



РОССИЙСКОЕ АГЕНТСТВО
ПО ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(19) **RU** (11) **2 212 792** (13) **C2**
(51) МПК⁷ **A 01 N 1/02, A 61 F 9/00**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2001133705/14, 17.12.2001

(24) Дата начала действия патента: 17.12.2001

(46) Опубликовано: 27.09.2003

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: WO 96/39812 A2, 19.12.1996. RU 2173122 C1, 10.09.2001. RU 2166957 C1, 20.05.2001. RU 2086217 C1, 10.08.1997. RU 97111789 A, 10.06.1999.

Адрес для переписки:

107014, Москва, ул. М. Остроумовская, 16,
кв.246, А.В.Васильеву

(71) Заявитель(и):

Киселев Иван Владимирович

(72) Автор(ы):

Смирнов С.В.,
Киселев И.В.,
Емельянов А.В.,
Лешневский А.В.,
Васильев А.В.,
Терский В.В.

(73) Патентообладатель(ли):

Васильев Андрей Валентинович

(54) РАСТВОР ДЛЯ КРИОПРЕЗЕРВАЦИИ КОЖИ И РОГОВИЦЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области медицины, а именно к растворам для криопрезервации кожи и роговицы. Изобретение может быть использовано при создании запасов жизнеспособных кожных трансплантатов в дермопластике и офтальмологии. Раствор для криопрезервации кожи и роговицы включает криопротектор, среду 199 на базе раствора Хэнкса и стимулятор деления клеток. В качестве криопротектора раствор содержит диметилсульфоксид, и/или пропиленгликоль, и/или глицерин в концентрации от 10 до 90% к среде, а предпочтительно от 10 до 20%. В качестве

стимулятора деления клеток раствор содержит эпидермальный фактор роста и/или инсулин, а в качестве эпидермального фактора роста раствор содержит митоген, в частности полипептид. Раствор является эффективной средой для криопрезервации кожи, что способствует созданию единой технологии хранения жизнеспособной аллогенной и аутологичной кожи, созданию банка трансплантатов кожи и роговицы. Изобретение обеспечивает повышение эффективности и снижение стоимости лечения больных с различными повреждениями кожи и роговицы. 4 з.п.ф-лы.



RUSSIAN AGENCY
FOR PATENTS AND TRADEMARKS

(19) **RU** ⁽¹¹⁾ **2 212 792** ⁽¹³⁾ **C2**
(51) Int. Cl.⁷ **A 01 N 1/02, A 61 F 9/00**

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21), (22) Application: **2001133705/14, 17.12.2001**

(24) Effective date for property rights: **17.12.2001**

(46) Date of publication: **27.09.2003**

Mail address:

**107014, Moskva, ul. M. Ostroumovskaja, 1b,
kv.246, A.V.Vasil'evu**

(71) Applicant(s):

Kiselev Ivan Vladimirovich

(72) Inventor(s):

**Smirnov S.V.,
Kiselev I.V.,
Emel'janov A.V.,
Leshnevskij A.V.,
Vasil'ev A.V.,
Terskij V.V.**

(73) Proprietor(s):

Vasil'ev Andrej Valentinovich

(54) **SOLUTION FOR CRYOPRESERVATION OF SKIN AND CORNEA**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, ophthalmology, dermatoplasty.
SUBSTANCE: solution for cryopreservation of skin and cornea includes cryoprotector, medium 199 based upon Hanks' solution and stimulator of cellular division. As cryoprotector the suggested solution contains dimethylsulfoxide and/or propylene glycol, and/or glycerol in concentration ranged 10-90% against medium, but predominantly 10-20%. As stimulator for cellular division the suggested solution contains

epidermal growth factor and/or insulin, and as epidermal growth factor it contains mitogen, polypeptide, in particular. Solution is considered to efficient medium for cutaneous cryopreservation that favors to develop single technology for keeping viable allogenuous and autologous skin and single bank of cutaneous and corneal transplants. The present innovation provides higher efficiency and decreased cost in treating patients with different cutaneous and corneal lesions. EFFECT: higher efficiency. 4 cl

Изобретение относится к области медицины, а именно к растворам для криопрезервации кожи и роговицы. Изобретение может быть использовано при создании запасов жизнеспособных трансплантатов кожи и роговицы в хирургии и офтальмологии.

Для временного восстановления кожного покрова и стимуляции репаративных процессов в ране может использоваться жизнеспособная аллогенная кожа. Она может быть использована также в качестве источника для получения аллогенных трансплантатов кератиноцитов и фибропластов, в комбинации с аутодермопластикой или как основа для последующей трансплантации аутологичных кератиноцитов. С целью снижения количества операций по забору кожи у больных с ожогами и постоянного восстановления кожного покрова может использоваться жизнеспособная аутологичная кожа.

Известны растворы для хранения кожи, например раствор, содержащий диметилсульфоксид, глицерин, формалин, спирт и дистиллированную воду (RU 2144764 C1, 27.01.2000).

Недостатками указанного способа являются сравнительно низкая эффективность. Это обусловлено, в частности, повреждением клеток, малым сроком хранения кожи.

Наиболее близким к заявленному изобретению по технической сущности является способ криопрезервации жизнеспособных клеток с использованием криопротектора типа диметилсульфоксид, пропиленгликоль или полиэтилена гликоль (WO 96/39812 A3, 19.12.1996).

Общими недостатками указанных растворов являются сравнительно низкая эффективность сохранения клеток живыми, высокая сложность и стоимость хранения.

Целью изобретения является создание эффективной среды для криопрезервации кожи, что способствует созданию единой технологии хранения жизнеспособной аллогенной и аутологичной кожи, повышение эффективности и снижение стоимости лечения больных с различными повреждениями кожного покрова и роговицы.

Поставленная цель достигается тем, что для сохранения жизнеспособности и сохранения специфической функции клеток в течение длительного времени разработан раствор, содержащий 199 среду на базе раствора Хэнкса, криопротектор и эпидермальный фактор роста.

Среда 199 разработана в 1950 г. Ее характеризуют широкий спектр питательных веществ и относительно невысокая их концентрация (Пинаев Г.П. Методы культивирования клеток. Сборник научных трудов. - Л.: Наука, 1988, с.56). В настоящее время среда 199 используется без каких-либо добавок как поддерживающая для первичных клеток.

Раствор Хэнкса представляет собой растворенный краситель фенол красный в солевом растворе (Yasuda Y. et al. Journal of Reproduction and Fertility, 1992, 96, 521-528).

В качестве стимулятора деления клеток можно использовать любой митоген полипептидной природы, в частности эпидермальный фактор роста, инсулин и др.

Криопротектором может служить любые известные своей функцией реагенты, например диметилсульфоксид, пропиленгликоль, глицерин и др. Причем концентрация криопротектора может составлять от 10 до 90% от среды, а предпочтительно 10-20%.

Раствор получают простым смешением компонентов. Например, в готовый раствор среды 199 на базе раствора Хэнкса добавляют глицерин 100-150 мг/мл, гомогенизируют, затем добавляют митоген от 7 до 12 нг/мл.

После помещения кожи в данный раствор она замораживается и хранится в морозильных камерах при температуре -18°C, -70°C или в жидком азоте при -196°C. По мере необходимости кожные трансплантаты размораживают и накладывают на раны цельные или перфорированные лоскуты. После 45 суток хранения при -70°C количество живых клеток в коже снижается в среднем всего на 29%, что позволяет получать при культивировании кератиноцитов (основного типа клеток эпидермиса) колонии. Раствор для криопрезервации физиологически совместим и его не надо удалять перед наложением пациенту.

Возможность хранения жизнеспособной кожи при отрицательных температурах с целью ее последующего использования в качестве самостоятельного покрытия или для получения

клеточных трансплантатов свидетельствует о соответствии заявляемого решения условию патентоспособности "новизна".

Использование совокупности настоящих признаков в их функциональном единстве для достижения поставленной задачи свидетельствует о соответствии заявляемого решения условию "изобретательский уровень".

Использование данных признаков изобретения позволяет получить новый технический результат - повысить качество кожных трансплантатов и получать жизнеспособную кожу, близкую по своим свойствам к нормальной коже, и создать банк трансплантатов кожи с длительным сроком хранения.

Пример 1. Способ апробирован и реализован при выполнении пластики гранулирующей раны у крысы посредством пересадки аутологичного кожного лоскута после хранения на модели с исключением контракции раны.

Протокол опыта 30, крыса 12, самец.

10.05.99 у крысы линии Вистар, весом 250 г под общим наркозом взят полнослойный кожный лоскут площадью 0,7 см². Биоптат помещен в стеклянную тару с разработанным раствором. Замораживание осуществляли со скоростью 1-2°C в минуту при -70°C. Через 27 суток хранения (за трое суток до трансплантации) в область верхней трети части спины иссекли полнослойный кожный лоскут. Для предотвращения контракции в рану вшили пластиковое кольцо, имеющее вертикальную и горизонтальную поверхности. Через 30 суток хранения произвели размораживание кожи при постоянной температуре около 42 °C, после чего перенесли на гранулирующую рану. Поверх трансплантата наложили перевязочное средство Jelonel и салфетку, смоченную в физиологическом растворе с гентамицином (0,16 мг/мл).

При осмотре раны через 5 суток отмечено наличие пересаженного лоскута.

Прижившиеся трансплантаты были бледно-розового цвета, плотно прилежали к раневой поверхности. Края лоскутов отделить от грануляционной ткани не удавалось. При взятии биопсии в месте разреза прижившейся кожи возникало интенсивное кровотечение. При гистологическом исследовании наблюдалась частичная отслойка эпидермиса. В дерме видимых изменений обнаружено не было. Базальная мембрана сохранена. К 15-м суткам трансплантаты имели те же размеры, плотно прилежали к ране. Поверхность лоскутов была покрыта тонким, гладким, блестящим эпителием. При гистологическом исследовании подлежащая грануляционная ткань имела тесный контакт с дермой пересаженных кожных лоскутов. В глубоких слоях дермы наблюдалась повышенная васкуляризация, лейкоцитарная инфильтрация и увеличение числа фибробластов. В зоне дермо-эпидермального контакта отмечалось нарушение связи дермы и эпидермиса по всей длине кожного лоскута, однако отслоения эпидермиса не наблюдалось. Базальная мембрана эпидермиса была не нарушена. В эпидермисе определялись явления акантоза и гипертрофии кератиноцитов в зернистом слое. При этом в увеличенных в размерах кератиноцитах отсутствовали гранулы кератогиалина. В последующем с краев пересаженной кожи наблюдалась миграция эпителия на грануляционную ткань и рост волос в трансплантате. К 30-м суткам приживший лоскут несколько увеличился в размере за счет краевой эпителизации. Трансплантат имел бледно-розовый цвет, плотно держался на раневом ложе. На грануляционной ткани вокруг трансплантатов была видна тонкая полоска молодого эпителия. В центре наблюдался активный рост волос. При гистологическом исследовании трансплантатов кожных лоскутов грануляционная ткань отсутствовала. Трансплантаты кожных лоскутов по своему строению соответствовали нормальной коже. В верхнем слое дермы увеличено количество фибробластов. В зоне дермо-эпидермального контакта местами отмечалось нарушение связи дермы и эпидермиса, однако отслоения эпидермиса не наблюдалось. Эпидермис был утолщен за счет средних слоев. Процесс ороговения не нарушен. Признаков фенотипической трансформации кератиноцитов обнаружено не было.

Пример 2. Больная С-ва, 69 лет, история болезни 14559, находилась на стационарном лечении в ожоговом центре НИИ СП им. Н.В. Склифосовского с диагнозом: ожог пламенем

II-IIIА, Б степени туловища, правой ягодицы и правого бедра общей площадью 20% поверхности тела (ПГБ-9%). В связи с отказом больной от операции аутодермопластика лечение ожоговых ран проводили консервативно. В результате проведенного комплексного лечения на 50-е сутки у больной оставались гранулирующие раны на площади 1,5% поверхности тела. На 51-е сутки с момента получения травмы больной была произведена аллотрансплантация пластов эпидермальных кератиноцитов, выращенных из трупной кожи, хранившейся в разработанном консерванте в течение 20 суток. Первая перевязка произведена через трое суток, при этом отмечена выраженная краевая эпителизация, а также появление нескольких небольших (около 3-5 мм²) островков эпителизации. Площадь ран уменьшилась примерно на 1/3, однако пласт клеток визуально не определялся. Раны были закрыты перевязочным средством "JeloneI"; сверху - повязкой с левомеколем. На последующих перевязках через 6 и 8 суток с момента трансплантации было отмечено прогрессирующее сокращение ран за счет краевой эпителизации и увеличения площади островков эпителизации. К 10-м суткам у больной оставались раны на площади около 3 см². На 15-е сутки после трансплантации (66-е сутки с момента получения травмы) кожный покров был полностью восстановлен.

Предлагаемый состав обеспечивает сохранение жизнеспособности кожи и роговицы в течение длительного времени и позволяет создать банк трансплантатов, пригодных для закрытия ран и ожогов кожи и роговицы.

Формула изобретения

1. Раствор для криопрезервации кожи и роговицы, включающий криопротектор, отличающийся тем, что раствор дополнительно содержит 199 среду на базе раствора Хэнкса и стимулятор деления клеток.

2. Раствор по п. 1, отличающийся тем, что в качестве криопротектора раствор содержит диметилсульфоксид, и/или пропиленгликоль, и/или глицерин в концентрации от 10 до 90% к среде, а предпочтительно от 10 до 20%.

3. Раствор по пп. 1 и 2, отличающийся тем, что в качестве стимулятора деления клеток раствор содержит эпидермальный фактор роста и/или инсулин.

4. Раствор по пп. 1,3, отличающийся тем, что в качестве эпидермального фактора роста раствор содержит митоген.

5. Раствор по пп. 1 и 2, отличающийся тем, что в качестве митогена раствор содержит полипептид.