

Изобретение относится к области медицины, в частности - к клеточной терапии и может найти применение для лечения заболеваний, обусловленных нарушением иммунитета, например, сахарного диабета.

За последние годы в области исследований применения трупных человеческих эмбриональных тканей произошел значительный прогресс. Разрабатывается целый новый раздел терапии - клеточная терапия, которая позволяет с помощью лекарственных препаратов на основе клеточных суспензий, приготовленных из тканей эмбриона, восполнить недостаточную функциональную активность поврежденных, больных тканей.

Клеточная трансплантация является привлекательной альтернативой для пересадки органов и тканей, так как преимущество эмбриональных клеток состоит в том, что они не сформировали жесткие индивидуальные признаки антигенной гистосовместимости, они легко приживляются и не вызывают реакции трансплантат против хозяина. Кроме того, клетки обладают мощным жизненным потенциалом. Они пролиферируют, дифференцируются, являются источником огромного количества биологически активных веществ. В настоящее время используют клеточные суспензии, приготовленные из эмбрионального мозга, костного мозга, печени, селезенки, тимуса, поджелудочной железы, кожного мышечного лоскута.

Первые наиболее успешные попытки использования клеточных суспензий в качестве лекарственных препаратов были связаны с эмбриональной печенью и селезенкой человека. Известно, что в печени или селезенке эмбриона человека в возрасте от 5 до 16 недель осуществляется кроветворение с высоким содержанием стволовых клеток. В данные сроки развития клетки эмбриональной печени и селезенки лишь в незначительной степени экспрессируют антигены первого и второго класса тканевой гистосовместимости.

В 1973г. впервые был создан лекарственный препарат на основе клеточной суспензии нативных клеток печени эмбриона 7 недельной гестации и за счет его введения был восстановлен гемопоэз больной апластической анемией (Kelemen E. Second J.Gematol., 1973, v.10, №4, pp.305 - 308).

За последние годы, варьируя различными методами приготовления клеточных суспензий, а также различными методиками их применения, исследователям удалось достичь положительных результатов при лечении первичных и вторичных миелодепрессивных состояний. Эти препараты, в частности, описаны в Izzi T., Polehi O. et al, Fetal liver transplantation, Alan R Liss, 1985, pp.237-249.

Вторым направлением клинического применения означенных клеточных суспензий явились нарушения иммунитета, здесь наиболее значительный опыт принадлежит Touraine J.I. (Transplantation Proceedings, 1993, vol.25, №1, pp.1012 - 1013). В прекрасной работе Baechelta R. et al. (I.Clin.Invest, 1993, v.91, March, 1067 - 1078) показаны отдаленные результаты лечения больных с тяжелым комбинированным иммунным дефицитом, когда не только восстанавливались показатели иммунитета у этих больных, но показано наличие расщепленного химеризма и появление толерантности к антигенам как хозяина, так и донора.

У авторов также имеется свой опыт лечения иммунных нарушений при заболеваниях крови с использованием клеточных суспензий.

Однако использование этих препаратов для лечения, в частности, сахарного диабета авторам не известно.

Как известно, механизм развития инсулинзависимого сахарного диабета включает в себя аутоиммунное поражение островков Лангерганса клеточными и циркулирующими антителами. Поэтому в последующем при лечении инсулинзависимого сахарного диабета используются препараты, вещества, ткани, направленные на прерывание аутоиммунного поражения β -клеток поджелудочной железы по типу иммунокоррекции. С этой целью применялись изопринозин, азатиоприн, циклоспорин, а также препараты на основе биологических материалов, в частности, препараты вилочковой железы.

Так, известен препарат, полученный из вилочковой железы, тималин, выделенный из тимуса телят, и его применение как иммунокорректора при лечении сахарного диабета (Курбанов Т.Г., Кальбиева Б.М., Закиева Г.Т. Проблемы эндокринологии, 1989, т. 35, №6, с.7 - 9).

Однако недостатком известного метода лечения является то, что суточная потребность инсулина уменьшается всего на 15 - 20%. Снижение уровня гликемии удерживается только в течение 5 - 6мес. Кроме того, тималин - часто не дает полного восстановления иммунологических показателей, а увеличивает их селективно на определенный процент без достижения нормального уровня.

В основу изобретения поставлена задача создать такой лекарственный препарат иммунокорректирующего действия на основе клеточной суспензии в котором, благодаря оптимальному подбору показателей клеточного состава удалось бы усилить механизм иммунокоррекции и достичь положительных результатов при лечении сахарного диабета.

Поставленная задача решается тем, что в лекарственном препарате иммунокорректирующего действия на основе клеточной суспензии, приготовленной из нативных или криоконсервированных гемопоэтических клеток печени и/или селезенки эмбриона человека, согласно изобретению, количество ядросодержащих клеток в означенной суспензии составляет от 5 до $90 \cdot 10^6$ /мл, количество колониеобразующих единиц грануломоноцитарного ряда - от 20 до $80 \cdot 10^3$ /мл, количество колониеобразующих единиц бластов - от 0,5 до $9 \cdot 10^3$ /мл и количество ранних предшественников гемопоэза - от 1 до $9 \cdot 10^6$ /мл.

Эмпирически было установлено, что выбор именно таких показателей клеточного состава и их количественные соотношения позволяют достичь положительных результатов лечения сахарного диабета, а именно: перехода основного заболевания в стадию ремиссии.

Авторы полагают, что именно такой состав заявленного лекарственного препарата позволяет наиболее эффективно влиять на механизм иммунокоррекции, в частности, останавливать агрессию Т-лимфоцитов и иммуноглобулинов против β -клеток. Кроме того, лекарственный препарат заявляемого состава, являясь источником биологически активных веществ, вызывает мощное трофическое действие, проявляющееся в увеличении количества функционирующих капилляров, нормализации проницаемости, миграции клеток, их дифференцировки, что, в конечном итоге, определяет завершенность воспалительного процесса и уменьшение явления дистрофии.

Согласно изобретению, целесообразно чтобы при криоконсервировании лекарственный препарат дополнительно содержал диметилсульфоксид в количестве от 3 до 10%. Выбор нижнего предела обусловлен наибольшей сохранностью клеток, а верхнего - исходя из токсического действия препарата.

Поставленная задача решается также и тем, что в способе лечения сахарного диабета, заключающемся в

введении биологического материала иммунокорректирующего действия, согласно изобретению, в качестве биологического материала иммунокорректирующего действия используют патентуемый лекарственный препарат.

Авторы считают, что лекарственные препараты на основе клеточной суспензии ранее никогда не использовались для лечения сахарного диабета. Однако длительная исследовательская работа по изучению механизмов воздействия препаратов на основе клеточных суспензий на процессы лечения различных заболеваний позволяет утверждать, что клеточные суспензии заявляемого состава весьма успешно могут быть использованы для лечения сахарного диабета.

Об этом свидетельствуют всевозможные клинические испытания, проведенные авторами, некоторые из которых подробно описаны в нижеприведенных примерах. У больных наблюдали значительное улучшение показателей иммунного статуса, вплоть до восстановления на 3 - 11 сут (увеличение количества Т-лимфоцитов, изменение соотношения субпопуляций, нормализация показателей гуморального иммунитета). Была снижена исходная доза вводимого инсулина на 40 - 70%. На протяжении 3 - 4 нед достигалась ремиссия заболевания.

В соответствии с одним из аспектов данного изобретения, целесообразно патентуемый лекарственный препарат вводить в дозе от 0,5 до 5 мл.

Кроме того, желательно, чтобы этот препарат был введен до и/или после терапии цитостатическими препаратами.

Лекарственный препарат целесообразно выбирать из сформированного тканевого банка различных образцов с учетом индивидуальных показателей больного, причем при повторном введении использовать препарат того же образца.

Предлагаемый способ лечения сахарного диабета позволяет введением патентуемой клеточной суспензии корректировать различные нарушения, определяющие течение сахарного диабета, в частности, инсулинрезистентности, развитии макро- и микроангиопатий, поражений почек, печени, развитии анемического синдрома, тромбоцитопении и т.д., восстанавливая утраченные функции кроветворения и иммунной системы.

Далее сущность изобретения станет более понятной из приведенного ниже подробного описания его осуществления, изложенного в конкретных примерах его реализации.

Лекарственный препарат заявляемого состава можно изготовить, используя следующую методику.

Эмбрионы получают при искусственном прерывании беременности у здоровых, предварительно обследованных на наличие вирусных и гемических инфекций женщин. Используя эмбрионы сроком от 5 - 8 нед гестации. В целях сохранения целостности эмбриона аборт проводят вакуумэкстракцией. Эмбрион переносят в стерильный сосуд с раствором Хэнкса и антибиотика (группа аминогликозидов). Дальнейшая работа проводится в стерильных условиях бокса. Эмбрионы переносятся в стерильные чашки Петри, заполненные раствором Хэнкса с антибиотиком, где, осторожно вскрыв брюшную полость, извлекают печень, селезенку, из которых отдельно готовят клеточные суспензии.

Кроветворные органы помещают в гомогенизаторы, разрезают на небольшие фрагменты и измельчают до получения однородной массы. Клетки смывают со стенок и пестика гомогенизатора раствором Хэнкса в мерные пробирки, пропуская через фильтр для переливания крови, а затем через иглы уменьшающегося диаметра. Часть приготовленной суспензии переносят в полиэтиленовый контейнер и герметично закрывают. Она будет использована для трансплантации нативной клеточной суспензии. Другая часть подлежит криоконсервации.

В качестве криопротектора используют диметилсульфоксид (ДМСО, химически чистый). Перед использованием ДМСО пропускают через миллипоровый фильтр (с диаметром пор 0,22 мкм). При легком перемешивании клеточной суспензии добавляют по каплям равный объем рабочего раствора ДМСО, достигая концентрации в предпочтительном варианте 5%.

Клеточные суспензии разливают в полиэтиленовые контейнеры в зависимости от дальнейших целей объемом от 0,5 до 2 мл.

Контейнеры помещают в камеру программного замораживателя, работающего на жидком азоте и замораживают до -196°C.

Криоконсервированные суспензии хранятся в банке эмбриональных тканей в жидком азоте при температуре -196°C.

После приготовления клеточной суспензии определяют следующие показатели:

- 1-й - количество ядродержащих клеток в 1 мл;
- 2-й - количество колониеобразующих единиц грануломоноцитарного ряда (КОЕ ГМ) в 1 мл;
- 3-й - количество колониеобразующих единиц бластов (КОЕ бл.) в 1 мл;
- 4-й - количество ранних предшественников гемопоэза (CD₃₄) в 1 мл.

И далее используются и хранятся в тканевом банке клеточные суспензии, следующих параметров:

- 1-й - от 5 до $90 \cdot 10^6$ /мл
- 2-й - от 20 до $80 \cdot 10^3$ /мл
- 3-й - от 0,5 до $9 \cdot 10^3$ /мл
- 4-й - от 1 до $9 \cdot 10^6$ /мл

Пrenатальная диагностика включает в себя исследования на наличие сифилиса, ВИЧ-инфекции, вирусного гепатита В и С, токсоплазмоза, цитомегаловирусной инфекции. Проводятся исследования содержимого контейнеров на бактериальную стерильность.

Фетальная диагностика включает исследования на наличие ВИЧ-инфекции, вирусного гепатита В и С, цитомегаловируса, вируса краснухи, герпеса, и токсоплазмоза.

В зависимости от варианта клинического лечения лекарственный препарат вводят одним из следующих методов:

- введение (трансплантация) части нативных гемопоэтических клеток, в дальнейшем введение криоконсервированных клеток, хранящихся в банке данного образца;
- введение всего нативного образца;
- введение части или всего криоконсервированного материала данного образца.

До и в ряде случаев после введения патентуемого лекарственного препарата проводят лечение одним или комбинацией цитостатических препаратов с целью уменьшения иммунологической реактивности реципиента, уменьшения аутоиммунной агрессии.

Эффект лечения оценивают по:

- уровню снижения гликемии, уменьшению дозы вводимого инсулина, возникновению гипогликемических состояний;
- изменение показателей иммунного статуса (содержание в крови Т-В-лимфоцитов, иммуноглобулинов);
- количеству эритроцитов периферической крови, содержащих фетальный гемоглобин;
- наличию клеток, содержащих Y-хромосому, определяемых методом цепной реакции полимеризации с использованием олигонуклеотидных праймеров.

Подробное описание использования патентуемых изобретений в имеющейся у авторов клинической практике представлено также в примерах 1 - 7.

Пример 1. Больная Д., 1946г.р., поступила в диабетологическое отделение Украинского НИИ эндокринологии и обмена веществ 21.08.93г. с жалобами на выраженную слабость, головокружение, одышку при незначительной физической нагрузке, сердцебиение, плохой аппетит, тошноты, кожный зуд, головную боль, отеки на ногах, снижение зрения.

Из анамнеза известно, что 13 лет назад выявлен инсулинзависимый сахарный диабет. Постоянно получала инсулинотерапию, наблюдалась эндокринологом, периодически лечилась в стационаре. В течение последних двух лет отмечает ухудшение состояния: появилась артериальная гипертензия, течение основного заболевания приобрело лабильный характер, в анализах мочи - постоянно протенурия. За последний год появилась слабость, периодически отеки нижних конечностей, диспептические явления, выявлено снижение уровня эритроцитов и гемоглобина периферической крови. В марте 1993 года лечилась в неврологическом отделении областной больницы, установлено наличие хронической почечной недостаточности, анемии средней степени тяжести. Произведено 4 трансфузии эритроцитарной массы. После временного улучшения состояние резко ухудшилось в сентябре 1993 года, что явилось поводом для госпитализации.

При поступлении состояние больной тяжелое. Сознание ясное. Кожные покровы и видимые слизистые бледные. Периферические лимфатические узлы не увеличены. Пульс - 98 уд./мин, ритмичный, удовлетворительного наполнения и напряжения. Артериальное давление 190/120 мм.рт.ст. Тоны сердца достаточной звучности, ритмичны, систолический шум на верхушке, акцент II тона на аорте. В легких прослушивается везикулярное дыхание. Живот мягкий, умеренно вздут, чувствителен на пальпации в области правого подреберья. Печень выступает из-под края правой реберной дуги по правой срединноключичной линии на 2 см. Селезенка не увеличена. Отрезки толстой кишки смазаны. Стул - 4 раза в сутки, кашицеобразный. Суточный диурез до 1 л. Лицо, стопы, голени отечны.

Установлен диагноз: сахарный диабет, тип I, тяжелая форма, в состоянии декомпенсации. Диабетическая универсальная ангиопатия (нефропатия III ст., ХПН I ст., сосудистая форма пролиферирующей ретинопатии: микро- и макроангиопатия сосудов нижних конечностей II ст.). Диабетическая полинейропатия нижних конечностей. Анемия тяжелой степени тяжести. Симптоматическая гипертензия.

При поступлении гликемия - 12,4 ммоль/л, глюкозурия - 22 г/л, ацетонурия - (++), протеинурия - 3,3 г/л, эритро- и цилиндрурия (5 - в поле зрения), K^+ - 5,2 ммоль/л, мочевины - 14,42 ммоль/л, креатинин - 0,220 ммоль/л, эритроциты - $2,1 \cdot 10^{12}$ /л, гемоглобин - 64 г/л.

Назначено лечение: диетотерапия, инсулинотерапия - 22 ЕД/сут., дезинтоксикационная терапия (энтеросорбенты, гемодез, промывание кишечника), диуретики, гипотензивные, ангиагреганты, ангиопротекторы, коррекция электролитного баланса, препараты железа, витаминотерапия.

Через три недели состояние больной несколько улучшилось: компенсирован углеводный обмен, сошли отеки, АД снизилось до 170/100 - 110 мм.рт.ст. Однако сохранялся стойкий тяжелый анемический синдром.

15.09.93г. произведена трансплантация нативных гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека (образец 3038С-82Н): возраст эмбриона 5 недель, количество ядросодержащих клеток - $25 \cdot 10^6$ /мл, объем введенной ткани - 1,5 мл, КОЕ ГМ - $13,9 \cdot 10^3$ /мл, КОЕ бл. - $1,3 \cdot 10^3$ /мл, CD_{34} - $2,4 \cdot 10^6$ /мл. Способ введения - внутрикостный (внутригрудный).

Трансплантацию больная перенесла удовлетворительно. Через 8 - 10 ч наблюдался синдром раннего посттрансплантационного улучшения состояния: уменьшилась головная боль, слабость, тошнота, улучшился аппетит, больная впервые за последние несколько месяцев спокойно спала. На 3-и сут повысился уровень гемоглобина, эритроцитов и ретикулоцитов периферической крови с нормализацией к 10 дню (табл.1), постепенно в течение трех недель значительно улучшились анализы мочи (табл.2). Снизилось артериальное давление до 160/100 - 90 мм.рт.ст, что позволило уменьшить дозу гипотензивных препаратов.

Пример 2. Больной П., 1960 года рождения, поступил в диабетологическое отделение Киевского НИИ эндокринологии и обмена веществ 6.11.91г. с жалобами на общую слабость, похудание, сухость во рту, жажду, обильное мочеиспускание. Считает себя больным с сентября 1991г., когда впервые появились подобные жалобы. Не обследовался. Резкое ухудшение состояния в ноябре 1991г. заставило обратиться за медицинской помощью.

Установлен диагноз: сахарный диабет, тип I, впервые выявленный, тяжелой формы, в состоянии декомпенсации, диабетический кетоацидоз.

При поступлении уровень гликемии составлял 15 ммоль/л, глюкозурия - 41,6 г/л, ацетонурия - (+++). Назначено лечение: инсулинотерапия - 60 ЕД в сутки, витаминотерапия, препараты калия.

После достижения компенсации состояния 2.12.1991г. произведена первая трансплантация нативных гемопоэтических клеток эмбриональной печени и селезенки человека (образец 3038С-63НЛ): возраст эмбриона 7 недель, объем введенных клеток - 1 мл, количество ядросодержащих клеток - $36,2 \cdot 10^6$ /мл, КОЕ ГМ - $23,6 \cdot 10^3$ /мл, КОЕ бл. - $2,5 \cdot 10^3$ /мл, CD_{34} - $1,4 \cdot 10^6$ /мл. Способ введения - внутривенный. Объем трансплантированных клеток от общей массы ткани данного образца, находящейся в банке криоконсервированных тканей, составил 66%.

Трансплантацию больной перенес удовлетворительно. В первые сутки наблюдали синдром раннего посттрансплантационного улучшения общего состояния: уменьшение слабости, улучшение аппетита, больной стал бодрее, активнее.

Через три недели после трансплантации появились гипогликемические состояния, что явилось причиной постепенного снижения суточной дозы вводимого инсулина, с максимальным снижением через 2,5 месяца (табл.3).

Наблюдали нормализацию показателей иммунного статуса уже на 11-е сутки (табл.4). В течение шести месяцев

после первой трансплантации больной находился в компенсированном состоянии со стабильной относительно низкой суточной дозой вводимого инсулина.

В конце мая 1992г. состояние больного ухудшилось: появились признаки декомпенсации углеводного обмена, ухудшились показатели иммунного статуса (табл.4). Суточную дозу вводимого инсулина увеличили до 32ЕД.

3.06.92г. произведена повторная трансплантация криоконсервированных гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека того же образца: №3038С-63НЛ - введено 0,5мл клеточной суспензии. Трансфузию больной перенес удовлетворительно.

Положительная динамика суточной дозы вводимого инсулина, показателей иммунного статуса приведена в табл.3, 4.

Динамика изменений количества эритроцитов, содержащих фетальный гемоглобин, свидетельствует о заместительном эффекте трансплантированных клеток.

Пример 3. Больная Р., 1961 года рождения, поступила в 1-е терапевтическое отделение ЦРБ Зализничного района г. Киева 1.12.92г. с жалобами на выраженную слабость, похудание, сухость во рту, жажду, обильное мочеиспускание, головную боль, плохой аппетит.

Считает себя больной с октября 1992 года, когда почувствовала ухудшение состояния. Не обследовалась. Резкое ухудшение состояния в конце ноября 1992 года явилось поводом обращения за медицинской помощью.

Установлен диагноз: сахарный диабет, тип I, впервые выявленный, тяжелой формы, в состоянии компенсации, диабетический кетоацидоз. При поступлении уровень гликемии составлял - 20,0ммоль/л, глюкозурия - 52,4г/л, ацетонурия - (+++). Назначено лечение: инсулинотерапия - 64ЕД в сутки, витаминотерапия, препараты калия, гемодез 200,0 через день №6. Больной назначен азатиоприн в суточной дозе 2мг на 1кг массы тела в два приема, начиная с 25мг в сутки, постепенно увеличивая дозу под ежедневным контролем периферической крови. По достижению указанной терапевтической дозы лечение проводилось при еженедельном контроле количества лейкоцитов, тромбоцитов, эритроцитов в периферической крови.

Через 32 дня от начала лечения азатиоприном при достижении субкомпенсации нарушений углеводного обмена 5.1.93г. произведена трансплантация криоконсервированных гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека (образец 3038С-44Н); возраст эмбриона 6 недель, объем введенных клеток - 1мл, количество ядросодержащих клеток - $17,5 \cdot 10^6$ /мл, КОЕ ГМ - $24,8 \cdot 10^3$ /мл, КОЕ бл. - $1,7 \cdot 10^3$ /мл, CD₃₄ - $2 \cdot 10^6$ /мл, способ введения - внутривенный. Объем трансплантированных клеток от общей массы ткани данного образца, находящейся в банке криоконсервированных тканей, составил 45%.

Трансплантацию больная перенесла удовлетворительно. В первые сутки наблюдали синдром раннего посттрансплантационного улучшения общего состояния: уменьшение слабости, головной боли, улучшение аппетита.

Лечение азатиоприном продолжали в течение 48 дней после трансплантации гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека.

Через 2 недели после трансплантации появились гипогликемические состояния, что явилось причиной постепенного снижения суточной дозы вводимого инсулина, с максимальным снижением через 2мес. (табл.5).

К концу второй недели нормализовались показатели иммунного статуса больной (табл.6).

Динамика изменений количества эритроцитов периферической крови, содержащих фетальный гемоглобин, свидетельствует о заместительном эффекте трансплантированных клеток.

Ремиссия заболевания длится более 9мес.

Наблюдение продолжается.

Пример 4. Больная Л., 1991 года рождения, находилась в эндокринологическом отделении Детской специализированной клинической больницы №14 г. Киева с 15.09.93г. по 26.09.93г.

Диагноз: Инсулинзависимый сахарный диабет, тяжелая форма, лабильное течение, состояние субкомпенсации.

Заболевание выявлено в феврале 1993г., когда в предкоматозном состоянии ребенок был доставлен в реанимационное отделение.

Установлен диагноз: сахарный диабет, тип I. Начата инсулинотерапия - 8ЕД/сутки. В последующие месяцы суточная доза инсулина снижена до 6ЕД. Характер течения основного процесса был лабильным: частые гипогликемические состояния в чередовании с кетоацидозом. Девочка госпитализирована в эндокринологическое отделение для проведения трансплантации гемопоэтических эмбриональных клеток.

При поступлении гликемия в течение суток от 5,5 до 12,4ммоль/л, глюкозурия - 3,2г/л, ацетонурия - отсутствует.

12.09.93г. произведена трансплантация криоконсервированных гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека (образец 3038С - 91Н): возраст эмбриона - 5 недель, количество ядросодержащих клеток - $25,0 \cdot 10^6$ /мл, объем введенной ткани - 1,5мл, КОЕ ГМ - $23,9 \cdot 10^3$ /мл, КОЕ бл. - $1,8 \cdot 10^3$ /мл, CD₃₄ - $4 \cdot 10^6$ /мл. Способ введения - внутривенный.

Больная перенесла трансплантацию удовлетворительно. Со слов мамы у ребенка улучшился аппетит уже к вечеру после трансплантации, сон стал спокойным, глубоким. На четвертые сутки после трансплантации снизили суточную дозу вводимого инсулина до 5ЕД. В дальнейшем суточная доза вводимого инсулина осталась такой же.

В течение месяца нормализовались иммунологические показатели больной (табл.7).

На протяжении всего времени после трансплантации состояние ребенка остается удовлетворительным; стабилизировалось течение заболевания - гликемия в течение дня на уровне 4,5 - 7,3ммоль/л, гипогликемии и эпизодов кетоацидоза не наблюдалось. Уменьшились повышенная раздражительность, плаксивость. Психосоциально девочка развивается согласно возрасту. Наблюдение продолжается.

Пример 5. Больной А., 1969 года рождения, находился в терапевтическом отделении Центральной клинической больницы Зализничного района г. Киева с 21.07.93г. по 12.08.93г.

Диагноз: инсулинзависимый сахарный диабет, тяжелая форма, лабильное течение, состояние компенсации, диабетическая универсальная ангиопатия IIст., диабетическая периферическая полинейропатия. Хронический холецистит, фаза ремиссии.

Считает себя больным с 1986 года, когда после сильного психоэмоционального перенапряжения начало ухудшаться самочувствие: слабость, полидипсия, полиурия, потеря в весе тела. Через 2 месяца, когда обратился за медицинской помощью, диагностирован инсулинзависимый сахарный диабет. Компенсация состояния, достигнута при

суточной дозе вводимого инсулина 64ЕД.

В течение последнего года отмечает появление болей в ногах, преимущественно по ночам, чувство жжения, покалывание, иногда онемения, судороги в икроножных мышцах. Основное заболевание приобрело лабильный характер: частая смена удовлетворительного состояния кетоацидозом или гипогликемией при незначительных изменениях в приеме пищи, физических и эмоциональных нагрузках.

Больной госпитализирован в терапевтическое отделение для проведения трансплантации гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека.

При поступлении гликемия в течение суток от 4,7 до 11,4 ммоль/л, глюкозурия - 22,4 г/л, ацетонурия отсутствует. Суточная доза инсулина - 58ЕД.

28.07.93г. произведена трансплантация нативных гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека (образец 3038-101 Н): возраст эмбриона - 6 недель, количество ядросодержащих клеток $8,5 \cdot 10^6$ /мл, объем введенной ткани - 2,5 мл, КОЕ ГМ - $23 \cdot 10^3$ /мл, КОЕ бл. - $2,4 \cdot 10^3$ /мл, CD₃₄ - $3,8 \cdot 10^6$ /мл. Способ введения - внутривенный.

Больной трансплантацию перенес удовлетворительно. Через 8 - 10ч наблюдали появление синдрома первичного посттрансплантационного улучшения общего состояния: уменьшение слабости, повышение работоспособности, улучшение сна.

В течение двух недель снижена доза вводимого инсулина до 50ЕД в сутки. В общеклинических исследованиях существенных изменений не произошло (в пределах нормы до и после трансплантации). Восстановились показатели иммунологического статуса через 1 месяц (табл.8).

Возрос уровень эритроцитов, содержащих фетальный гемоглобин, до 15%.

Наблюдение продолжается больше 12мес. Больной чувствует себя удовлетворительно: достигнута стойкая компенсация состояния, не было эпизодов кетоацидоза.

Суточная доза вводимого инсулина сохраняется на уровне 50 - 52ЕД. Эритроциты, содержащие фетальный гемоглобин, определяются в пределах 8 - 10%.

Пример 6. Больной М., 1931 года рождения, находился в хирургическом отделении Центральной клинической больницы Залізничного района г.Киева с 12.04.93г. по 26.05.93г. Диагноз: Сахарный диабет, тип I, тяжелая форма, состояние субкомпенсации, универсальная диабетическая ангиопатия: микро- макроангиопатия сосудов нижних конечностей III ст., ретинопатия, нефропатия II ст., трофическая язва 1 пальца правой стопы, флегмона стопы. Диабетический полиневрит.

При поступлении больной предъявлял жалобы на общую слабость, повышение температуры тела до 38,5°C, ознобы по утрам, отечность, ощущение распирания в правой стопе, изъязвление мягких тканей 1 пальца правой стопы, ощущение онемения, покалывания в ногах, боли в ногах, как в покое, так и при физической нагрузке.

Страдает инсулинзависимым сахарным диабетом в течение 22 лет. В течение последних 5 лет появились жалобы на боли в ногах при ходьбе, успокаивающиеся в покое, а также чувство онемения, покалывания в ногах, преимущественно по ночам. Месяц назад в области 1 пальца правой стопы открылась язва мягких тканей.

Больной лечился амбулаторно без результата. После очередной ванны резко отека стопа, голень, усилилась боль, появилась выраженная гиперемия кожных покровов, повысилась температура тела до 38°C. Сразу после поступления вскрыта флегмона, произведена хирургическая обработка.

Назначены антибиотикотерапия, противовоспалительные препараты, инсулинотерапия - 38ЕД в сутки. Состояние больного не изменилось: продолжались подъемы температуры тела по вечерам до 38,6°C, сохранялась общая слабость, гнойные выделения из разреза и трофической язвы. Через трое суток у больного прослушивалась правосторонняя нижнедолевая пневмония. Произведены бактериологические посевы крови, мочи, кала. Из крови высеян *Staphylococcus aureus*. Больной получил 3 курса антибиотикотерапии в течение трех недель (ампиокс, гентамицин, рифампицин, клафорам). В анализе крови лейкоцитоз со сдвигом лейкоцитарной формулы влево, ускорение СОЭ, умеренная анемия (табл.9). В иммунограмме резко снижено количество Т-лимфоцитов, несколько повышено количество β-лимфоцитов (табл.10).

С целью усиления иммунной защиты 10.05.93 г. произведена трансплантация нативных гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека (образец 3038С-57Н): возраст эмбриона - 8 недель, количество ядросодержащих клеток - $37,5 \cdot 10^6$ /мл, объем введенной ткани - 2,5 мл, КОЕ ГМ - $42 \cdot 10^3$ /мл, КОЕ бл. - $1,3 \cdot 10^3$ /мл, CD₃₄ - $1,4 \cdot 10^6$ /мл, способ введения - внутривенный.

Через 8 - 10ч после трансплантации наблюдали проявления синдрома первичного посттрансплантационного улучшения общего состояния: вечером снизилась температура тела до 37°C, уменьшилась слабость, появился аппетит, ночью спал спокойно. Постепенно в течение 7 - 10дн. нормализовались показатели крови (табл.9).

Началось очищение раны и язвы от гнойнонекротических масс. На седьмые сутки появились здоровые грануляции и началась эпителизация. Через две недели язва и рана зарубцевались.

Наблюдали восстановление показателей иммунного статуса на 14-е сутки (табл.10).

Из-за появления гипогликемии на пятые сутки суточную дозу инсулина снизили до 34ЕД.

Больной выписан домой в удовлетворительном состоянии.

Пример 7. Больная Б., 1957 года рождения, поступила в диабетологическое отделение Киевского НИИ эндокринологии и обмена веществ 4.09.92г. с жалобами на выраженную слабость, жажду, сухость во рту, обильное мочеиспускание, похудание, плохой аппетит, головные боли.

Считает себя больной в течение последних трех месяцев, когда постепенно начало ухудшаться состояние. Не обследовалась и не лечилась. Резкое ухудшение состояния явилось поводом обращения за медицинской помощью.

Установлен диагноз: сахарный диабет, тип I, впервые выявленный, тяжелая форма, состояние декомпенсации, диабетический кетоацидоз. При поступлении гликемия - 20,2 ммоль/л, глюкозурия - 51,2 г/л, ацетонурия - (++++). Назначено лечение: инсулинотерапия - 62ЕД в сутки, витаминотерапия, препараты калия.

После достижения субкомпенсации состояния произведена трансплантация нативных гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека (образец 3038С-20НЛ): возраст эмбриона - 7 недель, количество ядросодержащих клеток - $25 \cdot 10^6$ /мл, объем введенной ткани - 1 мл, КОЕ ГМ - $19,3 \cdot 10^3$ /мл, КОЕ бл. - $2,1 \cdot 10^3$ /мл, CD₃₄ - $1,8 \cdot 10^6$ /мл. Способ введения внутривенный. Объем трансплантированных клеток от общей массы ткани данного образца, находящейся в банке криоконсервированных культур, составил 50%.

Трансплантацию больная перенесла удовлетворительно. В первые сутки наблюдали синдром раннего посттрансплантационного улучшения общего состояния; уменьшение слабости головных болей, улучшение аппетита, сна. С третьих суток после трансплантации в связи с появлением гипогликемии начали снижать дозу суточного инсулина с максимальным снижением через 2,5 - 3 месяца (табл.11).

Положительная динамика иммунологических показателей больной Б. приведена в табл.12.

Динамика изменений количества эритроцитов, содержащих фетальный гемоглобин, свидетельствует о заместительном эффекте трансплантированных клеток.

Ремиссия заболевания длится больше двенадцати месяцев.

Таким образом, предлагаемый лекарственный препарат и способ лечения сахарного диабета с целью использования препарата позволяют:

- оборвать аутоиммунную агрессию против островков Лангерганса;
- уменьшить дозу инсулина за счет снятия клеточной блокады с сохранившихся β -клеток;
- уменьшить или снять лабильность течения;
- уменьшить иммунорезистентность;
- восстановить гемопоэз;
- уменьшить такие осложнения сахарного диабета как инфекционные, микро- и макроангиопатии, нейропатии.

Кроме того, клеточные суспензии заявляемого состава могут храниться в аптеках-банках криоконсервированных тканей и, с учетом отсутствия необходимости определения антигенов гистосовместимости, предполагают при наличии показаний более простое применение, чем, например, трансфузия крови.

а б л и ц а

Динамика показателей периферической крови больной Д

Дата	Эритроциты, $10^{12}/л$	Гемоглобин, г/л	Цветовой показатель	Ретикулоциты, %	Лейкоциты, $10^9/л$	Возраст, %	Эозинофилы, %	Палочки-ядерные, %	Сегментоядерные, %	Лимфоциты, %	Моноциты, %	Тромбоциты, $10^9/л$	СОЭ, мм/час	Эритроциты, содержащие фетальный гемоглобин, %
13.00.03г.	2,11	75	1,00	— —	4,9	— —	0,5	1	07	25,5	6	180	35	0
16.00.03г.	3,11	105	0,97	7	5,7	— —	2	1	04	29	4	254	42	11
20.00.03г.	3,14	82	0,78	— —	5,7	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —
25.00.03г.	4,0	120	0,9	14	5,0	— —	1	2	07	28	2	— —	— —	13
28.00.03г.	4,0	120	0,9	14	7,5	— —	1	2	02	33	2	— —	— —	— —
10.10.03г.	4,1	124	0,9	15	5,3	— —	1	1	03	32	3	295	— —	15

Дата	Количество, мл	Цвет	Прозрачность	Реакция	Относительная плотность, уд. вес	Билир., г/л	Сахар, г/л	Лейкоциты	Эритроциты	Глицерин	Зеркало	Васио-видные	Алкоголь	Сукралез, протеин-урин, г.сут.
								В поле зрения						
0.00.03г.	100,0	соло-мочко-желтый	прозр.	кисл.	1014	0,6	0,6	6 — 8	4 — 6	1 — 4	5 — 10	одн.	нет	
6.00.03г.														10,5 г/л
18.00.03г.	100,0	с/ж	прозр.	кисл.	1011	0,6	— —	5 — 7	6 — 8	нет	2 — 4	нет	нет	
10.10.03г.	170,0	с/ж	прозр.	кисл.	1018	1,05	8,3		2 — 3	нет	нет	нет	нет	

Т а б л и ц а 3

Анализируемые показатели больного П. до и после трансплантации гемопоэтических
клеток эмбриональной печени человека (состояние компенсации)

2.12.91 г. – 1-я трансплантация

3.06.92 г. – 2-я трансплантация

Показатели	Дата								
	1.12. 91г.	23.12. 91г.	17.01. 92г.	23.02. 92г.	7.05. 92г.	3.06. 92г.	6.07. 92г.	17.07. 92г.	21.01. 93г.
	до транс- плант.	21-е сут.	через 1,5 мес.	через 2,5 мес.	через 5 мес.	через 6 мес.	через 1 мес.	через 1,5 мес.	через 7,5 мес.
Суточная доза инсулина, ЕД	48	36	20	20	20	32	24	22	24
% снижения сут. дозы инсулина к исходному уровню	--	25	40	50	50	34	50	55	50
Эритроциты, содержащие фетальный гемоглобин, %	0	18	12	14	8	2	12	18	14

Т а б л и ц а 4

Динамика иммунологических показателей больного П.

Дата	14.11.01г.	17.12.01г.	7.04.02г.	28.05.02г.	14.06.02г.
Показатели	до трансп.	11-е сут.	через 4 мес.	через 6 мес.	11-е сут. после 2-й трансп.
Т-лимфоциты, %	40	53	56	50	53
абс. $\cdot 10^9/\text{л}$	0,7050	0,8004	1,0808	0,7050	0,8480
Т-хелперы, %	37	20	41	37	33
абс. $\cdot 10^9/\text{л}$	0,5328	0,4872	0,7013	0,5883	0,5280
Т-супрессоры, %	12	24	15	13	20
абс. $\cdot 10^9/\text{л}$	0,1728	0,4032	0,2895	0,2067	0,3200
Т-хелперы/Т- супрессоры, %	3,1	1,2	2,7	2,85	1,7
В-лимфоциты, %	37	31	18	30	27
абс. $\cdot 10^9/\text{л}$	0,5328	0,5208	0,3474	0,4770	0,4320
IgG, г/л	8,75	11,8	0,70	17,6	10,7
IgA, г/л	7,0	2,1	1,75	1,0	4,25
IgM, г/л	0,43	1,3	0,80	0,80	1,01

Т а б л и ц а 5

Анализируемые показатели больной Р. до и после трансплантации гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека (состояние декомпенсации)

Дата	4.01. 1993г.	6.01. 1993г.	10.01. 1993г.	4.02. 1993г.	5.03. 1993г.
Показатели	до транс- плант.	3-е сут.	14-е сут.	через 1 мес.	через 2 мес.
Суточная доза инсулина, ЕД	52	44	30	26	10
% снижения сут. дозы инсулина к исходному уровню	--	15,4	42	50	70
Эритроциты, содержащие фетальный гемоглобин, %	0	14	17	23	26

Т а б л и ц а 6

Динамика иммунологических показателей больного Р.

Дата	4.01.93г. до транспланта- ции	10.01.93г. 14-е сут.	5.03.93г. через 2 мес.
Т-лимфоциты, %	12	56	42
абс. $\cdot 10^9/\text{л}$	0,0810	1,0035	0,8064
Т-хелперы, %	10	38	28
абс. $\cdot 10^9/\text{л}$	0,0136	0,3226	0,2352
Т-супрессоры, %	2	18	14
абс. $\cdot 10^9/\text{л}$	0,0136	0,3226	0,2352
Т-хелперы/Т- супрессоры, %	5,0	2,1	2,0
В-лимфоциты, %	10	24	22
абс. $\cdot 10^9/\text{л}$	0,1088	0,4301	0,3006
IgG, г/л	8,1	8,75	0,70
IgA, г/л	2,4	1,75	1,6
IgM, г/л	0,38	0,86	0,86

Т а б л и ц а 7
Динамика иммунологических показателей больной Л.

Показатели	Дата 0.09.03г. до транспланта- ции	8.10.03г. через 1 месяц
Т-лимфоциты, %	37	51
абс.·10 ⁹ /л	0,3907	0,7020
Т-хелперы, %	20	28
абс.·10 ⁹ /л	0,3082	0,3780
Т-супрессоры, %	8	23
абс.·10 ⁹ /л	0,0845	0,3240
Т-хелперы/Т- супрессоры, %	3,0	1,22
В-лимфоциты, %	35	27
абс.·10 ⁹ /л	0,3808	0,3845
IgG, г/л	8,4	8,2
IgA, г/л	2,25	2,40
IgM, г/л	0,95	1,30

Т а б л и ц а 8
Динамика иммунологических показателей больного А

Дата Показатели	23.07.03г. до трансплантации	20.08.03г. через 1 месяц
Т-лимфоциты, %	38	54
абс. $\cdot 10^9/\text{л}$	0,4545	1,0200
Т-хелперы, %	20	32
абс. $\cdot 10^9/\text{л}$	0,3468	0,6048
Т-супрессоры, %	0	22
абс. $\cdot 10^9/\text{л}$	0,1077	0,4158
Т-хелперы/Т- супрессоры, %	3,2	1,5
В-лимфоциты, %	32	20
абс. $\cdot 10^9/\text{л}$	0,3827	0,5481
IgG, г/л	8,00	8,80
IgA, г/л	1,5	2,00
IgM, г/л	1,23	1,20

Динамика показателей риферической кров больного М

Дата	Эритроциты, 10 ¹² /л	Гемоглобин, г/л	Цветовой показатель	Ретикулоциты, %	Лейкоциты, 10 ⁹ /л	Базофилы, %	Эозинофилы, %	Мононуклеоты, %	Палочки-ядерные, %	Сегментоядерные, %	Лимфоциты, %	Моноциты, %	Тромбоциты, 10 ⁹ /л	СОЭ, мм/ч	Эритроциты, со- держателем феритина, гемоглобин, белок
10.05.93г.	3,2	105	0,9	2	10	1	3	3	10	53	18	0	140	43	—
11.05.93г.	3,3	107	0,9	—	10	—	2	3	10	51	27	7	180	37	12
18.05.93г.	3,8	115	0,9	0	8	—	2	—	8	54	31	5	180	15	—
23.05.93г.	4,2	120	0,9	7	0,4	1	1	—	5	50	32	0	254	8	14
28.05.93г.	4,2	134	0,85	7	0,5	—	1	—	0	58	29	0	251	8	14

Т а б л и ц а 10
Динамика иммунологических показателей
больного М

Дата Показатели	10.05.93г. до трансплантации	24.05.93г. через 2 недели
Т-лимфоциты, %	31	53
абс.·10 ⁹ /л	0,5580	1,0100
Т-хелперы, %	24	31
абс.·10 ⁹ /л	0,4320	0,5052
Т-супрессоры, %	7	22
абс.·10 ⁹ /л	0,1280	0,4244
Т-хелперы/Т- супрессоры, %	3,43	1,4
В-лимфоциты, %	35	28
абс.·10 ⁹ /л	0,6300	0,5376
IgG, г/л	8,04	9,12
IgA, г/л	1,7	1,7
IgM, г/л	0,85	1,05

Т а б л и ц а 11

Анализируемые показатели больной Б. до и после трансплантации гемопоэтических клеток эмбриональной печени человека (состояние компенсации)

Дата	16.09. 92г. до трансп.	24.09. 92г. 3-е сут.	6.10. 92г. 15-е сут.	22.10. 92г. через 1 мес.	6.12. 92г. через 2,5 мес.	24.12. 92г. через 3 мес.	18.02. 93г. через 5 мес.	21.09. 93г. через 12 мес.
Показатели								
Суточная доза инсулина, ЕД	48	38	32	28	20	18	18	18
% снижения сут. дозы инсулина к исходному уровню	—	20,8	33,3	41,7	59	62,5	62,5	62,5
эритроциты, содержащие фетальный гемоглобин, %	0	12	16	21	25	23	18	14

Т а б л и ц а 12

Динамика иммунологических показателей больной Б.

Дата	15.09.92	24.09.92	6.10.92	1.12.92
Показатели	до трансп.	3-е суток	15-е сутки	через 2,5 месяца
Т-лимфоциты % абс*10 ⁹ /л	44 0,5605	48 0,9768	28 0,5958	37 0,6327
Т-хелперы % абс*10 ⁹ /л	38 0,4841	32 0,6512	21 0,4469	25 0,4275
Т-супрессоры % абс*10 ⁹ /л	6 0,0764	16 0,3256	7 0,1490	12 0,2052
Т- хелперы/Тсупрессор ы	6,2	2	3	2,1
В-лимфоциты % абс*10 ⁹ /л	32 0,4077	29 0,5902	26 0,5533	34 0,5834
IgG, г/л	8,10	11,45	11,45	8,10
IgA, г/л	2,40	2,55	2,55	2,40
IgM, г/л	0,80	1,40	1,75	1,75