



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **106323** (13) **C2**
(51) МПК (2014.01)
A61K 35/16 (2006.01)
A61P 17/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: а 2013 09195	(72) Винахідник(и): Холодкова Олена Леонідівна (UA), Нескоромна Наталя Владиславівна (UA), Чеботарьова Світлана Олегівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 22.07.2013	(73) Власник(и): ОДЕСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ, провулок Валіховський, 2, м. Одеса, 65082 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 11.08.2014	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: RU 2470677 C1, 27.12.2012 UA 74943 U, 12.11.2012 Глухов А.А. Оценка восстановительных процессов в коже при применении тромбоцитарного концентрата и гидроимпульсного воздействия / А.А. Глухов, Н.Т. Алексеева // Бабухинские чтения в Орле 1–2 июня 2011 г. Материалы 8-й ВСероссийской научной конференции Москва ЗАО "Ретиноиды" 2011. - С. 128-133 Ахмеров Р.Р. Применение обогащённой тромбоцитами аутоплазмы для лечения фотодерматоза / Р.Р. Ахмеров, Р.Ф. Зарудий // Регенеративная хирургия №3, 2005. - С. 1-4
(41) Публікація відомостей про заявку: 25.12.2013, Бюл.№ 24	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.08.2014, Бюл.№ 15	

(54) СПОСІБ СТИМУЛЯЦІЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ ШКІРИ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ДЕРМАТИТІ

(57) Реферат:

Винахід належить до галузі медицини, а саме дерматокосметології, і може бути використаний для стимуляції регенерації шкіри людини в дерматології, в естетичній косметології, щелепно-лицьовій хірургії, в опіковій медицині, при лікуванні виразково-некротичних уражень шкіри, контактній алергології. Спосіб регенерації шкіри при експериментальному дерматиті полягає у застосуванні збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП) у дозі 0,1 мл з концентрацією тромбоцитів 1 000 000 мкл, де після першої ін'єкції ЗТП на 10, 20 та 30 добу досліджують експериментальну ділянку шляхом дислокації шийних хребців під впливом легкої ефірної анестезії і при відсутності запалення або інфільтрації стимуляцію регенерації шкіри вважають ефективною.

UA 106323 C2

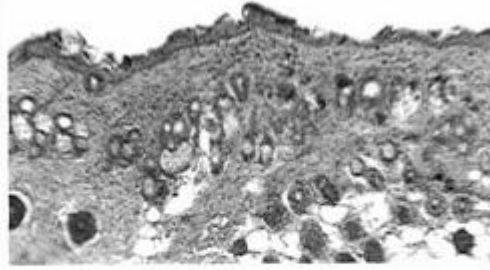


Fig. 3

Винахід належить до галузі медицини в дерматології, в естетичній косметології, щелепно-лицьовій хірургії, в опіковій медицині, при лікуванні виразково-некротичних уражень шкіри, контактній алергології.

Клітинні елементи крові, а саме тромбоцити, здатні значно підвищувати концентрацію високоактивних біологічних субстанцій та факторів росту, які у сукупності посилюють хемотаксис, регулюють проліферацію і диференціацію епітеліоцитів, ангиогенез, рівно як і інші найважливіші регенеративні процеси шкіри людини [1].

Відомі фундаментальні розробки в області регенерації опорно-м'язового апарата, при яких тромбоцити ініціюють комплекс біохімічних реакцій, вступаючи до контакту із фібрином та формуючи в сполучній тканині "каркас" із біологічно активних фібринових ланцюгів - природних компонентів сполучної тканини людини [2].

Цьому допомагає низка факторів, а саме цитокінів, інтерлейкінів та інших біологічно активних чинників, вивільнених із тромбоцитів, які в свою чергу стимулюють виробіток колагену [3].

Відомий препарат "Фібrolан", який містить плазмін та дезоксирибонуклеазу - гідролітичні ферменти, отримані з плазми.

Але цей препарат може викликати алергічні реакції.

Також ці способи не є достатньо ефективними, що пролонгує строки відновлення структури шкірних покривів.

Найбільш близьким до запропонованого технічного рішення є розробка, в якій застосовуються препарати, що включають компоненти донорської крові чи крові тварин, наприклад солкосерил, який використовується локально у вигляді апікацій чи зрошень [4].

Однак ці препарати викликають у ряді випадків реакції, пов'язані з імунною несумісністю.

В основу винаходу поставлено задачу вдосконалення способу регенерації шкіри шляхом застосування збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП), в якій точно визначено апаратним методом концентрацію тромбоцитів у плазмі та розрахована кількість ростових факторів, що дозволить вірогідно ініціювати репаративні і регенеративні властивості шкіри в експерименті при використанні ЗТП.

Поставлена задача вирішується тим, що, згідно з винаходом, застосовують збагачену тромбоцитами плазму (ЗТП) у дозі 0,1 мл з концентрацією тромбоцитів 1 000 000 мкл, при цьому після першої ін'єкції ЗТП на 10, 20 та 30 добу досліджують експериментальну ділянку шляхом дислокації шийних хребців під впливом легкої ефірної анестезії і при відсутності запалення або інфільтрації стимуляцію регенерації шкіри вважають ефективною.

Спосіб виконується наступним чином.

Як приклад, було досліджено вплив плазми, що збагачена тромбоцитами, на репаративні і регенеративні властивості шкіри в умовах експериментального atopічного дерматиту (АД).

АД є хронічним захворюванням, котре може призводити до порушень в емоційній сфері, знижувати якість життя людини і призводити до соціальної дезадаптації. Оскільки сучасні методи лікування недостатньо ефективні і не завжди безпечні, пошук альтернативних методів вирішення цієї патології залишається актуальним.

Експеримент був проведений на 60 статевозрілих самицях мишей лінії ICR масою 22-30 г. У період експерименту тварини знаходилися в умовах віварію. Попередньо у вибраній ділянці шиї вибривали шерстяний покрив. Усіх тварин розподілили на 2 групи. Тваринам I групи (контрольна, 20 тварин) щодня, протягом 10 днів, втирали біхромат калію у вибрану область. Далі в дні, які відповідають строкам експериментальної групи, спостерігали за самовідновленням.

Тваринам II групи (експериментальна група - 40 тварин) втирали біхромат калію. Перше введення ЗТП здійснювали наступного дня після закінчення втирання біхромату калію, через 7 днів введення повторювали. Ін'єкції проводили внутрішньошкірно в дозі 0,1 мл з концентрацією тромбоцитів 1 000 000/мкл.

ЗТП отримували шляхом забирання периферійної крові на апараті SmartPrep (Harvester Corp.). Контроль концентрації тромбоцитів здійснювали шляхом підготовки мазка з пофарбуванням за Романовським-Гімзе.

Виведення тварин з експерименту проводили на 10-у, 20-у та 30-у добу після першої ін'єкції ЗТП шляхом дислокації шийних хребців під легкою ефірною анестезією. День останнього втирання біхромату калію вважали нульовим днем експерименту.

Шкіру фіксували у 10 % розчині забуференого формаліну. Заливку в "Гістомікс" проводили за загальноприйнятою методикою. Мікротомічні зрізи завтовшки 3-5 мкм фарбували гематоксилін - еозином за Ван-Гізоном і досліджували з використанням світлового мікроскопа "Leica-DMLS".

На 1-й день експерименту у тварин обох груп спостерігалось гостре запалення з вираженою ексудацією, наявність ерозій, вкритих кірками, мокнуття, гіперемія шкірного покриву, набряк, мікроевізули, тріщини по усій поверхні місця контакту з хімічним агентом. В епідермісі навколо пухирців - значний міжклітинний набряк (спонгіоз), внутріклітинний набряк, явища дискератозу, екзоцитозу, а також акантозу (фіг. 1 - А, Б). Внаслідок великої кількості пухирців і наявності внутріклітинного набряку спостерігається картина ретикулярної дегенерації епідермісу, пухирці відділяються один від одного тонкою перетинкою, яка представлена збереженими клітинами набряклих епідермальних клітин, створюючи багатокамерний міхур. Міхур та пухирі містять лімфоцити, нейтрофіли, еозинофіли і зруйновані епідермальні клітини.

У дермі - повнокров'я судин, порушення цілісності тканин стінок судин з ділянками периваскулярних крововиливів, а також з периваскулярними інфільтратами, представленими лімфоцитами, гістіоцитами з домішкою сегментоядерних лейкоцитів. Ендотелій судин гіперплазований, просвіти звужені. При фарбуванні за Ван-Гізеном у дермі спостерігається картина набрякового розволокнення, дистрофічні зміни фіброцитів, фрагментація волокон, склероз стінок судин, набряк.

На 10-тий день експерименту у шкірі тварин I групи спостерігалася макроскопічна картина підгострого запалення, середнього ступеня вираженості гіперемія, наявність великої кількості ерозій з чіткими краями і глибоким дном. Корки і мокнуття середнього ступеня важкості. Спостерігалася кровоточивість виразок і витончення шкіряного покриття.

Мікроскопічні зміни характеризуються спонгіозом, внутріклітинним набряком, пухирцями меншого розміру, ніж спочатку експерименту. Краї виразок нерівні, дно заповнено ороговілими лусками епідермісу, лейкоцитарними елементами. Мається помірний акантоз, різного ступеня дискератоз. Добре виражений запальний інфільтрат внутріепідермальної локалізації представлений різними клітинами - лімфоцитами (переважна більшість), нейтрофілами, еозинофілами, гістіоцитами. Має місце значна міграція нейтрофілів і лімфоцитів в епідерміс.

У тварин II групи на 10-тий день експерименту виявляється картина підгострого АД, з відсутністю гіперемії, наявністю великої кількості корок і ерозій середнього ступеня важкості із чіткими краями. Спостерігається тенденція до покриття поверхні шкіри пушковим волоссям. Епідерміс і дерма ледь витончені за рахунок зменшення інфільтрації. В сосочках визначається наявність поодиноких пухирців, слабовираженого спонгіоза, дрібних вогнищ паракератозу, помірного фіброзу. На місці пухирців спостерігається помірний розвиток волокняної поєднуючої тканини.

На 30-ту добу тварин I групи поверхня шкіри суха, збереглися корки, екскоріації. Спостерігається нерівномірний ріст волосся на ушкодженій поверхні в результаті наявності рубцевих змін шкіри. При гістологічному дослідженні епідермісу виявлено, що базальна мембрана епідермісу витончена, дефрагментована. Зернистий шар представлений вогнищево, явища спонгіозу досягають верхніх шарів, дещо менше виражений паракератоз (фіг. 2). В дермі - зменшення набряку, підсилений розвиток волокнистої з'єднувальної тканини на місці пухирців. Вогнищева мікрогістіоцитарна інфільтрація з ділянками епітеліоїдних клітин з наявністю поодиноких гігантських клітин. При фарбуванні за Ван - Гізеном у дермі виявляється набрякове розволокнення, дистрофічно зміненні фіброцити, фрагментація волокон, склероз стінок судин, набряк.

У II групі тварин до моменту завершення експерименту поверхня шкіри відрізнялася від оточуючої її тканини. У результаті підсиленого росту волосся ділянка контакту з тригером повністю покрита шерстю. Мікроскопічно визначається наявність пошарової будови шкіри, добре виражені базальний і сосочковий шари, що вказує на позитивну динаміку регенерації і адекватну трофіку. У базальному і мальпігіївому шарах виражені мітотичні фігури, виявляється наявність молоді рубцевої тканини, яка багата клітинами фібробластичного ряду, рясно оздобленої кровоносними судинами різного калібру (фіг. 3). Придатки шкіри правильної структури.

У порівнянні з прототипом, заявлене технічне рішення, за рахунок застосування ЗТП, дозволяє досягти якісної та швидкої репаративної регенерації шкіри, що, в свою чергу, дозволяє зберегти морфологічні властивості тканини та органу в цілому. Цьому допомагає низка факторів, а саме цитокінів, інтерлейкінів та інших біологічно активних сполук, що вивільняються з тромбоцитів, підсилюючи проліферацію клітинних елементів у зоні ураження, а також беруть участь у процесах адаптації. Крім того, створений при введенні ЗТП фібрин формує своєрідний природний скаффолд, в якому утримуються і проліферують стовбурові клітини, рекрутовані із їх депо в результаті викиду цитокінів.

Джерела інформації:

1. Особенности неоангиогенеза при применении обогащенной тромбоцитами плазмы / В.Н. Запорожан, Е.Л. Холодкова, В.А. Цепколенко и др. // Хірургія України. - 2011. - № 3. - С. 41-46.
2. Platelet content and growth factor release in platelet-rich plasma: a comparison of four different systems / Leither G.C., Gruber R., Neumüller J. et al. // Vox Sang. - 2006. - Vol. 91. - P. 135-139.
- 5 3. Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts / Marx R. E., Carlson E.R., Eichstaedt R.M. et al. // Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod. - 1998. - Vol. 85. - P. 638-646.
4. Справочник ВИДАЛЬ "Лекарственные препараты в России". - М.: АстраФармСервис, 2012, С. 624-625.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

Спосіб стимуляції регенерації шкіри при експериментальному дерматиті шляхом використання компонента, отриманого із крові людини, який **відрізняється** тим, що застосовують збагачену тромбоцитами плазму (ЗТП) у дозі 0,1 мл з концентрацією тромбоцитів 1 000 000 мкл, при цьому після першої ін'єкції ЗТП на 10, 20 та 30 добу досліджують експериментальну ділянку шляхом дислокації шийних хребців під впливом легкої ефірної анестезії і при відсутності запалення або інфільтрації стимуляцію регенерації шкіри вважають ефективною.

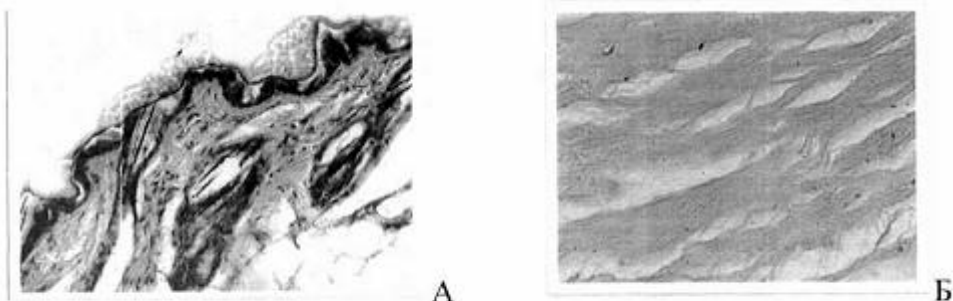


Fig. 1

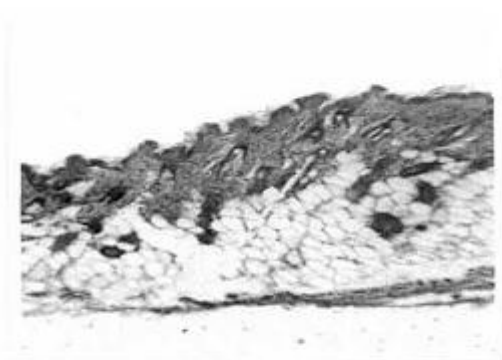


Fig. 2

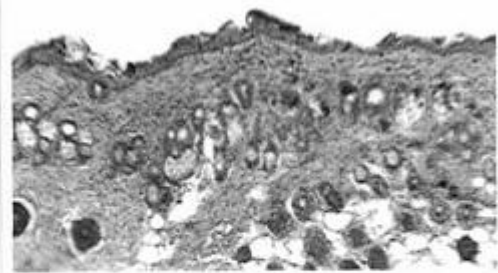


Fig. 3

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

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