

Способ изготовления лиофилизированного аллотрансплантата кости

**В.Б. Хватов, А.В. Свищев, А.Ю. Ваза, Н.В. Боровкова, А.С. Миронов,
Д.Ю. Похитонов, Ю.В. Андреев**
ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», Москва
Контакты: Дмитрий Юрьевич Похитонов, madbrat@list.ru

В статье рассматриваются аллотрансплантат, изготовленный из костной ткани, лиофилизированный, стерильный и его внедрение в качестве медицинского изделия в практику реконструктивной хирургии.

Обладая osteoconductive свойством, трансплантат способствует восстановлению структуры поврежденной кости и ускоряет процесс регенерации костных дефектов. Для применения медицинского изделия в практике согласно постановлению Правительства РФ от 27.12.2012 № 1416 необходимо пройти процедуру его регистрации в Росздравнадзоре РФ, включающую приемные технические, токсикологические и клинические испытания.

Ключевые слова: аллотрансплантат кости, сертификация, технический регламент.

Method of manufacturing a lyophilized allograft bone

**V.B. Khvatov, A.V. Svishchev, A.Yu. Vaza, N.V. Borovkova, A.S. Mironov,
D.Yu. Pokhitonov, Yu.V. Andreev**

N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine of Moscow Healthcare Department, Moscow

The article describes a lyophilized sterile allograft made of bone tissue, and its implementation as a medical device in the practice of reconstructive surgery.

Possessing an osteoconductive effect, the graft helps to restore the structure of a damaged bone, and accelerates the regeneration of bone defects. According to the RF Government Regulation No. 1416 of 27.12.2012, the product has to pass the authorization procedure including the conduct of specific technical, toxicological, and clinical trials to be certified by Roszdravnadzor for clinical use.

Keywords: allograft bone, certification, technical regulations.

Актуальность

С развитием технического прогресса число больных, перенесших высокоэнергетическую травму, неуклонно растет. Увеличивается количество пациентов с открытыми и многооскольчатыми переломами, переломами, сопровождающимися дефектом кости. Несовершенство методов пластики костных дефектов приводит к значительному росту числа несращений и ложных суставов (что происходит, например, в 6–51,8% случаев лечения переломов длинных костей [1]. Один из вариантов лечения таких больных – заполнение травматического костного дефекта или дефекта после резекции костных отломков деминерализованным или недеминерализованным губчатым костным аллотрансплантатом [2]. Такие трансплантаты обладают механической

прочностью, позволяют на их основе произвести репозицию мелких осколков, после чего они достаточно длительный период служат опорой. Для широкого внедрения в клиническую практику костных аллотрансплантатов, согласно постановлению Правительства РФ от 27.12.2012 № 1416, необходимо пройти процедуру регистрации в Росздравнадзоре РФ, включающую приемные технические, токсикологические и клинические испытания [3].

Цель исследования: обоснование способа изготовления медицинского изделия «Аллотрансплантат на основе костной ткани лиофилизированный, стерильный» (далее – трансплантат) с последующим внедрением в клиническую практику.

Материал и методы

1. Характеристики аллотрансплантатов кости, виды и типоразмеры

Для серийного производства трансплантатов нами были разработаны технические условия – ТУ 9398-003-01967081-2015, в которых регламентированы технические требования к изделию, требования безопасности охраны окружающей среды, правила приемки изделия, методы испытания на соответствие изделия требованиям ТУ, условия транспортировки, хранения и утилизации, регламент работ по контролю качества.

В соответствии с Федеральным законом от 21.11.2011 № 323-ФЗ и Приказом Минздравсоцразвития РФ от 25.05.2007 № 357/40 трансплантат должен быть изготовлен из аллогенного материала при отсутствии ВИЧ, вирусов гепатитов В и С, сифилиса (согласно Приказу Минздрава РФ от 07.09.2000 № 336).

Трансплантаты представляют собой однородную костную ткань без видимых дефектов, трещин и сколов, костный порошок зернистый, бежево-серого цвета, без инородных включений.

Трансплантаты изготавливают двух видов: деминерализованные трех типов, представленные в табл. 1 и недеминерализованные четырех типов, представленные в табл. 2, что обусловлено различными областями их применения (рис. 1).



Рис. 1. Аллотрансплантаты на основе костной ткани лиофилизированные

Трансплантат должен быть стерильным; стерилизацию проводят радиационным методом по ГОСТ ISO 11137-2 и ГОСТ Р 50325-2011; стерилизующая доза облучения – 15–25 кГр.

Каждый трансплантат должен быть уложен в индивидуальную упаковку из полипропиленовой пленки по ГОСТ 26996-86, причем фрагменты кости упаковывают в дополнительный полипропиленовый пакет, а костный порошок – в полипропиленовую пробирку. Упаковку герметично запаивают под вакуумом.

Трансплантат в транспортной упаковке должен быть устойчив к воздействию механических факторов при транспортировании по ГОСТ Р 50444.

Средний срок годности трансплантата составляет 60 месяцев со дня стерилизации. За критерий предельного состояния принимают изменение внешнего вида изделия, потерю им стерильности и нарушение герметичности индивидуальной упаковки.

2. Способы изготовления трансплантатов

Трансплантаты изготавливают из костных фрагментов, полученных от доноров-трупов.

Заготовку производят от внезапно умерших (спец. доноров) в первые 12 часов после смерти при отсутствии холодильника для хранения трупов, а при наличии холодильника (оптимальный температурный режим +2–4°C) – до 24 часов после смерти. Разрешение судмедэксперта на заготовку кости оформляют по форме карты донора (трупа).

Предварительно проводят взятие цельной крови у спец. донора для проведения I этапа обследования: выполняют экспресс-тесты для диагностики ВИЧ, инфекционных вирусных гепатитов В и С, сифилиса (Приказ МЗ РФ от 07.09.2000 № 336), а также определяют уровень билирубина.

Заготовку костей осуществляют с соблюдением правил асептики и антисептики в условиях операционной. После заготовки костные фрагменты упаковывают в стерильный материал и помещают в низкотемпературную холодильную установку для карантинизации. Дальнейшие работы с костным материалом проводят после получения результатов анализа крови донора (II этап – обследование с использованием иммуноферментных тест-систем для выявления антител к ВИЧ, поверхностного антигена вируса гепатита В (HBsAg) и антител к вирусу гепатита С (анти-HCV-антитела) в сыворотке крови человека, серологические реакции с кардиолипновым и трепонемным антигенами в соответ-

Таблица 1. Технические показатели трансплантатов деминерализованных

Тип №	Тип костного трансплантата	Размер, №	Длина, мм	Ширина, мм	Толщина, мм	Масса, г
1	Трансплантаты губчатой кости	1	10,0±2,0	10,0±2,0	10,0±2,0	1,5±0,5
2	Трансплантаты кортикальной кости	1	50,0±10,0	20,0±5,0	3,0±0,5	1,0±0,5
3	Костная крошка	1	1,5±0,5 ²	–	–	1,0±0,1 ¹
		2	0,63±0,06 ²			
		3	0,16±0,02 ²			
		4	0,063±0,006 ²			

¹ Приводится общая масса единичного изделия.

² Приводится диаметр отдельных частиц порошка.

Таблица 2. Технические показатели трансплантатов недеминерализованных

Тип №	Тип костного трансплантата	Размер, №	Длина, мм	Ширина, мм	Толщина, мм	Масса, г
1	Трансплантаты губчатой кости	1	20,0±3,0	20,0±3,0	20,0±3,0	3,1±0,4
		2	20,0±2,0	20,0±3,0	10,0±1,5	2,2±0,3
		3	10,0±2,0	10,0±2,0	10,0±2,0	1,5±0,5
2	Трансплантаты губчато-кортикальной кости	1	100,0±10,0	70,0±10,0	8,0±3,0	13,0±3,0
		2	70,0±10,0	70,0±10,0	8,0±3,0	11,0±3,0
		3	35,0±5,0	25,0±3,0	15,0±3,0	5,4±0,6
		4	40,0±5,0	30,0±5,0	10,0±1,0	7,5±1,0
3	Трансплантаты кортикальной кости	1	100,0±10,0	5,0±1,0	5,0±1,0	7,0±2,0
		2	100,0±10,0	15,0±2,0	3,0±0,5	8,4±0,8
4	Костная крошка	1	1,5±0,5 ²	–	–	1,0±0,1 ¹
		2	0,63±0,06 ²			
		3	0,16±0,02 ²			
		4	0,063±0,006 ²			

¹ Приводится общая масса единичного изделия.

² Приводится диаметр отдельных частиц порошка.

ствии с Приказом МЗ РФ от 07.09.2000 № 336) и результатов судебно-медицинского вскрытия.

При наличии заключения судебно-медицинского эксперта и отсутствии противопоказаний кости очищают механическим путем от мягких тканей и с помощью электромеханической пилы распиливают на фрагменты в соответствии с ТУ. Образующиеся костные опилки и муку собирают отдельно в салфетку для изготовления костной крошки.

Полученные фрагменты и костные опилки обезжиривают. Трансплантаты раскладывают и герметично упаковывают, маркируют и подвергают радиостерилизации в дозе 15–20 кГр. Перед выпуском трансплантаты проходят проверку на стерильность и токсичность в соответствии с разработанными протоколами. После получения результатов проверки трансплантаты регистрируют в журнале, затем они могут быть использованы в клинике.

3. Изготовление деминерализованных костных трансплантатов

Многолетний опыт исследователей показал, что деминерализованным костным трансплантатам свойственны высокая остеоиндуктивность, незначительная антигенность и хорошая переносимость организмом реципиента. Существует несколько способов изготовления деминерализованных трансплантатов [4–8].

Нами разработан и применен собственный способ деминерализации костных трансплантатов. Сущность методики заключается в том, что полученные заготовки костей освобождают от мягких тканей и подвергают механической обработке, которая включает их распиливание и по возможности удаление всей губчатой ткани вместе с миелоидным и жировым костным мозгом. Для лучшего проникновения кислоты в кость на участках, отличающихся повышенной плотностью, особенно в области граней, наносят поверхностные или сквозные пропилы. Деминерализацию проводят в растворе соляной кислоты, максимальный срок деминерализации не превышает 4–5 суток, оптимальный состав-

ляет 2–3 дня. Рабочие растворы меняют ежедневно, их перемешивание ускоряет процесс вымывания солей из заготавливаемых трансплантатов.

После первых суток заготовки подвергают механической обработке, во время которой скальпелем вдоль опилов срезают поверхностный слой, повреждаемый при распиливании костей. Во всех случаях деминерализацию проводят при температуре $+5-7^{\circ}\text{C}$ [9].

Одним из методов консервирования является сублимационная сушка, степень обезвоживания при которой может колебаться в пределах от 1 до 10% (рис. 2). Полученные трансплантаты герметично упаковывают, маркируют и подвергают радиостерилизации в дозе 15–20 кГр. Перед выпуском трансплантаты проходят проверку на стерильность и токсичность в соответствии с разработанными протоколами. После получения результатов проверки трансплантаты регистрируют в журнале, затем они могут быть использованы в клинике.



Рис. 2. Консервирование костных трансплантатов методом сублимационной сушки

4. Изготовление деминерализованного костного порошка

Сущность методики состоит в том, что полученные образцы костей освобождают от периоста и костного мозга, промывают водой, обезжиривают этиловым спиртом, далее сушат 24 часа, затем с помощью мельницы компактную кость превращают в порошок, который просеивают через сито до размеров 70–420 микрон. Размельченную массу порциями по 20 г деминерализуют соляной кислотой (в течение 1 часа), прополаскивают в этиловом спирте с помощью магнитной мешалки для обезжиривания. В заключение порошок еще раз прополаскивают в смеси этилового спирта и эфира и оставляют на окончательную сушку, которая длится 1 сутки. Костный порошок упаковывают, маркируют и подвергают радиостерилизации в дозе 15–20 кГр. После получения результатов бактериологического и токсикологического исследований трансплантаты регистрируют в журнале и выпускают в клинику.

5. Внутренний контроль качества

Внутренний контроль качества трансплантатов осуществляют в 4 этапа:

I этап – до обработки кости. Проводят проверку соответствия трупного материала требованиям законодательства. Биоматериал считают пригодным для изготовления трансплантатов после получения результатов анализов (ВИЧ, RW, HBsAg, HCV согласно Приказу МЗ РФ от 07.09.2000 № 336, общий билирубин, пробы на токсичность и бактериологический посев крови от данного трупа) и заключения судебно-медицинской экспертизы (отсутствие онкологического, инфекционного, аутоиммунного заболеваний, цирроза печени, язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки, острых или обострившихся хронических воспалительных заболеваний любой локализации).

II этап – после изготовления трансплантата. Проводят определение остаточной влажности трансплантата. Влагосодержание материала (X) определяют отношением массы влаги GW, удаленной из материала, к массе материала после высушивания GS, т.е. $X = GW/GS$. Остаточная влажность трансплантатов кости должна быть в пределах от 1 до 10%. Костные трансплантаты подвергают разрывным нагрузкам – при сравнительном анализе прочностных свойств (нагрузка

на разрыв). Проверка pH водной вытяжки: pH должен быть в диапазоне 6,5–7,5.

III этап – после упаковки. Проводят проверку герметичности упаковки. Кортикальные и губчатые костные трансплантаты упаковывают в двойные полиэтиленовые пакеты под вакуумом. Костную крошку и пудру расфасовывают в пластиковые пробирки и далее упаковывают в двойные полиэтиленовые пакеты под вакуумом. Оценивают отсутствие дефектов упаковки и свободного воздуха. Также проводят проверку внешнего вида, соответствия размеров, маркировки, отсутствия дефектов упаковки.

IV этап – после стерилизации. После стерилизации гамма-лучами осуществляют бактериологический контроль готовой продукции. Четыре образца из каждой партии отправляют на бактериологический посев. Стерильным считается отсутствие роста колоний на питательных средах.

Каждый производственный цикл проводят в соответствии с «чек-листом», в котором отображаются все этапы производства с указанием даты, времени, ФИО и подписью ответственного врача.

В случае обнаружения брака вносят соответствующую запись в журнал «внутренний контроль качества выпускаемой продукции (костные трансплантаты)» и партию утилизируют в соответствии с санитарно-эпидемиологическим режимом.

6. Процедура регистрации

Для применения медицинского изделия в практике согласно постановлению Правительства РФ от 27.12.2012 № 1416 необходимо пройти процедуру его регистрации в Росздравнадзоре РФ, включающую приемные технические, токсикологические и клинические испытания. Очередность этапов прохождения регистрации регламентируется Административным регламентом Федеральной службы по надзору в сфере здравоохранения по предоставлению государственной услуги по государственной регистрации медицинских изделий (Приказ Минздрава России от 14 октября 2013 г.

№ 737н). На первом этапе изделие проходит токсикологические и приемные технические испытания для определения соответствия ТУ, а также его качества, эффективности и безопасности. После получения результатов испытаний, проведенных экспертной организацией, аккредитованной при Росздравнадзоре РФ, делается вывод о возможности (невозможности) выполнения клинических испытаний медицинских изделий.

Результаты

Полученные нами после радиационной стерилизации образцы трансплантатов в соответствии с Административным регламентом были направлены на предварительные токсикологические и приемные технические испытания в испытательную лабораторию ФГБУН НИИ ФХМ ФМБА России. Испытания были проведены согласно стандартам серии ГОСТ Р ИСО 10993, ГОСТ Р 51148-97 и ГОСТ Р 52770-2007.

Токсикологические испытания были успешно пройдены, и доказаны биологическая безопасность разработанных трансплантатов, их стерильность и апиrogenность, что подтверждено заключениями № 10404.011 и № 10403.011 от 6 декабря 2011 г.

Технические приемочные испытания были успешно пройдены, доказано соответствие параметров изготовленных трансплантатов заявленным в ТУ, что подтверждено актом № 12.846 ПТИ/2012 от 26 июня 2012 г.

Таким образом, пройденные токсикологические и технические приемочные испытания подтверждают надлежащее качество лиофилизированных костных аллотрансплантатов.

Заключение

Применяемый нами способ изготовления позволяет получить костные трансплантаты, соответствующие техническим требованиям, которые могут быть использованы в клинической практике.

Литература

1. Кудашова, О.В. Применение биокomпозиционного материала «КОЛ-ЛАПАН» в сочетании с концентрированными тромбоцитами в целях ранней профилактики и лечения несращений многооскольчатых переломов длинных трубчатых костей, ложных суставов и остеомиелитов / О.В. Кудашова, А.Н. Тюрчин, С.А. Тарасов // Медицинский алфавит. Больница. – 2011. – № 2. – С. 22–25.
2. Костно-пластический вариант лечения многооскольчатых переломов плечевой кости (клинический случай) / А.Ю. Ваза, И.Ю. Ключевин, В.Б. Хватов, В.В. Сластинин // Неотложная медицинская помощь. – 2012. – № 3. – С. 69–71.
3. Постановление Правительства РФ от 27 декабря 2012 г. № 1416 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий» (с изменениями и дополнениями). – М., [2012]. – Режим доступа: <http://base.garant.ru/70291692/>
4. Булатов, А.А. Современные способы изготовления, стерилизации и консервации деминерализованных костных трансплантатов / А.А. Булатов, А.В. Калинин, В.И. Савельев // Травматология и ортопедия России. – 2005. – № 1. – С. 55–59.
5. Gendler, E. Perforated demineralized bone matrix: a new form of osteoinductive biomaterial / E. Gendler // J. Biomed.Mat.Res. – 1986. – Vol.20, N. 6. – P. 687–696.
6. Huggins, C. Transformation of fibroblasts by allogenic and xenogenic transplants of demineralized tooth and bone / C. Huggins, S. Wiseman, A.H. Reddi // J. Exp. Med. – 1970. – Vol. 132, N. 6. – P. 1250–1258.
7. Reddi, A.H. Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification and hemopoiesis / A.H. Reddi, W.A. Anderson // J. Cell. Biol. – 1976. – Vol. 69, N. 3. – P. 557–572.
8. Urist, M.R. Bone: formation by autoinduction / M.R. Urist // Science. – 1965. – Vol.150. – P. 893–899.
9. Булатов, А.А. Влияние временных и температурных факторов на остеиндуктивные свойства деминерализованных костных трансплантатов / А.А. Булатов, В.И. Савельев // Травматология и ортопедия России. – 2006. – № 3. – С. 38–45.

References

1. Kudashova O.V., Tyurchin A.N., Tarasov S.A. Primenenie biokompozitsionnogo materiala «KOLLAPAN» v sochetanii s kontsentririrovannymi trombocitami v tselyakh ranney profilaktiki i lecheniya nesrashcheniy mnogooskol'chatykh perelomov dlinnykh trubchatykh kostey, lozhnykh sustavov i osteomyelitov [The use of bio composite "Collapan" material in conjunction with concentrated platelets for early prevention and treatment of nonunion comminuted fractures of the long bones, false joints and osteomyelitis]. *Meditinskiy alfavit. Bol'nitsa*. 2011; 2: 22–25. (In Russian).
2. Vaza A.Yu., Klyukvin I.Yu., Khvatov V.B., Slastinin V.V. Kostno-plasticheskiy variant lecheniya mnogooskol'chatykh perelomov plechevoy kosti (klinicheskiy sluchay) [An osteoplasty option in the treatment of multisplintered humerus fractures (case report)]. *Neotlozhnaya meditsinskaya pomoshch'*. 2012; 3: 69–71. (In Russian).
3. *Postanovlenie Pravitel'stva RF ot 27 dekabrya 2012 g. № 1416 «Ob utverzhdenii Pravil gosudarstvennoy registratsii meditsinskikh izdeliy» (s izmeneniyami i dopolnениyami)* [Russian Federation Government Resolution dated December 27, 2012 № 1416 «On approval of rules of state registration of medical products» (with changes and additions)]. Moscow, 2012. Available at: <http://base.garant.ru/70291692/> (In Russian).
4. Bulatov A.A., Kalinin A.V., Savel'ev V.I. Sovremennye sposoby izgotovleniya, sterilizatsii i konservatsii demineralizovannykh kostnykh transplantatov [Modern methods for manufacturing, sterilization and preservation of demineralized bone transplants]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii*. 2005; 1: 55–59.
5. Gendler E. Perforated demineralized bone matrix: a new form of osteoinductive biomaterial. *J Biomed Mat Res*. 1986; 20 (6): 687–696.
6. Huggins C., Wiseman S., Reddi A.H. Transformation of fibroblasts by allogenic and xenogenic transplants of demineralized tooth and bone. *J Exp Med*. 1970; 132 (6): 1250–1258.
7. Reddi A.H., Anderson W.A. Collagenous bone matrix-induced endochondral ossification and hemopoiesis. *J Cell Biol*. 1976; 69 (3): 557–572.
8. Urist M.R. Bone: formation by autoinduction. *Science*. 1965; 150: 893–899.
9. Bulatov A.A., Savel'ev V.I. Vliyanie vremennykh i temperaturnykh faktorov na osteoinduktivnye svoystva demineralizovannykh kostnykh transplantatov [Effect of time and temperature factors on the osteoinductive properties of demineralized bone grafts]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii*. 2006; 3: 38–45. (In Russian).