



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A01N 1/02 (2022.05)

(21)(22) Заявка: 2021123452, 04.08.2021

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
04.08.2021

Дата регистрации:
23.09.2022

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 04.08.2021

(45) Опубликовано: 23.09.2022 Бюл. № 27

Адрес для переписки:

450008, г. Уфа, ул. Пушкина, 90, Уфимский
НИИ глазных болезней, Патентный отдел

(72) Автор(ы):

Бикбов Мухаррам Мухтарамович (RU),
Халимов Азат Рашидович (RU),
Казакбаев Ренат Амирович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Государственное бюджетное учреждение
"Уфимский научно-исследовательский
институт глазных болезней Академии наук
Республики Башкортостан" (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: KIM J., TSENG S. "Transplantation
of preserved human amniotic membrane for
surface reconstruction in severely damaged rabbit
corneas", Cornea, 1995, sept., 14(5), p. 473-484.
RU 2267922 C2, 20.01.2006. RU 2214091 C1,
20.10.2003. US 6326019 B1, 04.12.2001.

(54) СПОСОБ КОНСЕРВАЦИИ АМНИОТИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, в частности к офтальмологии, и может быть использовано для консервации донорской амниотической мембраны, предназначенной для трансплантации при выполнении офтальмохирургических вмешательств. Способ консервации амниотической мембраны донорской плаценты включает отмывание амниотической мембраны и ее обработку в растворе антибиотиков, содержащем амфотерицин, укладывание амниотической мембраны на стерильную бумагу, разрезание на диски и помещение в среду, содержащую глицерин, для хранения. Амниотическую мембрану отмывают раствором Рингера. Далее её помещают в раствор Рингера, содержащий 100 мг/мл натрия оксibuтирата, затем в 0,01% хлоргексидин в физрастворе, далее проводят обработку

раствором антибиотиков в физрастворе, содержащем 0,25 мг/мл амфотерицина В, 0,1 мг/мл ципрофлоксацина и 0,25 мг/мл цефтриаксона. После этого амниотическую мембрану выдерживают в растворе, содержащем глицерин с диметилсульфоксидом в соотношении 4:1 и натрия оксibuтират 10 мг/мл. В качестве стерильной бумаги для укладывания амниотической мембраны используют бумагу для выпекания, а хранят в растворе, содержащем глицерин с диметилсульфоксидом в соотношении 4:1 и 10 мг/мл натрия оксibuтирата при температуре минус 12-18°C. Предлагаемый способ консервации амниотической мембраны донорской плаценты обеспечивает улучшение функционального качества биоматериала за счет сохранения его нативных свойств. 2 пр.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A01N 1/02 (2022.05)(21)(22) Application: **2021123452, 04.08.2021**(24) Effective date for property rights:
04.08.2021Registration date:
23.09.2022

Priority:

(22) Date of filing: **04.08.2021**(45) Date of publication: **23.09.2022** Bull. № 27

Mail address:

**450008, g. Ufa, ul. Pushkina, 90, Ufimskij NII
glaznykh boleznej, Patentnyj otel**

(72) Inventor(s):

**Bikbov Mukharram Mukhtaramovich (RU),
Khalimov Azat Rashidovich (RU),
Kazakbaev Renat Amirovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Gosudarstvennoe byudzhethnoe uchrezhdenie
"Ufimskij nauchno-issledovatel'skij institut
glaznykh boleznej Akademii nauk Respubliki
Bashkortostan" (RU)**(54) **METHOD FOR PRESERVING THE AMNIOTIC MEMBRANE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, in particular, to ophthalmology, and can be used to preserve the donor amniotic membrane intended for transplantation in the course of ophthalmic surgical interventions. Method for preserving the amniotic membrane of the donor placenta includes washing the amniotic membrane and treating in an amphotericin-containing solution of antibiotic agents, laying the amniotic membrane on sterile paper, cutting into disks and placing in a glycerin-containing medium for storage. The amniotic membrane is washed with Ringer's solution. Then the membrane is placed in Ringer's solution containing 100 mg/ml sodium oxybutyrate, then in 0.01% chlorhexidine in saline, followed by treating with a solution of antibiotic agents

in saline containing 0.25 mg/ml amphotericin B, 0.1 mg/ml ciprofloxacin, and 0.25 mg/ml ceftriaxone. After that, the amniotic membrane is held in a solution containing glycerin with dimethyl sulphoxide in a 4:1 ratio and sodium oxybutyrate 10 mg/ml. Baking paper is used as sterile paper for laying the amniotic membrane, and the membrane is stored in a solution containing glycerin with dimethyl sulphoxide in a 4:1 ratio and 10 mg/ml sodium oxybutyrate at a temperature of 12 to 18°C below zero.

EFFECT: proposed method for preserving the amniotic membrane of the donor placenta improves the functional quality of the biological material due to the preservation of the native properties thereof.

1 cl, 2 ex

RU 2 780 475 C1

RU 2 780 475 C1

Изобретение относится к медицине, в частности к офтальмологии, и может быть использовано для консервации донорской амниотической мембраны, предназначенной для трансплантации при выполнении офтальмохирургических вмешательств.

Известен способ консервации донорской амниотической оболочки, полученной после освобождения ткани от сгустков крови и хориона, включающий разделение ее на сегменты 28-30 мм, замораживание при температуре минус 40°C, лиофилизацию до остаточной влажности 2-5%, дальнейшую стерилизацию (γ -излучение в дозе 25 кГр) и упаковывание [Федорова Е.А., Слонимский А.Ю., Батманов Ю.Е. Способ консервации амниотической мембраны // Патент RU 2267922 от 20.01.2006]. Заявленный срок хранения трансплантата 1,5 года. Перед употреблением законсервированную таким образом амниотическую мембрану регидратируют в стерильном физрастворе или растворе антибиотика в течение 40-60 мин. Лيوфильная (сублимационная) сушка является одним из методов сохранения нативных свойств биологических материалов. Однако существует мнение, что замораживание биотканей, в частности амниотической мембраны, не желательно. С тем, чтобы избежать заморозки амниона применяют его высушивание над силикагелем. Кроме этого для проведения лиофилизации требуется специальное и дорогостоящее оборудование, а для достаточно продолжительной (40-60 мин) регидратации материала перед его применением используется физраствор, тогда как более физиологичным аналогом последнего является, например, раствор Рингера.

Известен метод консервации, включающий очистку плаценты от кровяных сгустков в 0,9% растворе натрия хлорида, отделение амниона от хориона, обработку выделенной амниотической оболочки 0,02% раствором хлоргексидина в течение 10 минут, раствором гентамицина (40 мг/мл) и амфотерицина В (2,5 мг/мл) продолжительностью 10 минут. Трансплантат погружают на 20 мин в глицерол, фиксируют на металлической рамке и сушат над силикагелем в течение 18-24 часов. Хранится такая мембрана в стерильной упаковке при комнатных условиях до 1,5 лет [Милюдин Е.С., Золотарев А.В., Волова Л.Т. Способ консервации амниотической мембраны // Патент RU 2214091 от 20.10.2003]. Данный способ заготовки материала не предполагает его дополнительную стерилизацию, выполнение которой желательно, особенно для предложенных авторами комнатных температурных условий хранения. Кроме этого данный способ консервации биоматериала может быть сопряжен с существенным снижением сохранности клеток амниотической мембраны [Меликова Т.П. Амниотическая мембрана и ее применение в офтальмологии // *Oftalmologiya*. 2010; 3:115-122].

Наиболее близким аналогом изобретения является метод консервации J. Kim и S. Tseng, при котором плацента очищается, промывается стерильным физраствором, затем в растворе антибиотиков: 100 мг/мл неомицина, 50 мг/мл пенициллина, 50 мг/мл стрептомицина и 2,5 мг/мл амфотерицина. Амнион укладывается на нитроцеллюлозную бумагу, которую разрезают на диски удобного размера. Хранят в среде Игла и глицерина (1:1) при температуре минус 70°C. Срок хранения 2 года [Kim J., Tseng S. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas // *Cornea*. 1995; 14:473-484]. Низкие температуры являются хорошим вариантом сохранения нативных свойств амниотической мембраны, однако следует отметить, что в данном случае хранение биоткани будет осуществляться в водном растворе, состоящем на 50% из среды Игла и на 50% из глицерина. Температура замерзания такого раствора глицерина составит минус 23°C [Справочник химика 21, <https://chem21.info/index/>]. При этом амниотическая мембрана, как и водный раствор для ее хранения будут находиться в замороженном состоянии. В последующем перед началом работы с биоматериалом потребуется нежелательный этап его разморозки, что может привести к утрате ряда

нативных свойств амниона.

Задачей изобретения является повышение эффективности консервации амниотической мембраны.

Технический результат - улучшение функционального качества биоматериала за счет сохранения его нативных свойств.

Предлагаемый способ консервации донорской амниотической мембраны выполняют следующим образом. Производят забор фрагмента плаценты в роддоме в стерильных условиях после кесарева сечения у беременных женщин, обследованных на гепатит В и С, ВИЧ и сифилис. Обработку донорской ткани осуществляют в условиях стерильного бокса под ламинарным потоком. В период не более 3-х часов после забора плацентарную ткань отмывают раствором Рингера, производят отделение амниона от хориона. Выделенную амниотическую мембрану отмывают от следов крови раствором Рингера, погружают в раствор Рингера, содержащий натрия оксibuтирата 100 мг/мл на 10 минут. Затем помещают на 10 минут в 0,01% раствор хлоргексидина в физрастворе, после на 30 минут в раствор антибиотиков в физрастворе, содержащий 0,25 мг/мл амфотерицина В, 0,1 мг/мл ципрофлоксацина и 0,25 мг/мл цефтриаксона. Далее амниотическую мембрану помещают на 30 мин в стерильный раствор, содержащий глицерин и диметилсульфоксид (ДМСО) в соотношении 4:1, а также натрия оксibuтирата 10 мг/мл. После этого мембрану размещают (расправляют) на простерилизованной бумаге для выпекания и после удаления излишков раствора глицерина разрезают вместе с бумагой на диски требуемого размера (например, 20×20 мм). После отделения от бумаги амниотическую мембрану упаковывают во флаконы с раствором, содержащим глицерин с диметилсульфоксид в соотношении 4:1, а также 10 мг/мл натрия оксibuтирата. Флаконы с мембраной стерилизуют ионизирующим излучением дозой 1,5 Мрад на установке Со. Выполняют микробиологические исследования готовых образцов материала. Хранение амниотической мембраны осуществляется при температуре минус 12-18°C. Срок хранения консервированной ткани составляет 2 года.

Существенными отличительными признаками способа являются:

- Для отмывания амниотической мембраны используется более физиологичный раствор Рингера, который способен эффективно возмещать потери экстрацеллюлярной, внутриклеточной жидкости и основных электролитов натрия, калия, кальция, хлоридов, в частности в изолированных тканях.

- Натрия оксibuтират вводится в состав раствора для повышения антигипоксической сопротивляемости и метаболической устойчивости трансплантата. Показано, что сохранение кислорода в донорских тканях является важным аспектом обеспечения их жизнестойкости [Подопригора Р.Н. Методы консервации донорского материала // Вестник ОГУ. дек. 2004; 100-103].

Для обработки материала используют концентрацию хлоргексидина 0,01%; препарат разводится физраствором. При этом удаляются следы кальция нежелательные при дальнейшем использовании цефтриаксона.

- Используют раствор антибиотиков содержащий 0,25 мг/мл амфотерицина В, 0,1 мг/мл ципрофлоксацина и 0,25 мг/мл цефтриаксона, разведенный физраствором, воздействующий на грамположительную, грамотрицательную, анаэробную патогенную флору, оказывающий фунгицидное действие.

- Раствор амфотерицина В имеет ярко выраженный желто-оранжевый цвет. Предлагаемая доза (0,25 мг/мл) препарата позволяет сохранить его противогрибковую эффективность и исключить цитотоксическое действие на амнион; при этом достигается полное растворение антибиотика. После завершения обработки последний легко

удаляется с поверхности амниотической мембраны, не окрашивая ее в бледно-желтый цвет. Тогда как в более высоких концентрациях растворимость амфотерицина В снижается, вместе с этим препарат заметно окрашивает амниотическую мембрану, придавая ей желтоватый оттенок.

5 - ДМСО вносится в состав раствора с глицерином в качестве криопротектора для обеспечения жизнеспособности клеток и биоткани. При этом образующийся раствор 75% глицерина имеет температуру заморозания минус 29,8°C, что не приводит к замораживанию, как раствора глицерина, так и биоматериала, который хранится при минус 12 - 18°C.

10 - Нарезка деликатной невысушенной амниотической мембраны имеет определенные сложности: ее необходимо фиксировать на рабочей поверхности, при контакте с которой возможны гибель клеток и вероятность биологического загрязнения биоткани. Для нарезки невысушенной тонкой амниотической мембраны используется простерилизованная бумага для выпекания, в отличие от известного применения
15 нитроцеллюлозной бумаги, работа с которой часто затрудняет отделение трансплантата от ее поверхности. При необходимости (в случае применения другой технологии обработки материала) амнион можно сушить над силикагелем с использованием бумаги для выпекания, избегая способа сушки на металлической рамке.

Пример 1

20 Амниотическая мембрана была законсервирована по предлагаемому способу. Произведен забор фрагмента плаценты в роддоме в стерильных условиях операционной после кесарева сечения у беременной женщины, предварительно обследованной на ВИЧ, гепатит В и С, сифилис. Материал помещали в стерильный контейнер и термосумку, где поддерживалась температура +8+10°C. Через 2 часа после забора в
25 условиях стерильного бокса под ламинарным потоком осуществлена обработка донорской ткани. Плацентарную ткань отмывали раствором Рингера, произвели отделение амниона от хориона. Выделенную амниотическую мембрану отмывали от следов крови раствором Рингера, помещали на 10 минут в оксibuтират натрия 100 мг/мл, разведенный раствором Рингера. Затем биоткань переносили на 10 минут в 0,01%
30 хлоргексидин в физрастворе, после на 30 минут в раствор антибиотиков, содержащий 0,25 мг/мл амфотерицина В, 0,1 мг/мл ципрофлоксацина и 0,25 мг/мл цефтриаксона, растворенных в физрастворе. Далее амниотическую мембрану помещали на 30 минут в стерильный раствор, содержащий глицерин и диметилсульфоксид в соотношении 4:1, а также 10 мг/мл натрия оксibuтирата. Затем мембрану расправляли на
35 простерилизованной бумаге для выпекания и после удаления излишков раствора глицерина разрезали вместе с бумагой на диски (размером 20×20 мм). После отделения от бумаги амниотическую мембрану упаковывали во флаконы с раствором глицерина с диметилсульфоксид в соотношении 4:1 и 10 мг/мл натрия оксibuтирата. Флаконы с амниотической мембраной стерилизовали ионизирующим излучением дозой 1,5 Мрад
40 на установке Co⁶⁰. Готовые образцы материала (4 флакона) переданы на бактериологический анализ. Получен протокол лабораторных испытаний амниотической мембраны № ПР1030 с результатами микробиологических исследований, подтверждающими ее стерильность.

45 Законсервированная по предлагаемому способу амниотическая мембрана хранилась в течение 3 недель при температуре минус 18°C. Амниотическая мембрана отмывалась от глицерина раствором Рингера и выдерживалась 5 мин в растворе антибиотика (ципрофлоксацин 0,3%). Больной С, 42 года, диагноз: внутренний птеригиум III степени правого глаза. Острота зрения перед хирургическим вмешательством: 0,6. После

удаления новообразования роговой оболочки и конъюнктивы правого глаза была проведена трансплантация амниотической мембраны размером 6×6 мм. Эпителизация амниотической мембраны завершилась на 4 сутки после хирургического вмешательства. Послеоперационный период протекал без осложнений. На 4-й день острота зрения - 0,8 без коррекции. Достигнут хороший косметический результат.

Пример 2

Использовали амниотическую мембрану, законсервированную предлагаемым способом. Амниотическая мембрана хранилась в течение 20 месяцев при температуре минус 18°C. Получен протокол микробиологических исследований (№ ПР574), подтверждающий его стерильность. Амниотическая мембрана отмывалась от глицерина раствором Рингера и выдерживалась в течение 5 мин в растворе антибиотика (ципрофлоксацин 0,3%). Больной Т., 49 лет, поступил с диагнозом: эрозия роговицы левого глаза. Острота зрения: 0,01. Было проведено «биопокрытие» раневого участка амниотической мембраной, размером 11×11 мм, которую укладывали на роговицу и фиксировали непрерывным швом 10.0. Послеоперационный период протекал без каких-либо осложнений. На 6-й день после операции острота зрения составила 0,3. Достигнут удовлетворительный косметический и лечебный результат.

Таким образом, применение амниотической мембраны, полученной по предлагаемому способу, позволяет использовать ее в отдаленные сроки после консервации, обеспечивает проведение эффективных хирургических вмешательств с хорошими функциональными результатами за счет сохранения ее нативных свойств.

(57) Формула изобретения

Способ консервации амниотической мембраны донорской плаценты, включающий отмывание амниотической мембраны и ее обработку в растворе антибиотиков, содержащем амфотерицин, укладывание амниотической мембраны на стерильную бумагу, разрезание на диски и помещение в среду, содержащую глицерин, для хранения в течение 2 лет, отличающийся тем, что амниотическую мембрану отмывают раствором Рингера, после чего помещают в раствор Рингера, содержащий 100 мг/мл натрия оксибутирата, затем в 0,01% хлоргексидин в физрастворе, далее проводят обработку раствором антибиотиков в физрастворе, содержащем 0,25 мг/мл амфотерицина В, 0,1 мг/мл ципрофлоксацина и 0,25 мг/мл цефтриаксона, после чего амниотическую мембрану выдерживают в растворе, содержащем глицерин с диметилсульфоксидом в соотношении 4:1 и натрия оксибутират 10 мг/мл, причем в качестве бумаги для укладывания амниотической мембраны используют бумагу для выпекания, а хранят в растворе, содержащем глицерин с диметилсульфоксидом в соотношении 4:1 и 10 мг/мл натрия оксибутирата при температуре минус 12-18°C.