

Корисна модель належить до біомедичної промисловості, зокрема до способів одержання колагенових носіїв з колагенвмісної сировини, а саме недублених побічних продуктів шкіряного виробництва.

Відомий спосіб отримання колагену, застосовуваного у клітинній терапії [S.Y. Bak, Sang Woo Lee, C. Choi, Hyun Woo Kim. Assessment of the Influence of Acetic Acid Residue on Type I Collagen during Isolation and Characterization. MDPI. 2018. 11, 2518. 16 p.]. Спосіб передбачає попереднє гомогенізування впродовж 24 годин свинячої сировини в 0,5 М розчині оцтової кислоти з додаванням свинячого пепсину. Після центрифугування та висолювання 5 М розчином хлориду натрію, осад при перемішуванні обробляють етанолом впродовж 24 годин. Після чого повторно здійснюють центрифугування та обробку етанолом і 0,5 М оцтовою кислотою. Подальший діаліз здійснюють проти 0,5 М оцтової кислоти впродовж 72 годин, змінюючи розчин кожні 12 годин. Отримані розчини колагену заморожують при -20°C , а потім ліофілізують. Перевагами способу є додаткова обробка пепсином розчинів колагену, що в результаті дозволяє видалити залишки оцтової кислоти. Це, в свою чергу, призводить до формування високопорядкованої структури колагену з сильними водневими зв'язками, що має велике значення при застосуванні такого колагену як каркасу для клітин. Недоліками способу є застосування високоартісного ферментного препарату та використання діалізу проти оцтової кислоти з постійним підтриманням молярної концентрації оцтової кислоти в навколишньому розчині на рівні 0,5 М впродовж 72 годин.

Відомий спосіб одержання колагену ["Спосіб одержання нативного колагену", патент України на винахід № 20381А; заявл. 15.07.1997, опуб. 27.02.1998], який сприяє інтенсивній регенерації шкіри, використовується як активний компонент у складі фармацевтичних препаратів для загоєння ран, аплікаційних засобів для лікування опіків тощо. Спосіб включає подрібнення сировини тваринного походження; очищення від баластових речовин сумішшю фосфатного буфера та етилендіамінтетраоцтової кислоти; екстрагування колагену шляхом обробки сумішшю оцтової кислоти, формиату натрію, пепсину; очищення колагену шляхом інактивації пепсину при обробці ізотонічним розчином з одночасним осадженням колагену. Використання зазначеного способу кислотнo-ферментативного екстрагування сприяє високому виходу колагену, але потребує подальшого використання дорогого ферментного препарату; при цьому тривалість технології складає 173 години. Недоліком способу також слід вважати відсутність інформації про вид сировини тваринного походження, що використовується для одержання препарату колагену, а також інформації про дослідження біосумісності препаратів.

Найбільш близьким аналогом корисної моделі є спосіб екстрагування колагену, який передбачає попереднє оброблення впродовж 6 годин подрібнених шкур великої рогатої худоби 0,1 М розчином гідроксиду натрію, з подальшим промиванням у дистильованій воді, знежирюванням впродовж 18 годин у 10 % розчині бутилового спирту, екстрагуванням колагену впродовж 24 годин 0,5 М оцтовою кислотою з подальшим осадженням колагену 2,5 М розчином хлориду натрію, центрифугуванням зі швидкістю 4000 об/хв., повторним розчиненням у 0,5 М оцтовій кислоті (1:9 маса/об'єм) впродовж 24 годин та подальшим діалізом проти дистильованої води [Noorzai S.; Verbeek C.J.R.; Lay M.C.; Swan J. Collagen extraction from various waste bovine hide sources. Waste and Biomass Valorization. 2020. Vol. 11, № 11. P. 5687–5698]. Спосіб рекомендується використовувати для екстрагування колагену зі шкур молодняка великої рогатої худоби. Незважаючи на широкий спектр позитивних функціональних властивостей отриманого колагену, автори відмічають невисокий вихід колагену при екстрагуванні його зі шкур дорослих тварин через наявність великої кількості поперечних зв'язків у структурі колагену дерми.

В основу корисної моделі поставлена задача створити такий спосіб отримання колагену, за яким зміною параметрів екстрагування, проведенням стерилізації та зміною вихідної сировини забезпечується збільшення виходу екстрагованого колагену та отримання стерильних біосумісних гелів для терапевтичних та гігієнічних цілей.

Поставлена задача вирішується тим, що у способі одержання стерильних гелів колагену для терапевтичних та гігієнічних цілей, що включає механічне подрібнення сировини, промивання підготовленої сировини від супутніх компонентів водою, кислотне екстрагування, фільтрацію, осадження хлоридом натрію, центрифугування та перерозчинення в кислоті, та подальший діаліз, згідно з корисною моделлю, як сировину використовують недублені побічні продукти шкіряного виробництва, після промивання подрібненої сировини водою здійснюють промивання сольовим розчином, з подальшим промиванням водою, кислотне екстрагування здійснюють розчином 0,5 М оцтової кислоти у співвідношенні 1:10 маса/об'єм в присутності 5 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти за змінних температурного та динамічного режимів, осадження здійснюють сухим хлоридом натрію, додатково здійснюють повторне осадження сухим хлоридом натрію та розчиненням у мінімальній кількості 0,1 М оцтової кислоти, а подальший діаліз здійснюють проти деіонізованої води з отриманням гелів різної сили, які далі для стерилізації фільтрують через мембранний фільтр 0,22 μm .

Згідно з корисною моделлю, як недублені побічні продукти шкіряного виробництва використовують

голину з сировини великої рогатої худоби після процесу зоління та голину після процесу знезолювання.

Спосіб відрізняється від найбільш близького аналога тим, що при екстрагуванні колагену за змінних температурного та динамічного режимів впродовж 24 годин 0,5 М оцтовою кислотою передбачено додавання 5 мМ етилендіамінтетрацтової кислоти. Ще однією відмінністю є подвійне осадження колагену сухим хлоридом натрію та стерилізація отриманих після діалізу гелів шляхом фільтрування через мембранний фільтр 0,22 μm . При використанні як сировини недублених побічних продуктів шкіряного виробництва у вигляді голини з сировини великої рогатої худоби після процесів зоління та знезолювання не передбачене попереднє оброблення сировини впродовж 6 годин 0,1М розчином гідроксиду натрію та знежирювання впродовж 18 годин у 10 % розчині бутилового спирту.

Незалежно від природи колагеновмісної сировини, якщо колаген повинен контактувати з пошкодженими тканинами, виробничий процес повинен включати оцінку мікробіологічної безпеки відповідно до нормативних вимог та стерилізацію зразка. Для холодної стерилізації препаратів колагену часто використовують стерильні розчини оцтової кислоти та фільтрацію.

Спосіб здійснюють наступним чином.

Механічно подрібнюють сировину до розмірів $(3 \times 3) \times 10^{-3}$ м. Далі проводять промивання підготовленої сировини від супутніх компонентів (водорозчинних білків, а також ліпідів, які знижують терміни зберігання цільового продукту і впливають на подальший процес обробки). На першому етапі сировину промивають водою впродовж 45 хвилин за температури 20 °С. Зміною кожні 15 хвилин води протягом промивання сировини досягається видалення більшої частки білків альбумінової та глобулінової фракцій, часткове відмивання вільних ліпідів за рахунок емульгуючої дії глобулярних білків. Далі проводять видалення неколагенових білків шляхом осадження 10 % розчином хлориду натрію на збовтувальній установці впродовж 1 год. за температури +20 °С, потім протягом 22 годин спокою за температури +4 °С та 1 год. на збовтувальній установці за температури +20 °С. Після чого сировину промивають дистильованою водою до досягнення рівня pH 6,5. Екстрагування колагену здійснюють 0,5 М оцтовою кислотою у співвідношенні 1:10 (маса/об'єм) у присутності 5 мМ етилендіамінтетраоцтової кислоти впродовж 2 годин на збовтувальній установці за температури +20 °С, потім протягом 20 годин спокою за температури +4 °С та 2 год. на збовтувальній установці за температури +20 °С. Після фільтрування через паперовий фільтр з отриманого фільтрату впродовж 24 годин осаджують колаген сухими хлоридом натрію за температури +4 °С із заклучням центрифугуванням отриманого розчину впродовж 30 хвилин зі швидкістю 4000 об/хв. Потім проводять розчинення отриманого осаду колагену у 0,5 М оцтовій кислоті, далі повторно виконують осадження сухим хлоридом натрію впродовж 24 годин за температури +4 °С та центрифугування отриманого розчину впродовж 30 хвилин зі швидкістю 4000 об/хв. Стадія повторного осадження сприяє отриманню максимальної концентрації колагену в робочому розчині, що дозволяє здійснити подальше перерозчинення осаду колагену у мінімальній кількості 0,1 М оцтової кислоти. Після цього отримані кислі розчини колагену діалізують проти деіонізованої води протягом 48 годин зі зміною води кожні 12 годин для одержання "сильних" гелів колагену. Завершальним етапом способу є стадія холодної стерилізації гелів колагену шляхом фільтрування через мембранний фільтр з розміром пор 0,22 μm .

Контроль стерильності отриманих гелів проводять шляхом посіву на поживне середовище LB (Лурія-Бертані) – універсальне середовище для культивування широкого спектру хемоорганотрофних мікроорганізмів. Відсутність мікробного росту є свідченням мікробної чистоти гелів.

Здатність використання отриманих стерильних гелів колагену для терапевтичних та гігієнічних цілей доведено оцінюванням показників біосумісності. Досліджено вплив на життєздатність, проліферацію клітин еукаріот, а також на їх здатність стимулювати клітинну адгезію. Останнє важливо з огляду необхідності прискорення міграції фібробластів у зону ушкодження шляхом створення тимчасового біодеградабельного матриксу при застосуванні гелів колагену на пошкоджених тканинах.

Біосумісність отриманих колагенових гелів оцінено за прикріпленням клітин лінії HEK293 до пластикової поверхні із адсорбованим колагеном [Варенюк І.М., Дзержинський М.Е. Методи цитогістологічної діагностики; навч. посіб. Київ; Інтерсервіс, 2019. 256 с.]. Як позитивний контроль використовували пластик із адсорбованими ателопептидами колагену I типу теляти. Як негативний – поверхню без покриття, попередньо оброблену 0,5 М розчином оцтової кислоти, та двічі промитою фосфатно-сольовим буфером (pH 7,4). На чашку Петрі діаметром 35 мм висівали 2×10^5 клітин HEK293 у 1,5 мл поживного середовища DMEM/high glucose, яке не містило сироватки. Клітини інкубували за температури 37 °С, 5 % CO₂ впродовж 60 хвилин. Після інкубування культиваційне середовище та клітини, які не адгезували відбиралися; поверхню чашки Петрі тричі промивали фосфатно-сольовим буфером (pH 7,4). Отримані препарати фіксували та проводили пофарбування за Папенгеймом. Спостерігається підвищення адгезії клітин лінії HEK293 *in vitro* та істотне прискорення розпластування клітин лінії HEK293 у разі застосування полістирольної поверхні, обробленої отриманими гелями колагену. Останнє сприяє прискоренню міграції фібробластів у зону ушкодження шляхом створення тимчасового біодеградабельного матриксу у разі застосування на рановій поверхні. В подальшому, на етапі ремоделювання, цей тимчасовий матрикс має замінюватися і архітекtonіка тканини повністю

відтворюватися. Це свідчить про біосумісність гелів з клітинами еукаріот та безпечність їх використання.

Технічним результатом корисної моделі є отримання стерильних гелів колагену, які характеризуються біосумісністю, що дозволяє застосовувати їх для терапевтичних та гігієнічних цілей.