таким чином, втілення вказаних ознак, в тому числі відмінних, дозволило отримати матеріал для заміщення кісткових тканин у формі гелю, яким заповнюють зону тканини, де потрібне нарощування або додаткове джерело іонів кальцію, або наносять на металевий імплантат *in situ* безпосередньо перед імплантацією для забезпечення біосумісності імплантата та зменшення ризику післяопераційного відторгнення, вирішуючи поставлені задачі.

Вищесказане демонструється наступним прикладом виконання:

Приклад 1.

Композитний матеріал готують наступним чином:

1. Утворення хітозаної полімерної матриці відбувається при розчиненні 0,4 г середньомолекулярного хітозану в 100 мл 0,06М водного розчину ортофосфорної кислоти при перемішуванні в шейкері ( $n_{rpm}=240$ ) при температурі +37 °С протягом 2 годин;

2. Утворення кальцій-фосфатних кристалітів в поровому просторі хітозаної матриці відбувається після додавання крапельним методом (6 мл/хв.) суспензії, утвореної на стадії 1, до 100 мл 0,1 М розчину хлориду кальцію  $CaCl_2$ , значення рН якого відкореговане до 12,0 додаванням 10М розчину  $NaOH$  і під кінець процесу має значення 5,5-6,0; стимуляція

вищевказаного процесу відбувається шляхом прогрівання суспензії при температурі +50 °C протягом 10 хвилин;

3. Корегування значення рН суспензії, отриманої на стадії 2, до 7,0-7,4 розчином NaOH;

4. Трансформація кальцій-фосфатних кристалітів зі стадії 3 в кристаліти ГА протягом не менше 14 діб, утворення наночастинок ГА з іммобілізацією їх в поровому просторі хітозаної матриці;

5. Відмивання деонізованою водою для видалення побічних продуктів реакції;

6. Шляхом центрифугування (5000 об/хв., 10 хвилин) відділяють осад, що являє собою гідрогелевий нанокompозитний матеріал масою 8,0 г (вологість 82 %), який містить полімер хітозан та ГА загальною масою 1,44 г, що складає 18 мас. % у складі готового продукту при їх співвідношенні 2:5 та деонізовану воду масою 6,56 г, що складає 82 мас. %;

7. Заключною стадією є визначення вологості готового продукту, яка для даного прикладу визначена термогравіметричним методом і складає 82 %, парова стерилізація та упаковка гідрогелевого нанокompозитного матеріалу.

15 Таким чином, отриманий нанокompозитний матеріал у формі гелю для заміщення ушкоджених чи видалених ділянок кісткової тканини, який був досліджений *in vivo*, можливо використовувати як матеріал для нарощування кісткової тканини або як біосумісне покриття наносити на металевий імплантат, стимулюючи ріст нативної кістки, зменшуючи ризик післяопераційного відторгнення.

20

#### ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Гідрогелевий матеріал для відновлення кісткових тканин, що містить полімер хітозан та кальцій-фосфатну сполуку, представлену гідроксіапатитом (ГА), який **відрізняється** тим, що масове співвідношення полімеру хітозану і ГА складає від 2:10 до 2:5, при цьому вміст твердої фракції (ГА + полімер хітозан) за масою складає 25-12 мас. % від маси готового продукту.

2. Гідрогелевий матеріал за п. 1, який **відрізняється** тим, що ступінь вологості готового продукту становить 75-88 %.

3. Гідрогелевий матеріал за п. 1, який **відрізняється** тим, що ГА знаходиться у вигляді наночастинок з розміром до 100 нм з характерно високою для таких часток реакційною здатністю.

4. Спосіб отримання гідрогелевого матеріалу для відновлення кісткових тканин, за будь-яким з пп. 1-3, який **відрізняється** тим, що включає наступні стадії:

1) утворення хітозаної полімерної матриці в 0,06М водному розчині ортофосфорної кислоти при її змішування з хітозаном в шейкері при температурі + 37 °C;

2) утворення кальцій-фосфатних кристалітів шляхом додавання хітозан-фосфатної суміші, зі стадії 1, до попередньо приготованого 0,1М водного розчину хлориду кальцію з рН=12 з наступним прогрівом суміші до +50 °C протягом 10 хвилин;

3) корегування рН суспензії, отриманої на стадії 2, від значення 5,5-6,0 до рН 7,0-7,4;

4) трансформація кальцій-фосфатних кристалітів, отриманих на стадії 3, в ГА протягом не менше 14 діб, утворення наночастинок ГА та іммобілізація їх в поровому просторі хітозаної матриці;

5) промивання суспензії, отриманої на стадії 4, деонізованою водою;

6) відділення твердої фракції, а саме продукту гідрогелевий нанокompозитний матеріал від рідкої фракції (вода та побічні продукти реакції) шляхом центрифугування;

7) визначення ступеня вологості готового гідрогелевого нанокompозитного матеріалу, його стерилізація та упаковка.

---

Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

---

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

---

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