

Нинішній винахід відноситься до області медицини, в частковості - до клітинної терапії і може знайти застосування для лікування функціональних, запальних і онкологічних захворювань кишечника в терапевтичній гастроентерології.

Мільйони людей в світі страждають функціональними, запальними і онкологічними захворюваннями нижнього відділу харчового каналу: тонкої і товстої кишок.

Кожний з нас хоч раз в житті переносив функціональні або запальні прояви поразки тонкої і товстої кишок. Ці захворювання різноманітні по етіологічним чинникам і механізмам розвитку.

Ступінь тяжкості може бути значною і призводити до істотного погіршення загального стану. Ряд захворювань має хронічну течію і позбавляють пацієнтів повноцінного життя, дієздатності, є причиною перенесених тяжких хірургічних операцій, грізних ускладнень, що приводять до загибелі.

Єдиних засобів лікування хвороб кишок не існує. В одних випадках необхідно виведення харчового каналу з під впливу етіологічного чинника. В інших - слідє домогтися відновлення функціональних характеристик і морфологічних структур вже враженої кишки.

Ми пропонуємо в якості винаходу лікарські препарати на основі ембріональних клітинних суспензій.

Клітинна терапія - новий напрямок в медицині. Клітинна терапія - це лікування з допомогою клітин, коли живі клітини одного організму вводяться іншому організму (реципієнту), приживлюються в ньому, починають розмножуватися і виконувати потрібні для організму реципієнта функції.

Цими клітинами не можуть бути клітини тварин - чужорідні живі об'єкти будуть виявлені і знищені імунною системою організму реципієнта. Вони можуть використовуватися тільки як джерела біологічних активних речовин.

Це можуть бути клітини дорослої людини. Але бар'єр гистосумісності також залишає мізерні шанси на приживлення дорослих клітин і настає відторгнення чужих клітин.

Найбільш перспективний шлях використання дуже молодих клітин людини, що майже позбавлені ознаків тканинної індивідуальності. Ці клітини не розпізнаються імунною системою реципієнта як чужі і можуть жити, розмножуватися і функціонувати в організмі реципієнта ("господаря"). Вони дуже молоді, повні життєвої енергії. Молоді клітини забезпечують підтримання або відновлення функцій і тканин організму реципієнта. Оздоровчі та лікувальні ефекти клітинної терапії по своїй глибині, якості і специфічності недосягненні жодними іншими сучасними засобами.

Клініка клітинної терапії Національного медичного університету і Центру ембріональних тканин "ЕмСелл" є єдиною спеціалізованою клінікою такого роду. Клініка веде наукову роботу, розробляє, публікує і патентує в країні і за її межами. На базі Клініки в нинішній час минають навчання 5 аспірантів.

Фахівці Клініки володіють найбільшим, що опублікувався в науковій літературі досвідом Клітинної терапії з застосуванням ембріональних клітинних суспензій, здатних вижити і дати потомство клітин в організмі реципієнта.

В Клініку приїзять для лікування хворі із-за рубежу: Франції, Росії, США (Чикаго, Нью-Йорк, Малібу, Беверлі-хіллз і ін.), Монако, Швейцарії, Італії, Чехії, Греції, Ізраїлю. Пацієнтами Клініки є ряд великих вчених, бізнесменів, діячів культури. Але основна група - це тематичні хворі, що минають лікування в рамках планових наукових досліджень на базі нашої Клініки і базах 14 співпрацюючих з Клінікою великих наукових закладів Києва.

Персонал Клініки клітинної терапії складається з 40 вчених, лікарів, інженерів, адміністраторів, фахівців технічного і допоміжного складу.

Клініка володіє банком криоконсервованих в рідкому азоті клітинних суспензій. Це дозволяє вибирати для трансплантації матеріал найбільш підходящий по багатьом критеріям в кожному конкретному випадку. Вибраний матеріал закріплюється за пацієнтом і використовується при повторних трансплантаціях у відповідності з планом лікування.

Ідея клітинної терапії достатньо прозора і часто потрібно чути, що це або давно відомо, або вже давно пробували. Однак від ідеї до засобу - великий шлях. Ідея переливання крові, наприклад, існувала декілька тисячоліть раніше, але тільки в нашому сторіччі стала засобом лікування.

Численні варіанти використання відповідного тваринного матеріалу, включаючи відому "швейцарську" клітинну терапію, не ставлять метою пересадити клітини і забезпечити їхнє розмноження і функціонування в організмі реципієнта, а використовують можливості біологічних активних речовин, завдяки яким і забезпечуються оздоровчі ефекти, термін дії, механізми реалізації і можливості яких відповідно обмежені.

Початок сучасного етапу Клітинної терапії відноситься до сімдесятих років, коли клітинну терапію стали вивчати як можливу альтернативу трансплантації костного мозку при захворюваннях крові, радіаційних поразках, природжених станах імунного дефіциту.

Основні ефекти, що спостерігаються у пацієнтів в результаті клітинної терапії, зв'язані зі всіма рівнями організації і функціонування організму.

Клітинні суспензії, приготовані з різноманітних ембріональних органів, використовуються з урахуванням ембріогенезу органів і тканин з зародкових листків. Їхнє застосування з лікувальною метою визначається ведучими патофізіологічними механізмами захворювань.

Досвід застосування клітинної терапії дозволив встановити досить чітко висловлену фазність розвитку ефектів клітинної терапії в часу. Ці фази яскраво висловлені і завжди відзначаються пацієнтами.

Перша фаза - фаза первинної посттрансплантаційної реакції - розвивається в течію найближчих 4-8 годин після трансплантації і триває 2-5 днів. Це, як правило, дуже висловлена зміна стану, самопочуття, настрою, підйом душевних сил, висока психічна активність в поєднанні з руховою активністю, що в лаві випадків є потрясінням для хворого, що, наприклад, може встати з інвалідного крісла і ходити вперше за багато місяців.

Друга фаза - власне клітинні ефекти трансплантації - стартує під час трансплантації, але досягає розвиненого рівня через 1-1.5 місяця. При цьому різні функції відновлюються з різноманітною швидкістю. В цей час ефекти лікування стають істотними. Наступна робота стовбурових клітин в організмі розвиває досягнутий успіх.

Найбільш часто в нашій практиці присутність пересаджених клітин відзначається в термін 6-12 місяців. Клінічний ефект клітинної терапії зберігається довше.

Потрібно мати на увазі, що більшість хвороб терапевтичного профілю принципово не виліковуються повністю і назавжди, вірніше казати не про вилікування, а про лікування, пом'якшення течії хвороб, збільшення тривалості і глибини ремісії.

Застосування клітинних суспензій в багатьох випадках призводить не тільки до зменшення проявів захворювань, але і до їхнього зникнення.

Серед ефектів клітинної терапії немає дій негативного спрямування, немає негативних побічних ефектів.

Використовуючи клітинні суспензії, приготовані з трупних ембріональних тканин, можна досягнути станів, коли ембріональні клітини, введені в організм хворої людини можуть вижити, знайти свої органи-мішені, дати потомство, заповнивши таким чином що не вистачає функціональній одиниці органів і тканин.

Ембріональні клітини часто здатні мігрувати, встановлювати міжклітинні зв'язки, пролиферувати, диференціюватися і відповідати на вплив. Вони здатні виробляти значні кількості біологічних активних речовин, наприклад, гемопоетичні чинники зростання, інтерлейкіни, чинник зростання нервів, аллогенні і нейротрофічні чинники і т. д.

Ембріональні клітини викликають більш слабку імунну відповідь, ніж зрілі клітини. В лаві випадків це результат пізньої експресії головних антигенів в процесі їх дозрівання. Крім того, ембріональні клітинні суспензії містять в значно меншій кількості або проводять повну штучну елімінацію високоактивних клітин, таких як лейкоцити, ендотелії судин, дендритичні клітини і т. інш. Особливістю фетальних клітин є також те, що в ранньому фетальному періоді трансплантати не мають зрілих лімфоцитів, вони толерантні до тканин реципієнта. Ембріональні клітинні суспензії володіють більшою резистентністю, ніж зрілі клітини. Вони здатні виживати при більш низьких рівнях кисню. Не маючи довгих відростків і не володіючи сильною міжклітинною адгезією, вони менш піддаються травматичному пошкодженню під час всіх етапів приготування суспензій. І, нарешті, вони легше і простіше мінують режими програмних криозаморожувань і відтавання, зберігаючи за собою свої дивні властивості і менш зіпсувався, ніж зрілі клітини.

В нинішній час застосовуються клітинні суспензії приготовані з ембріонального мозку, спин мозку, печінки, селезінки, тимусу, підшлункової залози, шкіряно-м'язового лоскута.

Ембріональні клітинні суспензії містять також гемопоетичні чинники зростання, альфа-фетопротейн, інтерлейкіни, чинник некрозу пухлин, чинник зростання нервів, ангиогенний чинник, нейротрофічний чинник, інсуліноподібні поліпептиди і та ін.

Початок практичного застосування трупних ембріональних органів людини в лікувальній меті зв'язане з розвитком напрямку Fetal liver transplantation.

За останні роки, варіюючи різноманітними засобами приготування клітинних суспензій, а також різноманітними методами їхнього застосування, дослідникам вдалося досягнути позитивних результатів при лікуванні первинних і вторинних мієлодепресивних станів. Ці препарати, в частковості, описані в Izzi T., Polehi O., et al, Fetal liver transplantation, Alan R. Liss, 1985, pp.237-249).

Другим направленням клінічного застосування означених клітинних суспензій з'явилися порушення імунітету, тут найбільш значний досвід належить Touraine J. I (Trans-plantation Proceedings, 1993, v.25, 1, pp.1012-1013). В прекрасній роботі Baechelta R, et al in I. Clin. Invest, 1993, v.91, March, 1067-1078) показані віддалені результати лікування хворих з важким що комбінувалися імунним дефіцитом, коли не тільки відновлювалися показники імунітету у цих хворих, але показана наявність расщепленого химеризму і поява толерантності до антигенів як господаря, так і донору.

Самий великий досвід, що опублікувався в області Fetal liver transplantation належить J.L.Touraine.

Роботи J.L.Touraine добре відомі авторам винаходи. Разом з Тим, J.L.Touraine ніколи не розглядав лікування хвороб кишечника. Крім того, заявники вважають, що їхній засіб має істотні відзнаки від того, що описане J.L.Touraine та ін.

Важкі природжені імунodefіцити, лікуванням яких займається J.L.Touraine та ін. - це велика група спадкових захворювань, при яких є різноманітні природжені дефекти генетичного апарату стовбурових клітин гемопоєзу, із-за чого порушуються окремі ланки кровотворення.

Трансплантація здорового в генетичному відношенні pool of Stem Cells of Hemopoiesis дозволяє компенсувати природжений дефект. Специфіка цих захворювань вимагає якомога більш раннього втручання (аж до внутрішньоутробного періоду реципієнта), а також веде до загибелі реципієнта за відсутності приживлення трансплантатів.

Як видно з цього зіставлення механізмів виникнення і розвитку захворювання, перед трансплантацією J.L.Touraine та ін. і вступом нашого лікарського препарату ставляться принципово різні мета в процесі досягнення лікувального ефекту.

J.L.Touraine та ін. Описують використання для лікування трансплантологічного засобу Fetal liver transplantation.

Матеріал для трансплантації брався безпосередньо від трупу плоду або декількох трупів. Єдиною характеристикою введеного матеріалу була кількість введених клітин. Жодні особливі характеристики вводимого матеріалу J.L.Touraine не використовувались, окрім визначення антигенів гистосумісництва. Ці параметри приводяться в публікаціях в порядку констатації, а не для рішення питання о здатності трансплантата для лікування.

б. Ми використаємо (а) заздалегідь протестований лікарський препарат з (b) технологією, що регламентувала приготування, (с) лікувальні властивості якого можуть бути передречені, (d) інфекційна безпека застосування протестованого, (е) час застосування визначається показаннями лікаря, а не обставинами отримання матеріалу.

Іншими словами, ми працюємо з лікарською речовиною з відомими характеристиками, без необхідності додатково досліджувати його прийнятність для реципієнта по HLA антигенам сумісництва і без сюрпризів інфікування при застосуванні ex tempore.

При цьому ми вводимо пацієнту живі клітини, що дадуть потомство, розмножуються, диференціюються і заповнюють втрачені або послаблені функції пацієнта. Це принципово новий клас лікарських препаратів, що дозволяє проводити [фармако] терапію з допомогою клітинних суспензій, що містить життєспроможний початок тих або інших функцій організму людини.

В зв'язку з цим хочемо підкреслити, що характеристики лікарських речовин, наведені в заяві, не є специфічними характеристиками діючої речовини.

Реальний опис і оцінка його поліпотентних властивостей і поліморфної організації, плюс їхня еволюція в організмі на шляхах специфічної диференціації в процесі розмноження і життя з урахуванням специфіки захворювання на сучасному етапі знань не представляються можливими, тим більш в кількісному вираженні.

В формулі приводяться неспецифічні характеристики цілості, активності і життєздатності клітинних суспензій після виконання технологічних процедур, кріоконсервування і розморожування.

В процесі лікування що заявляється лікарським препаратом, отриманим з ембріональної печінки і селезінки, як бачимо, значний ефект зв'язаний з чинністю гемопоетичних стовбурових клітин.

В статтях, що опублікувалися J.L.Touraine в 90-і роки він також став на позиції, що при лікуванні імунodefіцитів у дітей діючим агентом при Fetal liver transplantation є гемопоетичні стем селлс, хоча характеристики стем і прогеніторних клітин J.L.Touraine не призводить.

Разом з тим, клітинні суспензії лікарських препаратів, що заявляються різноманітні по походженню, поліморфні по складу і поліфункціональні по ефектам своєї чинності.

Крім того, в клітинній суспензії зберігається безклітинна рідина, що входить в склад ембріонального органу, і містить велику кількість біологічних активних речовин. Вона може впливати окрім відновлення гематологічних імунних порушень, також на обмін речовин, проникність бар'єрів, судин, володіти прямим протизапальним ефектом, викликати зростання судин, зміцнює бар'єрні утворення, виявляє вплив на зростання нервів, зменшувати явища дистрофії.

Таким чином, ми використовуємо клітинні суспензії з різноманітних ембріональних органів, їхня чинність має специфіку, зв'язану з походженням, поліфункціональність в межах окремих органів, містить неклітинні компоненти характерного оточення, різне спрямування еволюційної програми розвитку в організмі реципієнта. Таким чином ефекти, що заявляються клітинних суспензій не зводяться до чинності стем і прогенітор селлс.

Крім того, позитивний ефект лікування імунodefіцитів у J.L.Touraine та ін. Визначається досягненням ефекту приживлення трансплантата. Відторгнення цього трансплантата веде до загибелі хворого.

Ефекти, що досягаються при застосуванні наших препаратів, не зв'язані з приживленням клітин, а зв'язані з:

- тимчасовим заміщенням послаблених функцій за рахунок вводимих клітинних суспензій,
- заповненням ззовні ресурсів функцій,
- поповненням пула stem cells,
- нормалізацією метаболічних і трофічних процесів,
- нормалізацією параметрів гомеостазу,
- зниженням прояву ускладнень,
- оптимізацією психологічної і психофізіологічної сфери пацієнта.

Таким чином, препарат, що заявляється лікарський, хоча і відбувається з ембріональних органів людини, минає таку біотехнологічну процедуру, що забезпечує його використання в режимі застосування лікарських речовин при збереженні життєздатності клітин, в тому числі стовбурових і прогеніторних.

Стосуючись робіт авторів, працюючих в області Fetal liver transplantation, в частковості, Touraine J.L. та інших, необхідно помітити, що:

Використання клітинних суспензій з ембріональної печінки відбувається по законам використання трансплантата

Загальна кількість клітин є основною характеристикою матеріалу

Суспензії часто готуються з органів декількох ембріонів.

Трансплантація вимагає підбору матеріалу по системам антигенів гистосумісності

Приготовані клітинні суспензії звичайно не відбирають по оптимальним характеристикам.

Використання Fetal liver transplantation ex tempore не забезпечувало інфекційну безпеку лікування.

Захворювання кишечника, що підлягають лікуванню лікарськими препаратами на основі ембріональних клітинних суспензій.

Функціональні захворювання

I. Дискінезія

3 недостатнім спорожненням (запори)

3 прискореним спорожненням (неврогенна діарея)

II. Кишкова диспепсія (бродильна, гнильна, змішана)

III. Алергічні поразки кишок.

IV. Синдром подразливої кишки (слизиста колька, мембранозний коліт, секреторний невроз)

Захворювання запального характеру

Класифікація запального процесу в тонкій і товстій кишках по етіологічним чинникам

1. Інфекційний (постінфекційний) (специфічний, неспецифічний)

2. Паразитарний

3. Токсичний

4. Медикаментозний.

5. Алергічний.

6. Аутоімунний

7. Променевий.

8. Механічний.

9. Генетична неповноцінність епітеліоцитів слизової оболонки.

10. Генетична неповноцінність гладком'язових клітин.

11. Природжені ензимопатії

12. Вторинний.

13. Нез'ясованої етіології.

Клінічні форми запального процесу в кишечнику

Дуоденіт

Первинний,

Вторинний,

Гострий,

Хронічний

Ентерит

Первинний,

Вторинний,

Гострий,

Хронічний

Ентероколіт

Первинний,

Вторинний,

Гострий,

Хронічний

Неспецифічний виразковий коліт Класифікація клінічних форм:

Форма течії:

Гостра (блискавична і гостра), Хронічна (рецидивна і безперервна)

Розвиток захворювання:

Інтермітуюче,

Ремітуюче

Тяжкість захворювання:

Легка

Середньоважка

Важка

Розповсюдженість поразки:

Проктит

Проктосигмоїдіт

Лівостороння

Субтотальна

Тотальна

Активність запалення:

Мінімальна

Помірна

Висловлена

Наявність ускладнень:

Місцеві

Загальні

Хвороба Крона

Класифікація клінічних форм:

Форма течії:

Гостра

Хронічна (рецидивна і безперервна)

Тяжкість захворювання:

Легка

Середньоважка

Важка

Розповсюдженість поразки:

Проктит

Проктосигмоїдіт

Лівостороння

Субтотальна

Тотальна

Термінальний ілеїт

Активність запалення

Мінімальна

Помірна

Висловлена

Наявність ускладнень:

Місцеві

Загальні

Ішемічний коліт

Пухлини кишечника

Доброякісні

Злоякісні

Спайкова хвороба

Лікарські препарати на основі ембріональних клітинних суспензій, засоби їхнього приготування і засоби лікування функціональних, запальних і онкологічних захворювань тонкої і товстої кишок з використанням цих препаратів.

Заявляються вісім лікарських препаратів - являючи собою клітинні суспензії, приготовані на основі ембріональних органів людини:

Препарат 1

- Гемопоетичні клітини ембріональної печінки людини (ГКЕПЛ)

Препарат 2

- Гемопоетичні клітини ембріональної селезінки людини (ГКЕСЛ)

Препарат 3

- Стволові клітини гемопоезу ембріональної печінки людини (СКГЕПЛ)

Препарат 4

- Стволові клітини гемопоезу ембріональної селезінки людини (СКГЕСЛ)

Препарат 5

- Гепатоцити ембріональної печінки людини (ГЦЕПЛ)

Препарат 6

- Тимоцити ембріонального тимусу людини (ТЦЕТЛ)

Препарат 7

- Епітеліоцити ембріонального первинного харчового каналу (ЕЦЕПХК)

Препарат 8

- Нервові клітини ембріонального мозку людини (НКЕМЛ)

Препарат 1 - Гемопоетичні клітини ембріональної печінки людини

Приготування лікарського препарату

Використають ембріони 5-14 тижнів гестації. Ембріони одержують при штучному перериванні вагітності у здорових, заздалегідь на наявність вірусних і гемічних інфекцій жінок, що обстежилися. В меті збереження цілісності ембріону аборт проводять вакуумекстракцією. Ембріони переносять в стерильні чашки Петрі, заповнені розчином Хенкса з додаванням антибіотика аміноглікозидного ряду (напр., гентаміцин в концентрації 160мг гентаміцину на 1000мл розчину Хенксу).

Приготування розчину Хенкса (Hanks, Wallace, 1949): Розчин Хенкса (Hanks, Wallace, 1949) використовувався в якості середовища для приготування клітинних суспензій. Цей розчин є загальноприйнятим для приготування поживних середовищ.

NaCl	8.0г
KCl	0.4г
CaCl ₂	0.14г
MgCl ₂	0.1г
MgSO ₄ ·7H ₂ O*	0.1г
Na ₂ HPO ₄	0.06г
KH ₂ PO ₄	0.06г
NaHCO ₃	0.07г
Глюкоза	1.00г
Фенол (водорозчинна форма)	0.02г

(води бідистильованої переграної в склі до 1л)

Хлористий кальцій (CaCl₂) заздалегідь розчиняють в 30-50мл води і поволі додають до розчину інших солей. За наявності цієї солі з більшим змістом кристалізаційної води (Na₂HPO₄·12H₂O*) її додають в кількості 2г. Отриманий розчин фільтрують через паперовий або ватно-марлевий фільтр. Після цього розчин розливають в скляний посуд, закривають ватно-марлевими пробками і стерилізують поточним паром при температурі 100 градусів Цельсія без тиску по 20 хвилин 3 дні підряд.

Розчин при додаванні індикатора фенолового червоного має червоно-рожевий колір. Для настанови рН в розчин Хенкса додають стерильний 1.41 розчин двовуглекислого натрію (NaHCO₃).

Розчин Хенкса при роботі з культурою тканин повинен мати рН 7.2-7.4.

При додаванні в клітинну суспензію після гомогенізації використовується розчин Хенкса, що не містить фенолового червоного.

Зберігають розчин при 4-60С, але можна також і при кімнатній температурі. Термін придатності один місяць.

Подальша робота проводиться в стерильних умовах боксу. Ембріони переносять в стерильні чашки Петрі, заповнені середою Хенкса з антибіотиками, де, обережно розчинивши черевну полость, витягають селезінку, з якої окремо готують клітинну суспензію.

Кровотворний орган помішують в гомогенізатори, розрізають на невеликі фрагменти і здрібнюють до отримання однорідної маси. Клітини змивають зі стін і пестика гомогенізатора середою Хенкса в мірні пробірки, пропускаючи через фільтр для переливу препаратів крові, а після цього через голки діаметру, що зменшується.

Порція приготованої таким чином суспензії переноситься в поліетиленовий циліндр і герметично закривається. Ця порція може бути використана для трансплантації нативної суспензії. Інші порції будуть піддані криоконсервації.

Ембріональні клітинні суспензії розливаються в поліетиленові контейнери ємністю від 0.5 до 2.0мл (в залежності від подальшого призначення)

Приготування і використання нативних клітинних суспензій.

Нативні клітинні суспензії одержують після пропущення гомогената ембріональних тканин через фільтр для переливу препаратів крові і голки діаметру, що зменшується.

Нативні клітинні суспензії застосовують по тим же показанням і з допомогою тих же засобів вступу, що і кріоконсервовані клітинні суспензії. Нативні клітинні суспензії використовуються в течію 6-8 годин від моменту взяття матеріалу. Від моменту отримання і до моменту вступу нативних клітинних суспензій реципієнту вони зберігаються при температурі +5-7 градусів Цельсія.

Стислі терміни від моменту приготування до моменту вступу нативних клітинних суспензій зумовлюють особливості їх тестування, а саме редуційовану програму тестування у порівнянні з кріоконсервованими клітинними суспензіями.

В нативних клітинних суспензіях виробляється підрахунок ядровмістних клітин в 1мл суспензії. Однак тестування нативних клітинних суспензій на КОЕ-ГМ ('colony-forming units of the granulocyte/macrophage (CFU GM)'), КОЕ-ЕММ ('colony-forming units of the granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, megakaryocyte (CFU GEMM)') і СД34 ('progenitor cells (CD34)') перед трансплантацією не проводиться.

Програма вірусологічного і бактеріологічного контролю нативних клітинних суспензій також обмежена.

Дослідження на бактеріальну стерильність проводиться, однак його результати стають відомі після трансплантації. Тому печінка в цьому випадку береться тільки з цілого ембріону зі розтинанням черевної порожнини в стерильних умовах. Такий матеріал вважається умовно бактеріологічно стерильним.

Фетальна діагностика на наявність вич-інфекції, вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції, вірусу краснухи і герпеса проводиться також ретроспективно. Тому нативні клітинні суспензії готуються тільки при повній пренатальній діагностиці донора, включаючи в себе дослідження крові донора на наявність сифілісу, віл-інфекції, вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції. При застосуванні нативних клітинних суспензій проводиться також дослідження крові реципієнта на наявність вірусних інфекцій: вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції, герпеса.

Незважаючи на те, що з застосуванням нативних клітинних суспензій зв'язувалася надія отримання більш висловленого клінічного ефекту трансплантації, наш досвід використання нативних і кріоконсервованих клітинних суспензій дозволив прийти до укладення, що ефект застосування нативних клітинних суспензій не перевищує ефект кріоконсервованих клітинних суспензій. В нинішній час ми не схильні рекомендувати нативні клітинні суспензії для трансплантації і віддаємо перевагу кріоконсервованим клітинним суспензіям.

Кріоконсервування клітинних суспензій.

Після приготування клітинної суспензії, включаючи додання кріопротектора, отримані клітинні суспензії розливаються в поліетиленові контейнери які закручуються пробками ємністю 2мл. В кожний контейнер вміщується суспензія в кількості від 0.5 до 2мл.

В якості кріопротектора використовується діметилсульфоксид (ДМСО, хімічно чистий). ДМСО є добре відомим кріопротектором. Перед використанням ДМСО пропускається через мілішпоровий фільтр (діаметр шпор 0.22mm).

При легком змішуванні клітинної суспензії в неї перед кріоконсервуванням додається по краплям рівній кількості КС обсяг свіжезробленого робітничого розчину ДМСО (1.4моль на літр). Підсумкова концентрація ДМСО в отриманій КС складає 3-10%.

Відмивання препарату від ДМСО перед трансплантацією не вимагається. Його концентрація в контейнерах складає від 3 до 10%. При його розведенні в ізотонічному розчині хлористого натрію при вступі реципієнту вона відповідно падає в 50-100 разів і не є токсичною для організму.

Більш того, ДМСО є провідником біологічних активних речовин через біологічні бар'єри і мембрани, сприяючи біологічному ефекту трансплантації.

Для клітинної суспензії кожного ембріону обов'язково є 6 контрольних контейнерів наступного призначення:

1 контейнер, що містить 0.5мл клітинної суспензії, передвизначені для тестування функціональної спроможності КС після розморожування;

3 контейнери, що містять по 1.0-1.5мл клітинної суспензії, передвизначені для вірусологічного контролю цього ембріону. Клітинні суспензії для цих контейнерів готуються з шкіряно-м'язового лоскута цього ж ембріону також як клітинні суспензії з печінки. Один контейнер досліджується на наявність вірусних інфекцій в лабораторії установи-виготівника клітинної суспензії, другий контейнер передається для паралельного дослідження державної контролюючої лабораторії. Третій контейнер залишається в кріосховищі для постійного зберігання з метою підтвердження в подальшому безпеки матеріалу, включаючи вірусологічну і бактеріальну). Матеріал, в якому хоча б в 1 контейнері виявляються віруси, знищується разом зі всім матеріалом від цього ж ембріону шляхом зпалювання.

2 контейнери, що містять по 1.0-1.5мл змивної води з лабораторного посуду і інструментів, передвизначені для дослідження бактеріальної стерильності. 1-й контейнер досліджується в лабораторії установи-виготівника, 2-й в державній контрольній лабораторії.

Всі контейнери, за винятком 2-х призначених для вірусологічного контролю і 2-х, призначених для бактеріологічного контролю, наражаються у програмному кріозаморожувачі до -196 градусів Цельсія. Контейнери приміщають до камери програмного заморожування вертикально. Заморожування проводять в 3 етапи:

1 - від температури приміщення до -4 градусів Цельсія зі швидкістю 1 градус Цельсія в хвилину;

2 – від -4 до -10 градусів - зі швидкістю 0.1 градус в хвилину;

3 – від -10 до -190 градусів - зі швидкістю 7 градусів в хвилину. Після цього контейнери переносять в біосейфи, де зберігають в рідкому азоті необмежений час до використання.

Операції кріоконсервування і розморожування безумовно відбиваються на характеристиках матеріалу. Тому в засобі, що заявляється дослідження характеристик клітинних суспензій виробляється після виконання обох цих процедур, то є вже після розморожування раніше кріоконсервованого матеріалу. Таким чином забезпечується контроль результатів роботи відносно якості кріоконсервування і розморожування.

Крім того, ми визнали доцільним використати один з відомих засобів кріоконсервування, що, певно, є

одним з кращих по відношенню до нашого об'єкту, складається з трьох стадій заморожування (Федотенков А.Г., Шишкін І.Д., Данілова Л.А. та ін. Кріоконсервування костного мозку при низьких температурах для клінічної мети. Проблеми гематології 1966, т.10,12, стор.45-50).

Разом з тим, спеціальні роботи, проведені для оцінки впливу кріоконсервування, свідчать "cryopreservation did not adversely change the population, viability or immunological capacity of human Fetal liver transplantation" (Ek S., Ringden O., Markling L., Westgren M. Cryopreservation of fetal stem Cells. Bone Marrow transplantation, 11 Suppl, 1: 123, 1993).

Розморожування клітинних суспензій.

Розморожування клітинних суспензій виробляється безпосередньо перед їхнім застосуванням. Програма розморожування включає дві фази - швидку і повільну.

Швидку фазу розморозки матеріал минає шляхом приміщення контейнера у водяну лазню з температурою 40гр Цельсія до появи рухомої центральної льдинки в контейнері.

Далі слідує повільна фаза при звичайній кімнатній температурі, доки в контейнері витягнутому з води не зникне льдинка.

При кімнатній температурі розморожена клітинна суспензія зберігатися до трансплантації не більш 2 годин.

Тестування функціонального стану кріоконсервованих клітинних суспензій.

Після приготування клітинної суспензії і її кріоконсервування контрольний контейнер, що містить 0.5мл клітинної суспензії, використовується для тестування функціонального стану матеріалу. Для цього він розморожується по програмі, по якій перед трансплантацією виробляється розморожування всіх інших контейнерів.

В розмороженої порції клітинної суспензії узвичаєними засобами визначається:

Загальна кількість ядровмістних клітин в 1мл (клітинним аналізатором або візуально під мікроскопом в рахувальній камері),

"Colony-forming units of the granulocyte/macrophage (CFU GM)" used in international scientific publications; this-term means "an hematopoietic cell which is capable of producing a colony composed of granulocyte and macrophage progeny in semi-solid medium". КОЕ ГМ в 1мл (засобами клонування КОЕ в метилцелюлозі Hann V., Bodger M., Hoffbrand a. Development of pluripotent hematopoietic progenitor cells in the human fetus//Blood. - 1983. - Vol.62. - N.4 - P.118-123.)

"Colony-forming units of the granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, megakaryocyte (CFU GEMM)", meaning "a multipotential hematopoietic cell which is capable of producing a colony composed of granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, and megakaryocyte progeny in semi-solid medium". КОЕ GEMM в 1мл (тж) (ibid).

"contents of early precursors of hemopoiesis", the authors propose to replace it with a commonly used English term "progenitor cells (CD34)". CD34 в 1мл (indirect immunofluorescent test with the panel of monodonal antibodies).

Саме на ці характеристики КС, отримані після розморожування, ми орієнтуємося при оцінці функціональної спроможності КС при виборі матеріалу для трансплантації.

Ми не проводимо прижиттєве забарвлення мазків КС для визначення відсотка пошкодження клітин т. до. При відпрацьованій технології приготування клітинних суспензій ці характеристики мало корелюють з клінічним ефектом і не відповідають на питання про функціональну повноцінність КС.

Тестування вірусної і бактеріальної стерильності.

3 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл клітинної суспензії, передвизначені для вірусологічного контролю даного ембріону. Клітинні суспензії для цих контейнерів готується з шкіряно-м'язового лоскута цього же ембріону так же як клітинні суспензії з печінки. Один контейнер досліджується на наявність вірусних інфекцій в лабораторії установи-виготівника клітинної суспензії, другий контейнер передається для паралельного дослідження державної контролюючої лабораторії. Третій контейнер залишається в кріосховищі для постійного зберігання з метою підтвердження в подальшому безпеки матеріалу, включаючи вірусологічну і бактеріальну). Матеріал, в якому хоча б в 1 контейнері виявляються віруси, знищується разом зі всім матеріалом від цього же ембріону шляхом зпалювання.

2 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл змивної води з лабораторного посуду і інструментів, передвизначені для дослідження бактеріальної стерильності. 1-й контейнер досліджується в лабораторії установи-виготівника, 2-й в державній контрольній лабораторії.

Пренатальна діагностика донора ембріонального матеріалу включає дослідження на сифіліс, віл-інфекцію, вірусні гепатити В, і С, токсоплазмоз, цитомегаловірус.

Фетальна діагностика матеріалу включає віл-інфекцію, вірусні гепатити В, і С, токсоплазмоз, цитомегаловірус, віруси рубелли, герпесу.

Повторна діагностика донора на наявність віл-інфекції проводиться через 90-100 днів після аборту.

Властивості лікарського препарату.

1. Відновлення показників імунітету: загальної кількості лімфоцитів, субпопуляцій лімфоцитів Т4, Т8, NK клітин, В-лімфоцитів, корекція їхнього співвідношення, зняття явищ імунологічної атаки, аутоімунної поразки, імунної агресії, феномену супресії.

2. Формування протипухлинного імунітету.

3. Відновлення показників крові: відновлення кількості лейкоцитів, еритроцитів, тромбоцитів.

4. Поліпшення трофіки органів, поліпшення мікроциркуляції, досягнення повнокров'я стінки кишки.

5. Підсилення процесів регенерації, до швидкого заживлення виразкових дефектів, що приводяться і закриття їх епітеліальним пластом.

6. Підсилення кишечного бар'єру, зменшення явищ кишкової інтоксикації, зменшення або зникнення пропасниці.

7. Поліпшення психоемоційного стану пацієнта, поява волі до видужання, нормалізація формули сна,

поява апетиту, зростання обсягу рухів.

8. Нормалізація функціональної активності кишки: при діареї, зменшення частоти стільця, при запорах - поява регулярного стільця.

9. Обезболюючий ефект.

10. Запобігання розвитку сполучної тканини в результаті перитоніту і операційної травми.

Терапевтичне використання препарату. Показання до застосування лікарського препарату.

1. Імунні і аутоімунні, алергічні поразки кишечника.

2. Хвороби кишечника, що супроводжуються глибокою лейкопенією, агранулоцитозом, анемією, тромбоцитопенією.

3. Кишковий синдром при цитостатичній хворобі, включаючи променеві поразки.

4. Ішемічні поразки кишечника (ішемічний коліт).

5. Пухлини кишечника до і після оперативного лікування, до і після курсів хіміо- і рентгенотерапії.

6. Атонія, гіпокінезія, спастичні стани кишків.

7. Виразковий ерозивний процеси.

8. Розвиток сполучної тканини в стінці кишки.

9. Явища інтоксикації: слабкість, пітливість, підвищення температури, порушення дієздатності, зниження ваги (кахексія).

10. Астено-невротичний синдром, депресивні стани.

Шляхи введення до організму.

Клітинні суспензії, приготовані з ембріональної печінки, найбільш часто вводяться внутрішньовенно хоча можливий шлях внутрішньочеревний, внутрішньокістковий. А саме:

Лікарський препарат вводять внутрішньовенно крапельно в складі 100мл ізотонічного розчину хлористого натрію зі швидкістю 20-40 крапель в хвилину.

Можливо внутрішньочеревний вступ (доцільно здебільшого в педіатричній практиці), коли клітинна суспензія розбавляється ізотонічним розчином хлористого натрію до обсягу 50мл і вводиться струйно внутрішньочеревно.

За наявності у хворих свіжих тромбоутворень або гемофтальмопатій (крововилив в тканини ока), а також при явищах гіперспленізму рекомендуємо клітинну суспензію вводити внутрішньокістково в грудину в обсязі до 50мл ізотонічного розчину хлористого натрію струйно. Обсяг вводимого препарату може бути від 0.5 до 8мл. При цьому число 2-х мілілітрових контейнерів, що використовуються, в яких зберігається препарат, може бути від 1 до 4-5.

Можливо спільне використання клітинних суспензій, що рекомендувалися для лікування захворювань, що заявляються кишечника, в будь-яких сполученнях.

При сполученном використанні лікарських препаратів з різноманітних ембріональних органів більш прийнятним є використання препаратів, приготованих з одного і того ж ембріону.

Вибір обсягу, що пропонується для вступу клітинної суспензії.

5.0мл це максимальний обсяг клітинної суспензії, що може бути отриманий з вхідного матеріалу при означених кількісних характеристиках (п.1.); 0.5мл - це мінімальний обсяг, зручний для технічного обслуговування маніпуляцій, оскільки частина клітин завжди залишається у флаконі, в трубках, в голках і т.ін. Тому контейнер повинен містити препарат в означених межах обсягу.

Звичайно в течію одного лікувального сеансу вводять 0.5-2.0мл клітинної суспензії.

Повторний вступ препарату.

При повторному вступі препарату на наступних етапах лікування пацієнта більш прийнятним є використання клітинної суспензії з того-ж ембріону, що був використаний в перший раз. Саме для реалізації цієї особливості засобу приготування з ембріонального органу суспензія розливається в декілька контейнерів. Ембріональна суспензія закріплюється за конкретним пацієнтом і зберігається в кріобанці для наступного використання у цього-ж пацієнта.

Автори відносять до позитивних якостей засобу, що пропонується можливість досягнути повноцінного лікувального ефекту при застосуванні малих доз фетального матеріалу.

Протипоказання до застосування.

1. Васкуліт в гострій фазі. Капіляріт, флебіт, артрит. Трансплантація можлива після активного лікування і досягнення ремісії через 2-3 місяця.

2. Гострий тромбоз. Лікування можливо через 3-6 місяців.

3. Гемофтальмопатія. Лікування можливо тільки через 2-3 місяця після розвитку гемофтальмопатії.

4. Різко виражена гіпертензія малого кола, зв'язана з васкулітом, тромбозом, долевою пневмонією, з розвитком гострого або підгострого *cor pulmonale*.

5. Мєлокарціноз.

6. Термінальні стадії захворювання (висловлена інтоксикація, глибокі розлади обміну речовин, важка загальна декомпенсація).

7. Наявність очагів хронічної інфекції. Необхідна їхня санація.

Препарат 2 - Гемопоетичні клітини ембріональної селезінки людини.

Приготування лікарського препарату.

Використають ембріони 5-14 тижнів гестації. Ембріони одержують при штучному припиненні вагітності у здорових, заздалегідь на наявність вірусних і гемічних інфекцій жінок, що обстежилися. В меті збереження цілісності ембріону аборт проводять вакуумекстракцією. Ембріони переносять в стерильні чашки Петрі, заповнені розчином Хенкса з додаванням антибіотику аміноглікозидного ряду (напр., гентаміцин в концентрації 160мг гентаміцина на 1000мл розчину Хенкса).

Приготування розчину Хенкса (Hanks, Wallace, 1949): Розчин Хенкса (Hanks, Wallace, 1949) використовувався в якості середовища для приготування клітинних суспензій. Цей розчин є загальноприйнятим для приготування поживних середовищ.

NaCl	8.0г
Kcl	0.4г
CaCl2	0.14г
MdCl2	0.1г
MgSO47H2O*	0.1г
Na2HPO4	0.06г
KH2PO4	0.06г
NaHCO3	0.07г
Глюкоза	1.00г
Фенол (водорозчинна форма)	0.02г

(води бідистильованої перегнаної в склі до 1л)

Хлористий кальцій (CaCl2) заздалегідь розчиняють в 30-50 мл води і поволі додають до розчину інших солей. За наявності цієї солі з більшим змістом кристалізаційної води (Na2HPO412H2O*) її додають в кількості 2г. Отриманий розчин фільтрують через паперовий або ватно-марлевий фільтр. Після цього розчин розливають в скляний посуд, закривають ватно-марлевими пробками і стерилізують текучим паром при температурі 100 градусів Цельсія без тиску по 20 хвилин 3 дні підряд.

Розчин при доданні індикатора фенолового червоного має червоно-рожевий колір. Для настанови рН в розчин Хенкса додають стерильний 1.4% розчин двовуглекислого натрію (NaHCO3).

Розчин Хенкса при роботі з культурою тканин повинен мати рН 7.2-7.4.

При доданні в клітинну суспензію після гомогенізації використовується розчин Хенкса, що не містить фенолового червоного.

Зберігають розчин при 4-60С, але можна також і при кімнатній температурі. Термін придатності один місяць.

Подальша робота проводиться в стерильних умовах боксу. Ембріони переносять в стерильні чашки Петрі, заповнені середою Хенкса з антибіотиками, де, обережно розчинивши черевну полость, витягають селезінку, з якої окремо готують клітинну суспензію.

Кровотворний орган помішують в гомогенізатори, розрізають на невеликі фрагменти і подрібнюють до отримання однорідної маси. Клітини змивають зі стінок і пестика гомогенізатора середою Хенкса у мірні пробірки, пропускаючи через фільтр для переливання препаратів крові, а після цього через голки діаметру, що зменшується.

Порція приготованої таким чином суспензії переноситься в поліетиленовий циліндр і герметично закривається. Ця порція може бути використана для трансплантації нативної суспензії. Інші порції будуть піддані кріоконсервації.

Ембріональні клітинні суспензії розливаються в поліетиленові контейнери ємністю від 0.5 до 2.0мл (в залежності від подальшого призначення).

Приготування і використання нативних клітинних суспензій.

Нативні клітинні суспензії одержують після пропущення гомогената ембріональних тканин через фільтр для переливу препаратів крові і голки діаметру, що зменшується.

Нативні клітинні суспензії застосовують по тим же показанням і з допомогою тих же засобів введення, що і кріоконсервовані клітинні суспензії. Нативні клітинні суспензії використовуються в течію 6-8 годин від моменту взяття матеріалу. Від моменту отримання і до моменту вступу нативних клітинних суспензій реципієнту вони зберігаються при температурі +5-7 градусів Цельсія.

Стислі терміни від моменту приготування до моменту вступу нативних клітинних суспензій зумовлюють особливості їх тестування, а саме редуційовану програму тестування у порівнянні з кріоконсервованими клітинними суспензіями.

В нативних клітинних суспензіях виробляється підрахунок ядровміщуючих клітин в 1мл суспензії. Однак тестування нативних клітинних суспензій на КОЕ-ГМ ('colony-forming units of the granulocyte/macrophage (CFU GM)'), КОЕ-ГММ ('colony-forming units of the granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, megakaryocyte (CFU GEMM) ') і СД34 ('progenitor cells (CD34)') перед трансплантацією не проводиться.

Програма вірусологічного і бактеріологічного контролю нативних клітинних суспензій також обмежена.

Дослідження на бактеріальну стерильність проводиться, однак його результати стають відомі після трансплантації. Тому ембріональна селезінка в цьому випадку береться тільки з цілого ембріону зі розтинанням черевної порожнини в стерильних умовах. Такий матеріал вважається умовно бактеріологічно стерильним.

Фетальна діагностика на наявність віл-інфекції, вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції, вірусу краснухи і герпеса проводиться також ретроспективно. Тому нативні клітинні суспензії готуються тільки при повній пренатальній діагностиці донора, включаючої в себе дослідження крові донора на наявність сифілісу, віл-інфекції, вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмоза, цитомегаловірусної інфекції. При застосуванні нативних клітинних суспензій проводиться також дослідження крові реципієнта на наявність вірусних інфекцій: вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції, герпеса.

Незважаючи на те, що з застосуванням нативних клітинних суспензій зв'язувалася надія отримання більш висловленого клінічного ефекту трансплантації, наш досвід використання нативних і кріоконсервованих клітинних суспензій дозволив прийти до укладення, що ефект застосування нативних клітинних суспензій не перевищує ефект кріоконсервованих клітинних суспензій. В нинішній час ми не схильні рекомендувати нативні клітинні суспензії для трансплантації і віддаємо перевагу кріоконсервованим клітинним суспензіям.

Кріоконсервування клітинних суспензій.

Після приготування клітинної суспензії, включаючи додання кріопротектора, отримані клітинні суспензії розливаються в поліетиленові контейнери які закручуються пробками ємністю 2мл. У кожний контейнер вміщується суспензія в кількості від 0.5 до 2мл.

В якості кріопротектору використовується диметилсульфоксид (ДМСО, хімічно чистий). ДМСО є добре відомим кріопротектором. Перед використанням ДМСО пропускається через мілішпоровний фільтр (діаметр шпору 0.22µm).

При легкому змішуванні клітинної суспензії в неї перед кріоконсервацією додається по краплинам рівної кількості КС обсяг свіжезробленого робітничого розчину ДМСО (1.4моль на літр). Підсумкова концентрація ДМСО в отриманій КС складає 3-10%.

Відмиття препарату від ДМСО перед трансплантацією не вимагається. Його концентрація в контейнерах складає від 3 до 10%. При його розведенні в ізотонічному розчині хлористого натрію при вступі реципієнту вона відповідно падає у 50-100 разів і не є токсичною для організму.

Більш того, ДМСО є провідником біологічних активних речовин через біологічні бар'єри і мембрани, сприяючи біологічному ефекту трансплантації.

Для клітинної суспензії кожного ембріону обов'язково є 6 контрольних контейнерів наступного призначення:

1 контейнер, що містить 0.5мл клітинної суспензії, передвизначений для тестування функціональної спроможності КС після розморожування;

3 контейнери, що містять по 1.0 - 1.5мл клітинної суспензії, передвизначені для вірусологічного контролю даного ембріону. Клітинні суспензії для цих контейнерів готуються з шкіряно-м'язового лоскута цього ж ембріону також як клітинні суспензії з печінки і селезінки. Один контейнер досліджується на наявність вірусних інфекцій в лабораторії установи-виготівника клітинної суспензії, другий контейнер передається для паралельного дослідження державної контролюючої лабораторії. Третій контейнер залишається в кріосховищі для постійного зберігання з метою підтвердження в подальшому безпеки матеріалу, включаючи вірусологічну і бактеріальну. Матеріал, в якому хоча б в 1 контейнері виявляються віруси, знищується разом зі всім матеріалом від цього ж ембріону шляхом зпалювання.

2 контейнери, що містять по 1.0-1.5мл змивної води з лабораторного посуду і інструментів, передвизначені для дослідження бактеріальної стерильності. 1-й контейнер досліджується в лабораторії установи-виготівника, 2-й в державній контрольній лабораторії.

Всі контейнери, за винятком 2-х призначених для вірусологічного контролю і 2-х, призначених для бактеріологічного контролю, наражаються на програмному кріозаморожувачі до -196 градусів Цельсія. Контейнери містять до камери програмного заморожування вертикально. Заморожування проводять в 3 етапи:

1 - від температури приміщення до -4 градусів Цельсія зі швидкістю 1 градус Цельсія в хвилину;

2 - від -4 до -10 градусів - зі швидкістю 0.1 градус в хвилину;

3 - від -10 до -190 градусів - зі швидкістю 7 градусів в хвилину.

Після цього контейнери переносять в біосейфи, де зберігають в рідкому азоті необмежений час до використання.

Операції кріоконсервування і розморожування безумовно відбиваються на характеристиках матеріалу. Тому в засобі, що заявляється дослідження характеристик клітинних суспензій виробляється після виконання обох цих процедур, то є вже після розморожування раніше кріоконсервованого матеріалу. Таким чином забезпечується контроль результатів роботи відносно якості кріоконсервування і розморожування.

Крім того, ми визнали доцільним використати один з відомих засобів кріоконсервування, що, певно, є одним з кращих по відношенню к нашому об'єкту, складатися з трьох стадій заморожування (Федотенков А.Г., Шишкін І.Д., Данілова Л.А. та ін. Кріоконсервування костного мозку при низьких температурах для клінічної мети. Проблеми гематології 1966, т.10, 12, стор.45-50).

Разом з тим, спеціальні роботи, проведені для оцінки впливу кріоконсервування, свідчать "cryopreservation did not adversely change the population, viability or immunological capacity of human Fetal liver transplantation" (Ek S., Ringden O., Markling L., Westgren M. Cryopreservation of fetal stem Cells. Bone Marrow transplantation, 11 Suppl, 1: 123, 1993).

Розморожування клітинних суспензій.

Розморожування клітинних суспензій виробляється безпосередньо перед їхнім застосуванням. Програма розморожування включає дві фази - швидку і повільну.

Швидку фазу разморозки матеріал минає шляхом приміщення контейнера у водяну лазню з температурою 40°C Цельсія до появи рухомої центральної льдинки в контейнері.

Далі слідує повільна фаза при звичайній кімнатній температурі, доки в контейнері витягнутому з води не зникне льдинка.

При кімнатній температурі розморожена клітинна суспензія зберігається до трансплантації не більш 2 годин.

Тестування функціонального стану кріоконсервованих клітинних суспензій.

Після приготування клітинної суспензії і її кріоконсервування контрольний контейнер, що містить 0.5мл клітинної суспензії, використовується для тестування функціонального стану матеріалу. Для цього він розморожується по програмі, по якій перед трансплантацією виробляється розморожування всіх інших контейнерів.

В розмороженої порції клітинної суспензії узвичаєними засобами визначається:

Загальна кількість ядровмістних клітин в 1мл (клітинним аналізатором або візуально під мікроскопом в рахувальній камері),

"Colony-forming units of the granulocyte/macrophage (CFU GM)" used in international scientific publications; this term means "an hematopoietic cell which is capable of producing a colony composed of granulocyte and macrophage progeny in semi-solid medium". КОЕ ГМ в 1мл (засобами клонування КОЕ в метилцелюлозі Hann V., Bodger M., Hoffbrand a. Development of pluripotent hematopoietic progenitor cells in the human fetus//Blood. - 1983. - Vol.62. - N.4 - P.118-123.)

"Colony-forming units of the granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, megakaryocyte (CFU GEMM)", meaning "a multipotential hematopoietic cell which is capable of producing a colony composed of granulocyte,

erythrocyte, monocyte/macrophage, and megakaryocyte progeny in semi-solid medium". KOE ГЕММ в 1мл (ті ж самі) (ibid).

"contents of early precursors of hemopoiesis", the authors propose to replace it with a commonly used English term "progenitor cells (CD34)". CD34 в 1мл (indirect immunofluorescent test with the panel of monodonal antibodies).

Саме на ці характеристики КС, отримані після розморожування, ми орієнтуємося при оцінці функціональної спроможності КС при виборі матеріалу для трансплантації.

Ми не проводимо прижиттєву забарвлення мазков КС для визначення відсотка пошкодження клітин т. до. При відпрацьованій технології приготування клітинних суспензій ці характеристики мало корелюють з клінічним ефектом і не відповідають на питання про функціональну повноцінність КС.

Тестування вірусної і бактеріальної стерильності.

3 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл клітинної суспензії, передвизначені для вірусологічного контролю даного ембріону. Клітинні суспензії для цих контейнерів готуються з шкіряно-м'язового лоскута цього же ембріону так же як клітинні суспензії з печінки і селезінки. Один контейнер досліджується на наявність вірусних інфекцій в лабораторії установи-виготівника клітинної суспензії, другий контейнер передається для паралельного дослідження державної контролюючої лабораторії. Третій контейнер залишається в кріосховищі для постійного зберігання з метою підтвердження в подальшому безпеки матеріалу, включаючи вірусологічну і бактеріальну. Матеріал, в якому хоча б в 1 контейнері виявляються віруси, знищується разом зі всім матеріалом від цього же ембріону шляхом зпалювання.

2 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл змивної води з лабораторного посуду і інструментів, передвизначені для дослідження бактеріальної стерильності. 1-й контейнер досліджується в лабораторії установи-виготівника, 2-й в державній контрольній лабораторії.

Пренатальна діагностика донора ембріонального матеріалу включає дослідження на сифіліс, віл-інфекцію, вірусні гепатити В, і С, токсоплазмоз, цитомегаловірус.

Фетальна діагностика матеріалу включає віл-інфекцію, вірусні гепатити В, і С, токсоплазмоз, цитомегаловірус, віруси рубелли, герпеса.

Повторна діагностика донора на наявність віл-інфекцію проводиться через 90-100 днів після аборту.

Властивості лікарського препарату.

1. Відновлення показників крові: відновлення кількості еритроцитів, тромбоцитів.
2. Поліпшення трофіки органів, поліпшення мікроциркуляції, досягнення повнокров'я стінки кишки.
3. Підсилення процесів регенерації, до швидкого заживлення виразкових дефектів, що приводяться і закриття їх епітеліальним пластом.
4. Підсилення кишкового бар'єру, зменшення явищ кишкової інтоксикації.
5. Поліпшення психоемоційного стану пацієнта, поява волі до видужання, нормалізація формули сна, поява апетиту, зростання обсягу рухів.
6. Нормалізація функціональної активності кишки: при діареї, зменшення частоти стільця, при запорах - поява регулярного стільця.

7. Запобігання розвитку сполучної тканини в результаті перитоніту і операційної травми.

Терапевтичне використання препарату. Показання до застосування лікарського препарату.

1. Хвороби кишечника, що супроводжуються анемією, тромбоцитопенією.
2. Ішемічні поразки кишечника (ішемічний коліт)
3. Атонія, гіпокінезія, спастичні стани кишків.
4. Виразкові і ерозивні процеси.
5. Явища інтоксикації: слабкість, пітливість, порушення дієздатності, зниження ваги (кахексія).
6. Астено-невротичний синдром, депресивні стани.

Шляхи введення до організму.

Клітинні суспензії, приготовані з ембріональної селезінки, найбільш часто вводяться внутрішньовенно, хоча можливий шлях внутрішньочеревний, внутрішньокістковий. А саме:

Лікарський препарат вводять внутрішньовенно крапельно в складі 100 мл ізотонічного розчину хлористого натрію зі швидкістю 20-40 крапель у хвилину.

Можливий внутрішньочеревний вступ (доцільно здебільшого в педіатричній практиці), коли клітинна суспензія розбавляється ізотонічним розчином хлористого натрію до обсягу 50мл і вводиться струйно внутрішньочеревно.

За наявності у хворих свіжого тромбоемболізму або гемофтальмопатії (крововиливу в тканини ока), а також при явищах гіперспленізму рекомендуємо клітинну суспензію вводити внутрішньокістково в грудину в обсязі до 50мл ізотонічного розчину хлористого натрію струйно. Обсяг вводимого препарату може бути від 0.5 до 8мл. При цьому число 2-х мілілітрових контейнерів, що використовуються, в яких зберігається препарат, може бути від 1 до 4-5.

Можливо спільне використання клітинних суспензій, для лікування захворювань кишечника, що рекомендувалися.

Вибір для введення обсягу клітинної суспензії/ що пропонується.

5.0мл це максимальний обсяг клітинної суспензії, що може бути отриманий з вхідного матеріалу при означених кількісних характеристиках. 0.5мл - це мінімальний обсяг, придатний для технічного обслуговування маніпуляцій трансплантації, оскільки частина клітин завжди залишається у флаконі, в трубках, в голках і та. ін. Тому контейнер завжди повинен містити препарат в означених межах обсягу.

Як вказувалося вище, звичайно в течії одного лікувального сеансу вводять 0.5-2.0мл клітинної суспензії.

Повторне введення препарату.

При повторному введенні препарату на наступних етапах лікування пацієнта більш прийнятним є використання клітинної суспензії з того же ембріону, що був використаний в перший раз. Саме для реалізації цієї особливості засобу приготування з ембріонального органу суспензія розливається в декілька контейнерів.

Ембріональна суспензія закріплюється за конкретним пацієнтом і зберігається -в кріобанці для наступного використання у цього ж пацієнта.

Автори відносять до позитивних якостей засобу ,що пропонується можливість досягнути повноцінного лікувального ефекту при застосуванні малих доз фетального матеріалу.

Протипоказання до застосування.

1. Васкуліт в гострій фазі. Капіляріт, флебіт, артрит. Трансплантація можлива після активного лікування і досягнення ремісії через 2-3 місяця.

2. Гострий тромбоз. Лікування можливо через 3-6 місяці.

3. Гемофтальмопатія. Лікування можливо тільки через 2-3 місяця після гемофтальмопатії.

4. Різко виражена гіпертензія малого кола, зв'язана з васкулітом, тромбозом, долевою пневмонією з розвитком гострого або підгострого *cor pulmonale*.

5. Мієлокарціноз.

6. Термінальні стадії захворювання (висловлена інтоксикація, глибокі розлади обміну речовин, важка загальна декомпенсація).

7. Наявність очагів хронічної інфекції. Необхідна їхня санація.

Препарат 3 - Стволові клітини гемопоєзу ембріональної печінки людини.

Приготування лікарського препарату.

Ембріони одержують при штучному припиненні вагітності у здорових, заздалегідь на наявність вірусних і гемічних інфекцій жінок , що обстежилися. Використають ембріони терміном від 5-12 тижнів гестації. В меті збереження цілісності ембріону аборт проводять вакуумекстракцією. Ембріон переносять в стерильну судину зі середою МакКоя 5А і антибіотиками. Подальша робота проводиться в стерильних умовах боксу. Ембріони переносять в стерильні чашки Петрі, заповнені середою МакКоя 5А з антибіотиками, де, обережно розчинивши черевну порожнину, витягають печінку, з якої окремо готують клітинну суспензію.

Кровотворний орган містять в гомогенізатори, розрізають на невеликі фрагменти і подрібнюють до отримання однорідної маси. Клітини змивають зі стінок і пестика гомогенізатора середою МакКоя 5А в мірні пробірки, пропускаючи через фільтр для переливу препаратів крові, а після цього через голки діаметру ,що зменшується.

Клітинну суспензію переносять в стерильний мірний циліндр на 5мл. Зразок розводять середою МакКоя 5А як 1:1.

Центрифугують біля 10 хвилин, приблизно 400хг (1500 оборотів у хв.), при температурі 40С.

Переносять пипеткою надосадочну рідину в поліпропіленову пробірку на 10мл, де знаходиться 3мл Ficoll-Nuраque. Ретельно на вагах врівноважують порожньою пробіркою.

Центрифугують 00хг (1500 оборотів у хв.) 30 хвилин, при температурі 40С.

Обережно знімають супернатант і поміщають його в стерильну пробірку. Розбавляють середою МакКоя 5А 1:1.

Знов центрифугують в течії 10хв., при 40С.

Надосадочну рідину переносять в контейнер, знов розводять 1:1.

Виробляють підрахунок клітин.

Приготування середи МакКоя 5А.

Готується наступним засобом:

Одна упаковка середи МакКоя 5А NaHCO_3 , в кількості 2.2гр. Обсяг доводять до одного літру, використовуючи двічі дистильовану воду, рН до 7.0-7.1. Розчин середи стерилізують з використанням 0.2мкм фільтру.

Для інкубування клітин в середу додають:

На 1 літр середи.

8мл МЕМ основних амінокислот

4мл МЕМ неосновних амінокислот

10мл МЕМ натрій піруват

4мл МЕМ вітаміни

10мл Пеніцилін-стрептомицин

15мл Сірчано/аспарагіно/глутамінова суміш.

Суміш серин/аспарагін/глутамін готується по наступній формулі:

L-аспарагін - 800мг

L-серин - 420мг

L-глутамін - 2 00мг.

Серин і аспарагін розчиняють в 450мг двічі дистильованої H_2O , обсяг доводять до 500мл і стерилізують через фільтр 0.2мкм. В цю стерильну суміш додають 200мг L-глутаміна і добре змішують. Зберігають при температурі -200С.

Частина приготованої суспензії переносять в поліетиленовий контейнер і герметично закривають. Вона буде використана для трансплантації нативної клітинної суспензії. Інша частина підлягає кріоконсервуванню. Клітинні суспензії розливають в поліетиленові контейнери в залежності від подальших мети обсягом від 0.5 до 2мл.

Приготування і використання нативних клітинних суспензій.

Нативні клітинні суспензії одержують після пропущення гомогената ембріональних тканин через фільтр для переливу препаратів крові і голки діаметру , що зменшується.

Нативні клітинні суспензії застосовують по тим же показанням і з допомогою тих же засобів вступу, що і кріоконсервовані клітинні суспензії. Нативні клітинні суспензії використовуються в течії 6-8 годин від моменту взяття матеріалу. Від моменту отримання і до моменту вступу нативних клітинних суспензій реципієнту вони зберігаються при температурі +5-7 градусів Цельсія.

Стислі терміни від моменту приготування до моменту вступу нативних клітинних суспензій зумовлюють

особливості їх тестування, а саме редуцированню програму тестування у порівнянні з кріоконсервованими клітинними суспензіями.

В нативних клітинних суспензіях виробляється підрахунок ядровмістних клітин в 1мл суспензії. Однак тестування нативних клітинних суспензій на КОЕ-ГМ ('colony-forming units of the granulocyte/macrophage (CFU GM)), КОЕ-ГЕММ ('colony-forming units of the granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, megakaryocyte (CFU GEMM)) і CD34 ("progenitor cells (CD34) ") перед трансплантацією не проводиться.

Програма вірусологічного і бактеріологічного контролю нативних клітинних суспензій також обмежена.

Дослідження на бактеріальну стерильність проводиться, однак його результати стають відомі після трансплантації. Тому ембріональний мозок в цьому випадку береться тільки з цілого ембріону зі розтинанням черепної порожнини в стерильних умовах. Такий матеріал вважається умовно бактеріологічно стерильним.

Фетальна діагностика на наявність віл-інфекції, вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції, вірусу краснухи і герпеса проводиться також ретроспективно. Тому нативні клітинні суспензії готуються тільки при повній пренатальній діагностиці донора, включаючи в себе дослідження крові донора на наявність сифілісу, віл-інфекції, вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції. При застосуванні нативних клітинних суспензій проводиться також дослідження крові реципієнта на наявність вірусних інфекцій: вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції, герпеса.

Незважаючи на те, що з застосуванням нативних клітинних суспензій зв'язувалася надія на отримання більш висловленого клінічного ефекту трансплантації, наш досвід використання нативних і кріоконсервованих клітинних суспензій дозволив прийти до укладення, що ефект застосування нативних клітинних суспензій не перевищує ефект кріоконсервованих клітинних суспензій. В нинішній час ми не схильні рекомендувати нативні клітинні суспензії для трансплантації і віддаємо перевагу кріоконсервованим клітинним суспензіям.

Кріоконсервування клітинних суспензій.

Після приготування клітинної суспензії, включаючи додання кріопротектора, отримані клітинні суспензії розливаються в поліетиленові контейнери з закручуваними пробками ємністю 2мл. В кожному контейнер міститься суспензія в кількості від 0.5 до 2мл.

В якості кріопротектора використовується діметилсульфоксид (ДМСО, хімічні чистий). ДМСО є добре відомим кріопротектором. Перед використанням ДМСО пропускається через мілішпоровий фільтр (діаметр шпору 0.22mm).

При легком перемішуванні клітинної суспензії в неї перед кріоконсервуванням додається по краплям рівний кількості КС обсяг свіжесрого робітничого розчину ДМСО (1.4моль на літр). Підсумкова концентрація ДМСО в отриманій КС складає 3-10%.

Відмиття препарату від ДМСО перед трансплантацією не вимагається. Його концентрація в контейнерах складає від 3 до 10%. При його розведенні в ізотонічному розчині хлористого натрію при вступі реципієнту вона відповідно падає в 50-100 раз і не є токсичною для організму.

Більш того, ДМСО є провідником біологічних активних речовин через біологічні бар'єри і мембрани, сприяючи біологічному ефекту трансплантації.

Для клітинної суспензії кожного ембріону обов'язково є 6 контрольних контейнерів наступного призначення:

1 контейнер, що містить 0.5мл клітинної суспензії, передвизначений для тестування функціональної спроможності КС після розморожування;

3 контейнери, що містять по 1.0 - 1.5мл клітинної суспензії, передвизначені для вірусологічного контролю даного ембріону. Клітинні суспензії для цих контейнерів готуються з шкіряно-м'язового лоскута цього ж ембріону так же як клітинні суспензії з мозку. Один контейнер досліджується на наявність вірусних інфекцій в лабораторії установи-виготівника клітинної суспензії, другий контейнер

передається для паралельного дослідження державної контролюючої лабораторії. Третій контейнер залишається в кріосховище для постійного зберігання з метою підтвердження в подальшому безпеки матеріалу, включаючи вірусологічну і бактеріальну. Матеріал, в якому хоча б в 1 контейнері виявляються віруси, знищується разом зі всім матеріалом від цього ж ембріону шляхом зпалювання.

2 контейнери, що містять по 1.0-1.5мл змивної води з лабораторного посуду і інструментів, передвизначені для дослідження бактеріальної стерильності. 1-й контейнер досліджується в лабораторії установи-виготівника, 2-й в державній контрольній лабораторії.

Всі контейнери, за винятком 2-х призначених для вірусологічного контролю і 2-х, призначених для бактеріологічного контролю, наражаються на програмному кріозаморожувачі до -196 градусів Цельсія. Контейнери містять в камеру програмного заморожувача вертикально. Заморожування проводять в 3 етапу:

1 - від температури приміщення до -4 градусів Цельсія зі швидкістю 1 градус Цельсія в хвилину;

2 - від -4 до -10 градусів - зі швидкістю 0.1 градус в хвилину;

3 - від -10 до -190 градусів - зі швидкістю 7 градусів в хвилину. Після цього контейнери переносять в біосейфи, де зберігають в рідкому азоті необмежений час до використання.

Операції кріоконсервування і розморожування безумовно відбиваються на характеристиках матеріалу. Тому в засобі, що заявляється дослідження характеристик клітинних суспензій виробляється після виконання обох цих процедур, то є вже після розморожування раніше кріоконсервованого матеріалу. Таким чином забезпечується контроль результатів роботи відносно якості кріоконсервування і розморожування.

Крім того, ми визнали доцільним використати один з відомих засобів кріоконсервування, що, певно, є одним з кращих по відношенню до нашого об'єкту, складеться з трьох стадій заморожування (Федотенков А.Г., Шишкін І.Д., Данілова Л.А. та ін. Кріоконсервування костного мозку при низьких температурах для клінічної мети. Проблеми гематології 1966, т.10, 12, стор.45-50).

Разом з тим, спеціальні роботи, проведені для оцінки впливу кріоконсервування, свідчать "cryopreservation did not adversely change the population, viability or immunological capacity of human Fetal liver transplantation" (Ek S., Ringden O., Markling L., Westgren M. Cryopreservation of fetal stem Cells. Bone Marrow transplantation, 11

Suppl, 1: 123, 1993).

Розморожування клітинних суспензій.

Розморожування клітинних суспензій виробляється безпосередньо перед їхнім застосуванням. Програма розморожування включає дві фази - швидку і повільну.

Швидку фазу розморозки матеріал минає шляхом приміщення контейнера у водяну лазню з температурою 40°С. Цельсія до появи рухомої центральної льодинки в контейнері.

Далі слідує повільна фаза при звичайній кімнатній температурі, доки в контейнері витягнутому з води не зникне льодинка.

При кімнатній температурі розморожена клітинна суспензія зберігається до трансплантації не більш 2 годин.

Тестування функціонального стану кріоконсервованих клітинних суспензій.

Після приготування клітинної суспензії і її кріоконсервування контрольний контейнер, що містить 0.5мл клітинної суспензії, використовується для тестування функціонального стану матеріалу. Для цього він розморожується по програмі, по якій перед трансплантацією виробляється розморожування всіх інших контейнерів.

В розмороженої порції клітинної суспензії узвичаєними засобами визначається:

Загальна кількість ядровмістних клітин в 1мл (клітинним аналізатором або візуально під мікроскопом в рахувальній камері),

"Colony-forming units of the granulocyte/macrophage (CFU GM)" used in international scientific publications; this term means "an hematopoietic cell which is capable of producing a colony composed of granulocyte and macrophage progeny in semi-solid medium". КОЕ ГМ в 1мл (засобами клонування КОЕ в метилцелюлозі Hann V., Bodger M., Hoffbrand a. Development of pluripotent hematopoietic progenitor cells in the human fetus//Blood. - 1983. - Vol.62. - N.4 - P.118-123.)

"Colony-forming units of the granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, megakaryocyte (CFU GEMM)", meaning "a multipotential hematopoietic cell which is capable of producing a colony composed of granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, and megakaryocyte progeny in semi-solid medium". КОЕ ГЕММ в 1мл (тіж самі) (ibid).

"contents of early precursors of hemopoiesis", the authors propose to replace it with a commonly used English term "progenitor cells (CD34)". CD34 в 1мл (indirect immunofluorescent test with the panel of monodonal antibodies).

Саме на ці характеристики КС, отримані після розморожування, ми орієнтуємося при оцінці функціональної спроможності КС при виборі матеріалу для трансплантації.

Ми не проводимо прижиттєву забарвлення мазков КС для визначення відсотка пошкодження клітин т. до. При відпрацьованій технології приготування клітинних суспензій ці характеристики мало корелюють з клінічним ефектом і не відповідають на питання про функціональну повноцінність КС.

Тестування вірусної і бактеріальної стерильності.

3 контейнера, що містять по 1.0 - 1.5мл клітинної суспензії, передвизначені для вірусологічного контролю даного ембріону. Клітинні суспензії для цих контейнерів готуються з шкіряно-м'язового лоскута цього ж ембріону так же як клітинні суспензії з мозку. Один контейнер досліджується на наявність вірусних інфекцій в лабораторії установи-виготівника клітинної суспензії, другий контейнер

передається для паралельного дослідження державної контролюючої лабораторії. Третій контейнер залишається в кріосховище для постійного зберігання з метою підтвердження в подальшому безпеки матеріалу, включаючи вірусологічну і бактеріальну). Матеріал, в якому хоча б в 1 контейнері виявляються віруси, знищується разом зі всім матеріалом від цього ж ембріону шляхом зпалювання.

2 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл змивної води з лабораторного посуду і інструментів, передвизначені для дослідження бактеріальної стерильності. 1-й контейнер досліджується в лабораторії установи-виготівника, 2-й в державній контрольній лабораторії.

Пренатальна діагностика донора ембріонального матеріалу включає дослідження на сифіліс, віл-інфекцію, вірусні гепатити В, і С, токсоплазмоз, цитомегаловірус.

Фетальна діагностика матеріалу включає віл-інфекцію, вірусні гепатити В, і С, токсоплазмоз, цитомегаловірус, віруси рубелли, герпеса.

Повторна діагностика донора на наявність віл-інфекції проводиться через 90-100 днів після абортів.

Властивості лікарського препарату.

1. Відновлення показників імунітету: загальної кількості лімфоцитів, субпопуляцій лімфоцитів Т4, Т8, NK клітин, В- лімфоцитів, корекція їхні співвідношення;

2. Зняття явищ іммунологической атаки, аутоімунного поразки, імунной агресії, феномену супресії.

3. Формування протипухлинного імунітету.

4. Відновлення показників крові: відновлення кількості лейкоцитів, еритроцитів, тромбоцитів.

5. Підсилення процесів регенерації, до швидкого заживленню язвенних дефектів, що приводяться і закриття їх епітеліальним пластом.

6. Підсилення кишечного бар'єру, зменшення явищ кишечної інтоксикації, зменшення або зникнення пропасниці.

7. Запобігання розвитку сполучної тканини в результаті перитоніта і операційної травми.

Терапевтичне використання препарату. Показання до застосування лікарського препарату.

1. Імунні і аутоімунні, алергические поразки кишечника.

2. Хвороби кишечника, що супроводжуються глибокою лейкопенией, агранулоцитозом, анемією, тромбоцитопенією.

3. Кишечний синдром при цитостатичній хворобі, включаючи променеві поразки.

4. Ішемічні поразки кишечника (ішемічний коліт).

5. Пухлини кишечника до і після оперативного лікування, до і після курсів хіміо - і рентгенотерапії.

6. Виразкові і ерозивні процеси.
7. Розвиток сполучної тканини в стінці кишки.

Шляхи введення до організму.

Клітинні суспензії, приготовані з ембріонального мозку, найбільш часто вводяться внутрішньовенно, хоча можливий шлях внутрішньочеревний, внутрішньокістковий. А саме:

Лікарський препарат вводять внутрішньовенно крапельно у складі 100мл ізотонічного розчину хлористого натрію зі швидкістю 20-40 крапель в хвилину.

Можливо внутрішньочеревно вступ (доцільно здебільшого в педіатричній практиці), коли клітинна суспензія розбавляється ізотонічним розчином хлористого натрію до обсягу 50мл і вводиться струйно внутрішньочеревно.

За наявності у хворих свіжого тромбоутворення або гемофтальмопатії (крововиливу в тканини ока), а також при явищах гіперспленізму рекомендуємо клітинну суспензію вводити внутрішньокістково в грудину в обсязі до 50мл ізотонічного розчину хлористого натрію струйно. Обсяг вводимого препарату може бути від 0.5 до 8мл. При цьому число 2-х мілілітрових контейнерів, що використовуються, в яких зберігається препарат, може бути від 1 до 4-5.

Можливо спільне використання клітинних суспензій, для лікування захворювань кишечника.

Вибір для вступу обсягу, що пропонується клітинній суспензії.

5.0мл - це максимальний обсяг клітинної суспензії, що може бути отриманий з вхідного матеріала при означених кількісних характеристиках; 0.5мл - це мінімальний обсяг, придатний для технічного обслуговування маніпуляції трансплантації, оскільки частина клітин завжди залишається в флаконі, в трубках, в голках і т. ін. Тому контейнер завжди повинен містити препарат в означених межах обсягу.

Як вказувалось вище, звичайно в течії одного лікувального сеансу вводять 0.5-2.0мл клітинній суспензії.

Повторне введення препарату.

При повторному введенні препарату на наступних етапах лікування пацієнта більш прийнятним є використання клітинній суспензії з того ж ембріону, що був використаний в перший раз. Саме для реалізації цієї особливості засобу приготування з ембріонального органу суспензія розливається в декілька контейнерів. Ембріональна суспензія закріплюється за конкретним пацієнтом і зберігається в кріобанці для наступного використання у цього ж пацієнта.

Автори відносять до позитивних якостей засобу, що пропонується можливість досягнути повноцінного лікувального ефекту при застосуванні малих доз фетального матеріалу.

Протипоказання до застосування.

1. Васкуліт в гострій фазі. Капіляріт, флебіт, артрит. Трансплантація можлива після активного лікування і досягнення ремісії через 2-3 місяця.

2. Гострий тромбоз. Лікування можливо через 3-6 місяці.

3. Гемофтальмопатія. Лікування можливо тільки через 2-3 місяця після розвитку гемофтальмопатії.

4. Різко виражена гіпертензія малого кола, зв'язана з васкулітом, тромбозом, долевий пневмонією з розвитком гострого або підгострого *cor pulmonale*.

5. Мієлокарциноз.

6. Термінальні стадії захворювання (висловлена інтоксикація, глибокі розлади обміну речовин, важка загальна декомпенсація).

7. Наявність очагів хронічної інфекції. Необхідна їх санация.

Препарат 4 - Стволові клітини гемопоєзу ембріональної селезінки людини. Приготування лікарського препарату.

Ембріони одержують при штучному припиненні вагітності у здорових жінок, заздалегідь обстежених на наявність вірусних і гемічних інфекцій. Використають ембріони терміном від 5-12 тижнів гестації. В меті збереження цілісності ембріону аборт проводять вакуумекстракції. Ембріон переносять в стерильну судину зі середою МакКоя 5А і антибіотиками. Подальша робота проводиться в стерильних умовах боксу. Ембріони переносять в стерильні чашки Петрі, заповнені середою МакКоя 5А з антибіотиками, де, обережно розчинивши черевну полость, витягають селезенку, з якої окремо приготавлюють клітинну суспензію.

Кровотворний орган містять в гомогенізатори, розрізають на невеликі фрагменти і подрібнюють до отримання однорідної маси. Клітини змивають зі стінок і пестика гомогенізатора середою МакКоя 5А в мерные пробірки, пропускаючи через фільтр для переливу препаратів крові, а після цього через голки діаметру, що зменшується.

Клітинну суспензію переносять в стерильний мерный циліндр на 5мл. Зразок розводять середою МакКоя 5А як 1:1.

Центрифугують біля 10 хвилин, приблизно 400хg (1500 оборотів в хв.), при температурі 40°C.

Переносять пипеткой надосадоchnу рідину в поліпропіленову пробірку на 10мл, де знаходиться 3мл Ficoll-Huраque. Ретельно на вагах врівноважують порожній пробіркою.

Центрифугируют 400хg (1500 оборотів в мин.) ·30 хвилин, при температурі 40°C.

Акуратно знімають супернатант і поміщають його в стерильну пробірку. Розбавляють середою МакКоя 5А 1:1.

Знов центрифугируют в течії 10хв., при 40°C.

Надосадоchnу рідину переносять в контейнер, знов розводять 1:1.

Виробляють підрахунок клітин.

Приготування середи МакКоя 5А.

Готується наступним засобом:

Одна упаковка середи МакКоя 5А NaHCO₃, в кількості 2.2гр. Обсяг доводять до одного літру, використовуючи двічі дистильовану воду, рН до 7.0-7.1. Розчин середи стерилізують з використанням 0.2мкм фільтру.

Для інкубування клітин в середу додають:

На 1 літр середн.

8мл МЕМ основних амінокислот

4мл МЕМ неосновних амінокислот

10мл МЕМ натрий пируват

4мл МЕМ вітаміни

10мл Пеніцилін-стрептоміцин

15мл Сірчано/аспарагину/глутамінова суміш.

Суміш серин/аспарагину/глутаміну готується по наступній формулі:

L-аспарагін - 800мг

L-серин - 420мг

L-глутамін - 200мг.

Серин і аспарагін розчиняють в 450мг двічі дистильовані Н₂О, обсяг доводять до 500мл і стерилізують через фільтр 0.2мкм. В цю стерильну суміш додають 200мг L-глутаміна і добре змішують. Зберігають при температурі -200°C.

Частина приготованої суспензії переносять в поліетиленовий контейнер і герметично закривають. Вона буде використана для трансплантації нативної клітинної суспензії. Інша частина підлягає кріоконсервуванню. Клітинні суспензії розливають в поліетиленові контейнери в залежності від подальших мети обсягом від 0.5 до 2мл. Приготування і використання нативних клітинних суспензій.

Нативні клітинні суспензії одержують після пропущення гомогената ембріональних тканин через фільтр для переливу препаратів крові і голки діаметру, що зменшується.

Нативні клітинні суспензії застосовують по тим же показанням і з допомогою тих же засобів вступу, що і кріоконсервовані клітинні суспензії. Нативні клітинні суспензії використовуються в течію 6-8 годин від моменту взяття матеріалу. Від моменту отримання і до моменту вступу нативних клітинних суспензій реципієнту вони храняться при температурі +5-7 градусів Цельсія.

Стислі терміни від моменту приготування до моменту вступу нативних клітинних суспензій зумовлюють особливості їх тестування, а саме редуційовану програму тестування у порівнянні з кріоконсервованими клітинними суспензіями.

В нативних клітинних суспензіях виробляється підрахунок ядровмістних клітин в 1мл суспензії. Однак тестування нативних клітинних суспензій на КОЕ-ГМ ('colony-forming units of the granulocyte/macrophage (CFU GM)'), КОЕ-ГЕММ ('colony-forming units of the granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, megakaryocyte (CFU GEMM)') і CD34 ("progenitor cells (CD34) ") перед трансплантацією не проводиться.

Програма вірусологічного і бактеріологічного контролю нативних клітинних суспензій також обмежена.

Дослідження на бактеріальну стерильність проводиться, однак його результати стають відомі після трансплантації. Тому ембріональний мозок в цьому випадку береться тільки з цілого ембріону зі розтинанням черепної порожнини в стерильних умовах. Такий матеріал вважається умовно бактеріологічно стерильним.

Фетальна діагностика на наявність віл-інфекції, вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції, вірусу краснухи і герпеса проводиться також ретроспективно. Тому нативні клітинні суспензії готуються тільки при повній пренатальній діагностиці донора, включаючи в себе дослідження крові донора на наявність сифілісу, віл-інфекції, вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції. При застосуванні нативних клітинних суспензій проводиться також дослідження крові реципієнта на наявність вірусних інфекцій: вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції, герпеса.

Незважаючи на те, що з застосуванням нативних клітинних суспензій зв'язувалася надія отримання більш вираженого клінічного ефекту трансплантації, наш досвід використання нативних і кріоконсервованих клітинних суспензій дозволив прийти до укладення, що ефект застосування нативних клітинних суспензій не перевищує ефект кріоконсервованих клітинних суспензій. В нинішній час ми не схильні рекомендувати нативні клітинні суспензії для трансплантації і віддаємо перевагу кріоконсервованим клітинним суспензіям.

Кріоконсервування клітинних суспензій.

Після приготування клітинних суспензій, включаючи додання кріопротектора, отримані клітинні суспензії розливають в поліетиленові контейнери з закручуваними пробками ємністю 2мл. В кожний контейнер міститься суспензія в кількості від 0.5 до 2мл.

В якості кріопротектору використовується диметилсульфоксид (ДМСО, хімічно чистий). ДМСО є добре відомим кріопротектором. Перед використанням ДМСО пропускається через миллиметровий фільтр (діаметр пор 0.22mm).

При легкому перемішуванні клітинної суспензії в неї перед кріоконсервуванням додається по краплям рівний кількості КС обсяг свіжесрого робітничого розчину ДМСО (1.4моль на літр). Підсумкова концентрація ДМСО в отриманій КС складає 3-10%.

Відмиття препарату від ДМСО перед трансплантацією не вимагається. Його концентрація в контейнерах складає від 3 до 10%. При його розведенні в ізотоническом розчині хлористого натрію при вступі реципієнту вона відповідно падає в 50-100 раз і не є токсичною для організму.

Більш того, ДМСО є провідником біологічних активних речовин через біологічні бар'єри і мембрани, сприяючи біологічному ефекту трансплантації.

Для клітинної суспензії кожного ембріону обов'язково є 6 контрольних контейнерів наступного призначення:

1 контейнер, що містить 0.5мл клітинної суспензії, передвизначений для тестування функціональної спроможності КС після розморожування;

3 контейнери, що містять по 1.0 - 1.5мл клітинної суспензії, передвизначені для вірусологічного контролю даного ембріону. Клітинні суспензії для цих контейнерів готуються з шкіряно-м'язового лоскута цього же ембріону так же як клітинні суспензії з мозку. Один контейнер досліджується на наявність вірусних інфекцій в лабораторії установи-виготівника клітинної суспензії, другий контейнер

передається для паралельного дослідження державної контролюючої лабораторії. Третій контейнер залишається в кріосховищі для постійного зберігання з метою підтвердження в подальшому безпеки матеріалу, включаючи вірусологічну і бактеріальну. Матеріал, в якому хоча б в 1 контейнері виявляються віруси, знищується разом зі всім матеріалом від цього ж ембріону шляхом зпалювання.

2 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл змивної води з лабораторного посуду і інструментів, передвизначені для дослідження бактеріальної стерильності. 1-й контейнер досліджується в лабораторії установи-виготівника, 2-й в державній контрольній лабораторії.

Всі контейнери, за винятком 2-х призначених для вірусологічного контролю і 2-х, призначених для бактеріологічного контролю, наражаються на програмний кріозаморожуванню до -196 градусів Цельсія. Контейнери помещають в камеру програмного заморожувача вертикально. Замораживание проводять в 3 етапу:

1 - від температури приміщення до -4 градусів Цельсія зі швидкістю 1 градус Цельсія в хвилину;

2 – від -4 до -10 градусів - зі швидкістю 0.1 градус в хвилину;

3 – від -10 до -190 градусів - зі швидкістю 7 градусів в хвилину. Після цього контейнери переносять в біосейфи, де зберігають в рідкому азоті необмежений час до використання.

Операції криоконсервування і розморожування безумовно відбиваються на характеристиках матеріалу. Тому в засобі, що заявляється дослідження характеристик клітинних суспензій виробляється після виконання обох цих процедур, те є вже після розморожування раніше криоконсервованого матеріалу. Таким чином забезпечується контроль результатів роботи відносно якості криоконсервування і розморожування.

Крім того, ми визнали доцільним використати один з відомих засобів криоконсервування, що, певно, є одним з кращих по відношенню з нашому об'єкту, складатися з трьох стадій заморожування (Федотенков А.Г., Шишкин І.Д., Данилова Л.А. та ін. Криоконсервування костного мозку при низьких температурах для клінічної мети. Проблеми гематології 1966, т.10, 12, стор.45-50).

Разом з тим, спеціальні роботи, проведені для оцінки впливу криоконсервування, свідчать "cryopreservation did not adversely change the population, viability or immunological capacity of human Fetal liver transplantation" (Ek S., Ringden O., Markling L., Westgren M. Cryopreservation of fetal stem Cells. Bone Marrow transplantation, 11 Suppl, 1: 123, 1993).

Розморожування клітинних суспензій.

Розморожування клітинних суспензій виробляється безпосередньо перед їхнім застосуванням. Програма розморожування включає дві фази - швидко і повільно.

Швидко фазу розморозки матеріал мінає шляхом приміщення контейнера в водяну лазню з температурою 40гр. Цельсія до появи рухомої центральної льодинки в контейнері.

Далі слідує повільна фаза при звичайній кімнатній температурі, доки в контейнері витягнутому з води не зникне льодинка.

При кімнатній температурі розморожена клітинна суспензія зберігатися до трансплантації не більш 2 годин.

Тестування функціонального стану криоконсервованих клітинних суспензій.

Після приготування клітинної суспензії і її криоконсервування контрольний контейнер, що містить 0.5мл клітинної суспензії, використовується для тестування функціонального стану матеріалу. Для цього він розморожується по програмі, по якій перед трансплантацією виробляється розморожування всіх інших контейнерів.

В розмороженої порції клітинної суспензії узвичаєними засобами визначається:

Загальна кількість ядровмістних клітин в 1мл (клітинним аналізатором або візуально під мікроскопом в рахувальній камері),

"Colony-forming units of the granulocyte/macrophage (CFU GM)" used in international scientific publications; this term means "an hematopoietic cell which is capable of producing a colony composed of granulocyte and macrophage progeny in semi-solid medium". КОЕ ГМ в 1мл (засобами клонування КОЕ в метилцеллюлозе Hann V., Bodger M., Hoffbrand a. Development of pluripotent hematopoietic progenitor cells in the human fetus//Blood. - 1983. - Vol.62. - N.4 - P.118-123.)

"Colony-forming units of the granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, megakaryocyte (CFU GEMM)", meaning "a multipotential hematopoietic cell which is capable of producing a colony composed of granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, and megakaryocyte progeny in semi-solid medium". КОЕ GEMM в 1мл (засобами клонування КОЕ в метилцеллюлозе Hann V., Bodger M., Hoffbrand a. Development of pluripotent hematopoietic progenitor cells in the human fetus//Blood. - 1983. - Vol.62. - N.4 - P.118-123.)(теж same) (ibid).

"contents of early precursors of hemopoiesis", the authors propose to replace it with a commonly used English term "progenitor cells (CD34)". CD34 в 1мл (indirect immunofluorescent test with the panel of monodonal antibodies).

Саме на ці характеристики КС, отримані після розморожування, ми орієнтуємося при оцінці функціональної спроможності КС при виборі матеріалу для трансплантації.

Ми не проводимо прижиттєве забарвлення мазок КС для визначення відсотка пошкодження клітин т. до. При відпрацьованій технології приготування клітинних суспензій ці характеристики мало корелюють з клінічним ефектом і не відповідають на питання про функціональну повноцінність КС.

Тестування вірусної і бактеріальної стерильності.

3 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл клітинної суспензії, передвизначені для вірусологічного контролю даного ембріону. Клітинні суспензії для цих контейнерів готується з шкіряно-м'язового лоскута цього ж ембріону так же як клітинні суспензії з мозку. Один контейнер досліджується на наявність вірусних інфекцій в лабораторії установи-виготівника клітинної суспензії, другий контейнер передається для паралельного дослідження державної контролюючої лабораторії. Третій контейнер залишається в кріосховищі для постійного зберігання з метою підтвердження в подальшому безпеки матеріалу, включаючи вірусологічну і бактеріальну. Матеріал, в якому хоча б в 1 контейнері виявляються віруси, знищується разом зі всім

матеріалом від цього же ембріону шляхом зпалювання.

2 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл змивної води з лабораторного посуду і інструментів, передвизначені для дослідження бактеріальної стерильності. 1-й контейнер досліджується в лабораторії установи-виготівника, 2-й в державній контрольній лабораторії.

Пренатальна діагностика донора ембріонального матеріалу включає дослідження на сифіліс, ВІЛ-інфекцію, вірусні гепатити В, і С, токсоплазмоз, цитомегаловірус.

Фетальна діагностика матеріалу включає віл-інфекцію, вірусні гепатити В, і С, токсоплазмоз, цитомегаловірус, віруси рубелли, герпеса.

Повторна діагностика донора на наявність віл-інфекції проводиться через 90-100 днів після абортів.

Властивості лікарського препарату.

1. Відновлення показників імунітету: загальної кількості лімфоцитів, субпопуляцій лімфоцитів Т4, Т8, NK клітин, В-лімфоцитів, корегування їх співвідношення.

2. Зняття явищ імунологічної атаки, аутоімунної поразки, імунної агресії, феномену супресії.

3. Формування протипухлинного імунітету.

4. Відновлення показників крові: відновлення кількості лейкоцитів, еритроцитів, тромбоцитів.

5. Підсилення процесів регенерації, до швидкого заживленню язвенних дефектів, що приводяться і закриття їх епітеліальним пластом.

6. Підсилення кишечного бар'єру, зменшення явищ кишечної інтоксикації, зменшення або зникнення пропасниці.

7. Запобігання розвитку сполучної тканини в результаті перитоніта і операційної травми.

Терапевтичне використання препарату. Показання до застосування лікарського препарату.

1. Імунні і аутоімунні, алергічні поразки кишечника.

2. Хвороби кишечника, що супроводжуються глибокою лейкопенією, агранулоцитозом, анемією, тромбоцитопенією.

3. Кишковий синдром при цитостатичній хворобі, включаючи променеві поразки.

4. Ішемічні поразки кишечника (ішемічний коліт)

5. Пухлини кишечника до і після оперативного лікування, до і після курсів хіміо - і рентгенотерапії.

6. Виразковий і ерозивний процеси.

7. Розвиток сполучної тканини в стінці кишки.

8. Лікарський препарат 4 може використовуватися для продовження лікування, початого препаратом 3, враховуючи близькість їхніх властивостей.

Шляхи введення до організму.

Клітинні суспензії, приготовані з ембріонального мозку, найбільш часто вводяться внутрішньовенно, хоча можливий шлях внутрішньочеревний, внутрішньокістковий. А саме:

Лікарський препарат вводять внутрішньовенно крапельно в складі 100мл ізотонічного розчину хлористого натрію зі швидкістю 20-40 краплин в хвилину.

Можливо внутрішньочеревне введення (доцільно здебільшого в педіатричній практиці), коли клітинна суспензія розбавляється ізотонічним розчином хлористого натрію до обсягу 50мл і вводиться струйно внутрішньочеревно.

За наявності у хворих свіжого тромбоутворення або гемофтальмопатії (крововиливу в тканини ока), а також при явищах гіперспленизму рекомендуємо клітинну суспензію вводити внутрікiстно в грудину в обсязі до 50мл ізотонічного розчину хлористого натрію струйно. Обсяг вводимого препарату може бути від 0.5 до 8мл. При цьому число 2-х мілілітрових контейнерів, що використовуються, в яких зберігається препарат, може бути від 1 до 4-5.

Можливо спільне використання клітинних суспензій, для лікування захворювань кишечника.

Вибір для введення обсягу, що пропонується клітинної суспензії.

5.0мл це максимальний обсяг клітинної суспензії, що може бути отриманий з вхідного матеріалу при означених кількісних характеристиках; 0.5мл - це мінімальний обсяг, придатний для технічного обслуговування маніпуляцій трансплантації, оскільки частина клітин завжди залишається в флаконі, в трубках, в голках і т. ін. Тому контейнер завжди повинен містити препарат в означених межах обсягу.

Як вказувалося вище, звичайно в течію одного лікувального сеансу вводять 0.5-2.0мл клітинної суспензії.

Повторне введення препарату.

При повторному введенні препарату на наступних етапах лікування пацієнта більш прийнятним є використання клітинної суспензії з того же ембріону, що був використаний в перший раз. Саме для реалізації цієї особливості засобу приготована з ембріонального органу суспензія розливається в декілька контейнерів. Ембріональна суспензія закріплюється за конкретним пацієнтом і зберігається в кріобанці для наступного використання у цього же пацієнта.

Автори відносять до позитивних якостей засобу, що пропонується, можливість досягнути повноцінного лікувального ефекту при застосуванні малих доз фетального матеріалу.

Протипоказання до застосування.

1. Васкуліт в гострій фазі. Капілярит, флебит, артрит. Трансплантація можлива після активного лікування і досягнення ремісії через 2-3 місяця.

2. Гострий тромбоз. Лікування можливо через 3-6 місяці.

3. Гемофтальмопатія. Лікування можливо тільки через 2-3 місяця після розвитку гемофтальмопатії.

4. Різко виражена гіпертензія малого кола, зв'язана з васкулітом, тромбозом, долевою пневмонією з розвитком гострого або підгострого *cor pulmonale*.

5. Мієлокарциноз.

6. Термінальні стадії захворювання (висловлена інтоксикація, глибокі розлади обміну речовин, важка загальна декомпенсація).

7. Наявність очагів хронічної інфекції. Необхідна їхня санація.

Препарат 5 - Гелатоцити ембріональної печінки людини. Приготування лікарського препарату.

Ембріони одержують при штучному припиненні вагітності у здорових жінок, що заздалегідь обстежилися на наявність вірусних і гемічних інфекцій. Використають ембріони терміном від 5-14 тижнів гестації. В меті збереження цілісності ембріону аборт проводять вакуумекстракцією. Ембріон переносять в стерильну судину зі середою МакКоя 5А і антибіотиками. Подальша робота проводиться в стерильних умовах боксу. Ембріони переносять в стерильні чашки Петрі, заповнені середою МакКоя 5А з антибіотиками, де, обережно розчинивши черевну порожнину, витягають печінку, з якої окремо готують клітинні суспензії.

Печінку містять в гомогенізатор, розрізають на невеликі фрагменти і подрібнюють до отримання однорідної маси. Клітини змивають зі стінок і пестика гомогенізатора середою МакКоя 5А в мірні пробірки, пропускаючи через фільтр для переливу препаратів крові, а після цього через голки діаметру, що зменшується.

Клітинну суспензію переносять в стерильний мірний циліндр на 5мл. Зразок розводять середою МакКоя 5А як 1:1.

Центрифугують біля 10 хвилин, приблизно 400хг (1500 оборотів в хв.), при температурі 40°C.

Надосадочна рідина використовується далі для виділення стовбурових клітин гемопоєзу.

Ембріональні гепатоцити знаходяться в осадку.

Після акуратного зняття надосадочної рідини, до осадку додають 5мл середи МакКоя 5А. Збовтують.

Центрифугують 10 хвилин, 400хг, при температурі 40°C.

Зливають надосадочну рідину. До осадку додають середу, складатися з наступних компонентів:

RPMI 1640

Глютамін (2Mm)

Пеніцилін-стрептоміцин (10мл на літр при 1000ед. На мл)

10% ембріональної бичачої сироватки (інактивованої підігрівом).

Осадок переносять в пластикові пробірки величиною від 2 до 10мл і містять в інкубатор з атмосферою 5% CO₂, звичайним O₂ на 3-5 днів, при температурі 40°C. Через 5 днів центрифугують 10хв., при 500хг; надосадочну рідину удаляють. Осадок розбавляють середою МакКоя 5А - 3мл.

Підраховують кількість клітин і розводять середою МакКоя так, щоб концентрація клітин в пробірці була 10⁶/мл.

В якості кріопротектора використовують диметилсульфоксид (ДМСО, хімічно чистий). Перед використанням ДМСО пропускають через мілішпоровий фільтр (з діаметром пор 0.22мкм.). При легкому перемішуванні клітинної суспензії додають по краплинам рівний обсяг робітничого розчину ДМСО, досягаючи концентрації в більш прийнятному варіанті 5%.

Клітинні суспензії розливають в поліетиленові контейнери, в залежності від подальших мети обсягом, від 2.0 до 10.0мл.

Приготування і використання нативних клітинних суспензій.

Нативні клітинні суспензії одержують після пропущення гомогената ембріональних тканин через фільтр для переливу препаратів крові і голки діаметру, що зменшується.

Нативні клітинні суспензії застосовують по тим же показанням і з допомогою тих же засобів вступу, що і кріоконсервовані клітинні суспензії. Нативні клітинні суспензії використовуються в течію 6-8 годин від моменту взяття матеріалу. Від моменту отримання і до моменту вступу нативних клітинних суспензій реципієнту вони зберігаються при температурі +5-7 градусів Цельсія.

Стислі терміни від моменту приготування до моменту вступу нативних клітинних суспензій зумовлюють особливості їх тестування, а саме редуційовану програму тестування у порівнянні з кріоконсервованими клітинними суспензіями.

В нативних клітинних суспензіях виробляється підрахунок ядровмістних клітин в 1мл суспензії. Перевіряють їх життєздатність приготуванням мазка і забарвленням трипановою синькою.

Програма вірусологічного і бактеріологічного контролю нативних клітинних суспензій обмежена.

Дослідження на бактеріальну стерильність проводиться, однак його результати стають відомі після трансплантації. Тому ембріональна печінка в цьому випадку береться тільки з цілого ембріону зі розтинанням черевної порожнини в стерильних умовах. Такий матеріал вважається умовно бактеріологічно стерильним.

Фетальна діагностика на наявність віл-інфекції, вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції, вірусу краснухи і герпеса проводиться також ретроспективно. Тому нативні клітинні суспензії готуються тільки при повній пренатальній діагностиці донора, включаючи в себе дослідження крові донора на наявність сифілісу, віл-інфекції, вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції. При застосуванні нативних клітинних суспензій проводиться також дослідження крові реципієнта на наявність вірусних інфекцій: вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції, герпеса.

Незважаючи на те, що з застосуванням нативних клітинних суспензій зв'язувалася надія отримання більш висловленого клінічного ефекту трансплантації, наш досвід використання нативних і кріоконсервованих клітинних суспензій дозволив прийти до укладення, що ефект застосування нативних клітинних суспензій не перевищує ефект кріоконсервованих клітинних суспензій. В нинішній час ми не схильні рекомендувати нативні клітинні суспензії для трансплантації і віддаємо перевагу кріоконсервованим клітинним суспензіям.

Кріоконсервування клітинних суспензій.

Після приготування клітинної суспензії, включаючи додання кріопротектора, отримані клітинні суспензії розливають в поліетиленові контейнери з закручуваними пробками ємністю 2мл. В кожний контейнер міститься суспензія в кількості від 0.5 до 2мл.

В якості кріопротектора використовується диметилсульфоксид (ДМСО, хімічно чистий). ДМСО є добре відомим кріопротектором. Перед використанням ДМСО пропускається через мілішпоровий фільтр (діаметр пор 0.22mm).

При легкому змішуванні клітинної суспензії в неї перед кріоконсервуванням додається по краплинам рівної кількості КС обсяг свіжесробленого робітничого розчину ДМСО (1.4моль на літр). Підсумкова концентрація ДМСО в отриманій КС складає 3-10%.

Відмиття препарату від ДМСО перед трансплантацією не вимагається. Його концентрація в контейнерах складає від 3 до 10%. При його розведенні в ізотоническом розчині хлористого натрію при вступі реципієнту вона відповідно падає в 50-100 раз і не є токсичною для організму.

Більш того, ДМСО є провідником біологічних активних речовин через біологічні бар'єри і мембрани, сприяючи біологічному ефекту трансплантації.

Для клітинної суспензії кожного ембріону обов'язково є 6 контрольних контейнерів наступного призначення:

1 контейнер, що містить 0.5мл клітинної суспензії, передвизначений для тестування функціональної спроможності КС після розморожування;

3 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл клітинної суспензії, передвизначені для вірусологічного контролю даного ембріону. Клітинні суспензії для цих контейнерів готується з шкіряно-м'язового лоскута цього же ембріону так же як клітинні суспензії з мозку. Один контейнер досліджується на наявність вірусних інфекцій в лабораторії установи-виготівника клітинної суспензії, другий контейнер передається для паралельного дослідження державної контролюючої лабораторії. Третій контейнер залишається в кріосховище для постійного зберігання з метою підтвердження в подальшому безпеці матеріалу, включаючи вірусологічну і бактеріальну). Матеріал, в якому хоча б в 1 контейнері виявляються віруси, знищується разом зі всім матеріалом від цього же ембріону шляхом зпалювання.

2 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл змивної води з лабораторного посуду і інструментів, передвизначені для дослідження бактеріальної стерильності. 1-й контейнер досліджується в лабораторії установи-виготівника, 2-й в державній контрольній лабораторії.

Всі контейнери, за винятком 2-х призначених для вірусологічного контролю і 2-х, призначених для бактеріологічного контролю, наражаються на програмному кріозаморожувачі до -196 градусів Цельсія. Контейнери містять в камеру програмного заморожувача вертикально. Заморожування проводять в 3 етапу:

1 - від температури приміщення до -4 градусів Цельсія зі швидкістю 1 градус Цельсія в хвилину;

2 – від -4 до -10 градусів - зі швидкістю 0.1 градус в хвилину;

3 – від -10 до -190 градусів - зі швидкістю 7 градусів в хвилину. Після цього контейнери переносять в біосейфи, де зберігають в рідкому азоті необмежений час до використання.

Операції кріоконсервування і розморожування безумовно відбиваються на характеристиках матеріалу. Тому в засобі, що заявляється дослідження характеристик клітинних суспензій виробляється після виконання обох цих процедур, те є вже після розморожування раніше кріоконсервованого матеріалу. Таким чином забезпечується контроль результатів роботи відносно якості кріоконсервування і розморожування.

Крім того, ми визнали доцільним використати один з відомих засобів кріоконсервування, що, певно, є одним з кращих по відношенню з нашому об'єкту, складатися з трьох стадій заморожування (Федотенков А.Г., Шишкін І.Д., Данілова Л.А. та ін. Кріоконсервування кісткового мозку при низьких температурах для клінічної мети. Проблеми гематології 1966, т.10, 12, стор.45-50).

Разом з тим, спеціальні роботи, проведені для оцінки впливу кріоконсервування, свідчать "cryopreservation did not adversely change the population, viability or immunological capacity of human Fetal liver transplantation" (Ek S., Ringden O., Markling L., Westgren M. Cryopreservation of fetal stem Cells. Bone Marrow transplantation, 11 Suppl, 1: 123, 1993).

Розморожування клітинних суспензій.

Розморожування клітинних суспензій виробляється безпосередньо перед їхнім застосуванням. Програма розморожування включає дві фази - швидку і повільну.

Швидку фазу розморозки матеріал минає шляхом приміщення контейнера в водяну лазню з температурою 40гр. Цельсія до появи рухомої центральної льодинки в контейнері.

Далі слідує повільна фаза при звичайній кімнатній температурі, доки в контейнері витягнутому з води не зникне льодинка.

При кімнатній температурі розморожена клітинна суспензія зберігатися до трансплантації не більш 2 годин.

Тестування функціонального стану кріоконсервованих клітинних суспензій.

Після приготування клітинної суспензії і її кріоконсервування контрольний контейнер, що містить 0.5мл клітинної суспензії, використовується для тестування функціонального стану матеріалу. Для цього він розморожується по програмі, по якій перед трансплантацією виробляється розморожування всіх інших контейнерів.

В розмороженої порції клітинної суспензії узвичаєними засобами визначається:

Загальна кількість ядровмістних клітин в 1мл (клітинним аналізатором або візуально під мікроскопом в рахувальній камері).

Перевіряють їх життєздатність приготуванням мазка і забарвленням трипановою синькою.

Тестування вірусної і бактеріальної стерильності.

3 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл клітинної суспензії, передвизначені для вірусологічного контролю даного ембріону. Клітинні суспензії для цих контейнерів готується з шкіряно-м'язового лоскута цього же ембріону так же як клітинні суспензії з мозку. Один контейнер досліджується на наявність вірусних інфекцій в лабораторії установи-виготівника клітинної суспензії, другий контейнер передається для паралельного дослідження державної контролюючої лабораторії. Третій контейнер залишається в кріосховищі для постійного зберігання з метою підтвердження в подальшому безпеки матеріалу, включаючи вірусологічну і бактеріальну). Матеріал, в якому хоча б в 1 контейнері виявляються віруси, знищується разом зі всім матеріалом від цього же ембріону шляхом зпалювання.

2 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл змивної води з лабораторного посуду і інструментів,

передвизначені для дослідження бактеріальної стерильності. 1-й контейнер досліджується в лабораторії установи-виготовника, 2-й в державній контрольній лабораторії.

Пренатальна діагностика донора ембріонального матеріалу включає дослідження на сифіліс, віл-інфекцію, вірусні гепатити В, і С, токсоплазмоз, цитомегаловірус.

Фетальна діагностика матеріалу включає віл-інфекцію, вірусні гепатити В, і С, токсоплазмоз, цитомегаловірус, віруси рубелли, герпеса.

Повторна діагностика донора на наявність віл-інфекції проводиться після 90-100 днів після абортів.

Властивості лікарського препарату.

1. Відновлення показників крові: відновлення кількості лейкоцитів, еритроцитів, тромбоцитів.

2. Поліпшення трофіки органів, поліпшення мікроциркуляції, досягнення повнокров'я стінки кишки.

3. Підсилення процесів регенерації, до швидкого загоєння виразкових дефектів, що приводяться і закриття їх епітеліальним пластом.

4. Підсилення кишкового бар'єру, зменшення явищ кишкової інтоксикації, зменшення або зникнення пропасниці.

Терапевтичне використання препарату. Показання до застосування лікарського препарату.

1. Хвороби кишечника, що супроводжуються глибокою лейкопенією, агранулоцитозом, анемією, тромбоцитопенією.

2. Кишковий синдром при цитостатичній хворобі, включаючи променеві поразки.

3. Виразковий і ерозивний процеси.

4. Явища інтоксикації: слабкість, пітливість, підвищення температури, порушення дієздатності, зниження ваги (кахексія).

Шляхи введення до організму.

Клітинні суспензії, приготовані з печінки, найбільш часто вводяться внутрішньовенно, хоча можливий шлях підшкірний, підкапсульний і внутрішньопорожнинний. Лікарський препарат вводять внутрішньовенно крапельно в складі 100мл ізотонічного розчину хлористого натрію зі швидкістю 20-40 краплин в хвилину.

Можливо спільне використання клітинних суспензій, для лікування захворювань, що рекомендувалися кишечника.

Вибір для введення обсягу клітинної суспензії.

5.0мл це максимальний обсяг клітинної суспензії, що може бути отриманий з вхідного матеріалу при означених кількісних характеристиках; 0.5 мл - це мінімальний обсяг, придатний для технічного обслуговування маніпуляцій трансплантації, оскільки частина клітин завжди залишається в флаконі, в трубках, в голках і та. ін. Тому контейнер завжди повинен містити препарат в означених межах обсягу.

Як вказувалося вище, звичайно в течію одного лікувального сеансу вводять 0.5-2.0мл клітинної суспензії.

Повторне введення препарату.

При повторному введенні препарату на наступних етапах лікування пацієнта більш прийнятним є використання клітинної суспензії з того ж ембріону, що був використаний в перший раз. Саме для реалізації цієї особливості засобу приготована з ембріонального органу суспензія розливається в декілька контейнерів. Ембріональна суспензія закріплюється за конкретним пацієнтом і зберігається в кріобанці для наступного використання у цього ж пацієнта.

Автори відносять до позитивних якостей засобу, що пропонується можливість досягнути повноцінного лікувального ефекту при застосуванні малих доз фетального матеріалу.

Протипоказання до застосування.

1. Васкуліт в гострій фазі. Капіляріт, флебіт, артрит. Трансплантація можлива після активного лікування і досягнення ремісії через 2-3 місяця.

2. Гострий тромбоз. Лікування можливо через 3-6 місяці.

3. Гемофтальмопатія. Лікування можливо тільки через 2-3 місяця після розвитку гемофтальмопатії.

4. Різко виражена гіпертензія малого кола, зв'язана з васкулітом, тромбозом, долевою пневмонією з розвитком гострого або підгострого *cor pulmonale*.

5. Мієлокарциноз.

6. Термінальні стадії захворювання (висловлена інтоксикація, глибокі розлади обміну речовин, важка загальна декомпенсація).

7. Наявність очагів хронічної інфекції. Необхідна їх санація.

Препарат 6 - Тимоцети ембріонального тимуса людини.

Приготування лікарського препарату.

Використають ембріони 7-12 тижнів гестації. Ембріони одержують при штучному припиненні вагітності у здорових жінок, заздалегідь обстежених на наявність вірусних і гемічних інфекцій. В меті збереження цілісності ембріону аборт проводять вакуумекстракцією. Ембріони переносять в стерильні чашки Петрі, заповнені розчином Хенкса з додаванням антибіотика аміноглікозидного ряду (напр., гентамицин в концентрації 160мг гентамицину на 1000мл розчину Хенкса).

Приготування розчину Хенкса (Hanks, Wallace, 1949): Розчин Хенкса (Hanks, Wallace, 1949) використовувався в якості середовища для приготування клітинних суспензій. Цей розчин є загальноприйнятим для приготування живильних середовищ.

NaCl	8.0г
Kcl	0.4г
CaCl2	0.14г
MgCl2	0.1г
MgSO47H2O*	0.1г
Na2HPO4	0.06г
KH2PO4	0.06г
NaHCO3	0.07г

Глюкоза	1.00г
Фенол (водорозчинна форма)	0.02г

(води бідистильованої перегнаної склі до 1л)

Хлористий кальцій (CaCl_2) заздалегідь розчиняють в 30-50мл води і поволі додають до розчину інших солей. За наявності цієї соли з більшим змістом кристалізаційної води ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}^*$) її додають в кількості 2г. Отриманий розчин фільтрують через паперовий або ватно-марлевий фільтр. Після цього розчин розливають в скляний посуд, закривають ватно-марлевими пробками і стерилізують текучим паром при температурі 100 градусів Цельсія без тиску по 20 хвилин 3 дні підряд.

Розчин при доданні індикатора фенолового червоного має червоно-рожевий колір. Для настанови рН в розчин Хенкса додають стерильний 1.4% розчин двовуглекислого натрію (NaHCO_3).

Розчин Хенкса при роботі з культурою тканин повинен мати рН 7.2-7.4.

При доданні в клітинну суспензію після гомогенізації використовується розчин Хенкса, не що містить фенолового червоного.

Зберігають розчин при 4-60 градусів Цельсія, але можна також і при кімнатній температурі. Термін придатності один місяць.

Подальша робота проводиться в стерильних умовах боксу. Ембріони переносять в стерильні чашки Петрі, заповнені середою Хенкса з антибіотиками, де, обережно розчинивши черевну порожнину, витягають тимус, з якого окремо готують клітинну суспензію.

Кровотворний орган помішують в гомогенізатори, розрізають на невеликі фрагменти і подрібнюють до отримання однорідної маси. Клітини змивають зі стінок і пестика гомогенізатора середою Хенкса в мірні пробірки, пропускаючи через фільтр для переливання препаратів крові, а після цього через голки діаметру, що зменшується.

Порція приготованої таким чином суспензії переноситься в поліетиленовий циліндр і герметично закривається. Ця порція може бути використана для трансплантації нативної суспензії. Інші порції будуть піддані кріоконсервуванню.

Ембріональні клітинні суспензії розливаються в поліетиленові контейнери ємністю від 0.5 до 2.0мл (в залежності від подальшого призначення)

Приготування і використання нативних клітинних суспензій.

Нативні клітинні суспензії одержують після пропущення гомогената ембріональних тканин через фільтр для переливання препаратів крові і голки діаметру, що зменшується.

Нативні клітинні суспензії застосовують по тим же показанням і з допомогою тих же засобів вступу, що і кріоконсервовані клітинні суспензії. Нативні клітинні суспензії використовуються в течію 6-8 годин від моменту взяття матеріалу. Від моменту отримання і до моменту вступу нативних клітинних суспензій реципієнту вони зберігаються при температурі +5-7 градусів Цельсія.

Стислі терміни від моменту приготування до моменту вступу нативних клітинних суспензій зумовлюють особливості їх тестування, а саме редуційовану програму тестування у порівнянні з кріоконсервованими клітинними суспензіями.

В нативних клітинних суспензіях виробляється підрахунок ядровмістних клітин в 1мл суспензії.

Програма вірусологічного і бактеріологічного контролю нативних клітинних суспензій обмежена.

Дослідження на бактеріальну стерильність проводиться, однак його результати стають відомі після трансплантації. Тому ембріональний тимус в цьому випадку береться тільки з цілого ембріону зі розтинанням грудної порожнини в стерильних умовах. Такий матеріал вважається умовно бактеріологічно стерильним.

Фетальна діагностика на наявність віл-інфекції, вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції, вірусу краснухи і герпеса проводиться також ретроспективно. Тому нативні клітинні суспензії готуються тільки при повній пренатальній діагностиці донора, включаючої в себе дослідження крові донора на наявність сифілісу, віл-інфекції, вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції. При застосуванні нативних клітинних суспензій проводиться також дослідження крові реципієнта на наявність вірусних інфекцій: вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції, герпеса.

Незважаючи на те, що з застосуванням нативних клітинних суспензій зв'язувалася надія отримання більш висловленого клінічного ефекту трансплантації, наш досвід використання нативних і кріоконсервованих клітинних суспензій дозволив прийти до укладення, що ефект застосування нативних клітинних суспензій не перевищує ефект кріоконсервованих клітинних суспензій. В нинішній час ми не схильні рекомендувати нативні клітинні суспензії для трансплантації і віддаємо перевагу кріоконсервованим клітинним суспензіям.

Кріоконсервування клітинних суспензій.

Після приготування клітинної суспензії, включаючи додання кріопротектора, отримані клітинні суспензії розливаються в поліетиленові контейнери які закручуються пробками ємністю 2мл. В кожний контейнер вміщується суспензія в кількості від 0.5 до 2мл.

В якості кріопротектора використовується диметилсульфоксид (ДМСО, хімічно чистий). ДМСО є добре відомим кріопротектором. Перед використанням ДМСО пропускається через мілішпоровий фільтр (діаметр шпор 0.22mm).

При легкому змішуванні клітинної суспензії в неї перед кріоконсервуванням додається по краплинам рівної кількості КС обсяг свіжезробленого робітничого розчину ДМСО (1.4моль на літр). Підсумкова концентрація ДМСО в отриманій КС складає 3-10%.

Відмиття препарату від ДМСО перед трансплантацією не вимагається. Його концентрація в контейнерах складає від 3 до 10%. При його розведенні в ізотонічному розчині хлористого натрію при вступі реципієнту вона відповідно падає в 50-100 раз і не є токсичною для організму.

Більш того, ДМСО є провідником біологічних активних речовин через біологічні бар'єри і мембрани, сприяючи біологічному ефекту трансплантації.

Для клітинної суспензії кожного ембріону обов'язково є 6 контрольних контейнерів наступного

призначення:

1 контейнер, що містить 0.5мл клітинної суспензії, передвизначений для тестування функціональної спроможності КС після розморожування;

3 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл клітинної суспензії, передвизначені для вірусологічного контролю даного ембріону. Клітинні суспензії для цих контейнерів готуються з шкіряно-м'язового лоскута цього же ембріону так же як клітинні суспензії з тимуса. Один контейнер досліджується на наявність вірусних інфекцій в лабораторії установи-виготівника клітинної суспензії, другий контейнер передається для паралельного дослідження державної контролюючої лабораторії. Третій контейнер залишається в кріосховищі для постійного зберігання з метою підтвердження в подальшому безпеки матеріалу, включаючи вірусологічну і бактеріальну. Матеріал, в якому хоча б в 1 контейнері виявляються віруси, знищується разом зі всім матеріалом від цього ж ембріону шляхом зпалювання.

2 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл змивної води з лабораторного посуду і інструментів, передвизначені для дослідження бактеріальної стерильності. 1-й контейнер досліджується в лабораторії установи-виготівника, 2-й в державній контрольній лабораторії.

Всі контейнери, за винятком 2-х призначених для вірусологічного контролю і 2-х, призначених для бактеріологічного контролю, наражаються на програмний кріозаморожування до -196 градусів Цельсія. Контейнери поміщають в камеру програмного заморожувача вертикально. Заморожування проводять в 3 етапу:

1 - від температури приміщення до -4 градусів Цельсія зі швидкістю 1 градус Цельсія в хвилину;

2 – від -4 до -10 градусів - зі швидкістю 0.1 градус в хвилину;

3 – від -10 до -190 градусів - зі швидкістю 7 градусів в хвилину. Після цього контейнери переносять в біосейфи, де зберігають в рідкому азоті необмежений час до використання.

Операції кріоконсервування і розморожування безумовно відбиваються на характеристиках матеріалу. Тому в засобі, що заявляється дослідження характеристик клітинних суспензій виробляється після виконання обох цих процедур, то є вже після розморожування раніше кріоконсервованого матеріалу. Таким чином забезпечується контроль результатів роботи відносно якості кріоконсервування і розморожування.

Крім того, ми визнали доцільним використати один з відомих засобів кріоконсервування, що, певно, є одним з кращих по відношенню з нашому об'єкту, складатися з трьох стадій заморожування (Федотенков А.Г., Шишкин І.Д., Данилова Л.А. та ін. Кріоконсервування кісткового мозку при низьких температурах для клінічної мети. Проблеми гематології 1966, т.10, 12, стор.45-50).

Разом з тим, спеціальні роботи, проведені для оцінки впливу кріоконсервування, свідчать "cryopreservation did not adversely change the population, viability or immunological capacity of human Fetal liver transplantation" (Ek S., Ringden O., Markling L., Westgren M. Cryopreservation of fetal stem Cells. Bone Marrow transplantation, 11 Suppl, 1: 123, 1993).

Розморожування клітинних суспензій.

Розморожування клітинних суспензій виробляється безпосередньо перед їхнім застосуванням. Програма розморожування включає дві фази - швидку і повільну.

Швидку фазу разморозки матеріал минає шляхом приміщення контейнера в водяну лазню з температурою 40гр. Цельсія до появи рухомий центральної льодинки в контейнері.

Далі слідує повільна фаза при звичайній кімнатній температурі, доки в контейнері витягнутому з води не зникне льодинка.

При кімнатній температурі розморожена клітинна суспензія зберігається до трансплантації не більш 2 годин.

Тестування функціонального стану кріоконсервованих клітинних суспензій.

Після приготування клітинної суспензії і її кріоконсервування контрольний контейнер, що містить 0.5мл клітинної суспензії, використовується для тестування функціонального стану матеріалу. Для цього він розморожується по програмі, по якій перед трансплантацією виробляється розморожування всіх інших контейнерів.

В розмороженої порції клітинної суспензії узВІЛаєними засобами визначається:

Загальна кількість ядровмістних клітин в 1мл (клітинним аналізатором або візуально під мікроскопом в рахувальній камері),

"Colony-forming units of the granulocyte/macrophage (CFU GM)" used in international scientific publications; this term means "an hematopoietic cell which is capable of producing a colony composed of granulocyte and macrophage progeny in semi-solid medium". КОЕ ІН в 1мл (засобами клонування КОЕ в метилцелюлозі Hann V., Bodger M., Hoffbrand a. Development of pluripotent hematopoietic progenitor cells in the human fetus//Blood. - 1983. - Vol.62. - N.4 - P.118-123.)

"Colony-forming units of the granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, megakaryocyte (CFU GEMM)", meaning "a multipotential hematopoietic cell which is capable of producing a colony composed of granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, and megakaryocyte progeny in semi-solid medium". КОЕ ГЕММ в 1мл (теж same) (ibid).

Саме на ці характеристики КС, отримані після розморожування, ми орієнтуємося при оцінці функціональної спроможності КС при виборі матеріалу для трансплантації.

Ми не проводимо прижиттєву забарвлення мазков КС для визначення відсотка пошкодження клітин т. до. При відпрацьованій технології приготування клітинних суспензій ці характеристики мало корелюють з клінічним ефектом і не відповідають на питання про функціональну повноцінність КС.

Тестування вірусної і бактеріальної стерильності.

3 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл клітинної суспензії, передвизначені для вірусологічного контролю даного ембріону. Клітинні суспензії для цих контейнерів готуються з шкіряно-м'язового лоскута цього же ембріону так же як клітинні суспензії з тимуса. Один контейнер досліджується на наявність вірусних інфекцій в лабораторії установи-виготівника клітинної суспензії, другий контейнер передається для паралельного

дослідження державної контролюючої лабораторії. Третій контейнер залишається в кріосховищі для постійного зберігання з метою підтвердження в подальшому безпеки матеріалу, включаючи вірусологічну і бактеріальну). Матеріал, в якому хоча б в 1 контейнері виявляються віруси, знищується разом зі всім матеріалом від цього ж ембріону шляхом зпалювання.

2 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл змивної води з лабораторного посуду і інструментів, передвизначені для дослідження бактеріальної стерильності. 1-й контейнер досліджується в лабораторії установи-виготівника, 2-й в державній контрольній лабораторії.

Пренатальна діагностика донора ембріонального матеріалу включає дослідження на сифіліс, віл-інфекцію, вірусні гепатити В, і С, токсоплазмоз, цитомегаловірус.

Фетальна діагностика матеріалу включає віл-інфекцію, вірусні гепатити В, і с, токсоплазмоз, цитомегаловірус, віруси рубелли, герпеса.

Повторна діагностика донора на наявність віл-інфекції проводиться після 90-100 днів після аборт.

Властивості лікарського препарату.

1. Відновлення показників імунітету: загальної кількості лімфоцитів, субпопуляцій лімфоцитів Т4, Т8, NK клітин, В-лімфоцитів, корекція їхні співвідношення.

2. Зняття явищ імунологічної атаки, аутоімунної поразки, імунної агресії, феномену супресії.

3. Формування протипухлинного імунітету.

4. Підсилення процесів регенерації, до швидкого загоювання виразкових дефектів, що приводяться і закриття їх епітеліальним пластом.

5. Запобігання розвитку сполучної тканини в результаті перитоніту і операційної травми.

Терапевтичне використання препарату.

1. Показання до застосування лікарського препарату.

2. Імунні і аутоімунні, алергічні поразки кишечника.

3. Кишковий синдром при цитостатичній хворобі, включаючи променеві поразки.

4. Пухлини кишечника до і після оперативного лікування, до і після курсів хіміо- і рентгенотерапії.

5. Виразковий і ерозивний процеси.

6. Розвиток сполучної тканини в стінці кишки.

Шляхи введення до організму.

Клітинні суспензії, приготовані з ембріонального тимуса, найбільш часто вводяться внутрішньовенно, хоча можливий шлях підшкірний, внутрішньопорожнинний і підкапсульний. А саме:

Лікарський препарат вводять внутрішньовенно крапельно в складі 100мл ізотонічного розчину хлористого натрію зі швидкістю 20-40 краплин в хвилину.

Можливо підшкірне введення.

Внутрішньопорожнинне і підкапсульне з використанням ендоскопічної апаратури.

Можливо спільне використання клітинних суспензій, що рекомендувалися для лікування захворювань кишечника.

Вибір для введення обсягу /що пропонується клітинній суспензії.

5.0мл це максимальний обсяг клітинній суспензії, що може бути отриманий з вхідного матеріалу при означених кількісних характеристиках; 0.5мл - це мінімальний обсяг, придатний для технічного обслуговування маніпуляції трансплантації, оскільки частина клітин завжди залишається в флаконі, в трубках, в голках і т. д. Тому контейнер завжди повинен містити препарат в означених межах обсягу.

Як вказувалося вище, звичайно в течію одного лікувального сеансу вводять 0.5-2.0 мл клітинної суспензії.

Повторне введення препарату.

При повторному введенні препарату на наступних етапах лікування пацієнта більш прийнятним є використання клітинній суспензії з також ембріону, що був використаний в перший раз. Саме для реалізації цієї особливості засобу приготована з ембріонального органу суспензія розливається в декілька контейнерів. Ембріональна суспензія закріплюється за конкретним пацієнтом і зберігається в криобанці для наступного використання у цього ж пацієнта.

Автори відносять до позитивних якостей засобу, що пропонується можливість досягнути повноцінного лікувального ефекту при застосуванні малих доз фетального матеріалу.

Протипоказання до застосування.

1. Васкуліт в гострій фазі. Капіляріт, флебіт, артрит. Трансплантація можлива після активного лікування і досягнення ремісії через 2-3 місяця.

2. Гострий тромбоз. Лікування можливо через 3-6 місяці.

3. Гемофтальмопатія. Лікування можливо тільки через 2-3 місяця після розвитку гемофтальмопатії.

4. Різко виражена гіпертензія малого кола, зв'язана з васкулітом, тромбозом, долевій пневмонією з розвитком гострого або підгострого cor pulmonale.

5. Мієлокарціноз.

6. Термінальні стадії захворювання (висловлена інтоксикація, глибокі розлади обміну речовин, важка загальна декомпенсація).

7. Наявність очажів хронічної інфекції. Необхідна їхня санація.

Препарат 7 - Епітеліоцити ембріонального первинного харчового каналу людини.

Приготування лікарського препарату.

Використають ембріони 8-14 тижнів гестації. Ембріони одержують при штучному припиненні вагітності у здорових, заздалегідь на наявність вірусних і гемічних інфекцій жінок, що обстежилися. В меті збереження цілісності ембріону аборт проводять вакуумекстракцією. Ембріони переносять в стерильні чашки Петрі, заповнені розчином Хенкса з доданням антибіотика аміно глікозидного ряду (напр., гентаміцин в концентрації 160мг гентаміцину на 1 000мл розчину Хенкса).

Приготування розчину Хенкса (Hanks, Wallace, 1949):

Розчин Хенкса (Hanks, Wallace, 1949) використовувався в якості середовища для приготування клітинних

суспензій. Цей розчин є загальноприйнятим для приготування поживних середовищ.

NaCl	8.0г
Kcl	0.4г
CaCl2	0.14г
MdCl2	0.1г
MgSO47H2O*	0.1г
Na2HPO4	0.06г
KH2PO4	0.06г
NaHCO3	0.07г
Глюкоза	1.00г
Фенол (водорозчинна форма)	0.02г

(води бідистильованої перегнаної в склі до 1 л)

Хлористий кальцій (CaCl₂) заздалегідь розчиняють в 30-50мл води і поволі додають до розчину інших солей. За наявності цієї солі з більшим змістом кристалізаційної води (Na₂HPO₄12H₂O*) її додають в кількості 2г. Отриманий розчин фільтрують через паперовий або ватно-марлевий фільтр. Після цього розчин розливають в скляний посуд, закривають ватно-марлевими пробками і стерилізують текучим паром при температурі 100 градусів Цельсія без тиску по 20 хвилин 3 дня підряд.

Розчин при доданні індикатора фенолового червоного має червоно-оранжевий колір. Для настанови pH в розчин Хенкса додають стерильний 1.4% розчин двовуглекислого натрію (NaHCO₃).

Розчин Хенкса при роботі з культурою тканин повинен мати pH 7.2-7.4.

Зберігають розчин при 4-60 градусів Цельсія, але можна також і при кімнатній температурі.

Термін придатності один місяць.

Обережно розчиняють черевну порожнину, витягають харчовий канал, який складається з виросту стравовода, шлунку, підшлункової залози, в вигляді невеликий крапки величиною з просяне зерно, і кишок.

Харчовий канал поміщують в гомогенізатори, розрізають на невеликі фрагменти і подрібнюють до отримання однорідної маси.

Клітини змивають зі стінок і пестика гомогенізатора розчином Хенкса в мірні пробірки, пропускають суспензію через фільтр для переливання препаратів крові, а після цього через голки діаметру, що зменшуються.

Клітинну суспензію переносять в стерильний мірний циліндр на 5мл. Зразок розводять розчином Хенкса 1:1.

Центрифугують 5хв., зі швидкістю приблизно 400хg (1500 оборотів в хв.), при температурі 40°C.

Супернатант акуратно переносять в стерильну пробірку, розбавляють розчином Хенкса 1:1.

Центрифугують другий раз 5 хвилин, зі швидкістю приблизно 400хg (1500 оборотів в хв.), при температурі 40°C.

Надосадочну рідину переносять в контейнер, розводять 1:1. Виробляють підрахунок клітин.

Клітинні суспензії розливають в поліетиленові контейнери, в залежності від подальшої мети, обсягом від 0.5 до 2мл.

Приготування і використання нативних клітинних суспензій.

Нативні клітинні суспензії одержують після пропущення гомогената ембріональних тканин через фільтр для переливу препаратів крові і голки діаметру, що зменшується.

Нативні клітинні суспензії застосовують по тим же показанням і з допомогою тих же засобів вступу, що і кріоконсервовані клітинні суспензії. Нативні клітинні суспензії використовуються в течію 6-8 годин від моменту взяття матеріалу. Від моменту отримання і до моменту вступу нативних клітинних суспензій реципієнту вони храняться при температурі +5-7 градусів Цельсія.

Стислі терміни від моменту приготування до моменту вступу нативних клітинних суспензій зумовлюють особливості їх тестування, а саме редувану програму тестування у порівнянні з кріоконсервованими клітинними суспензіями.

В нативних клітинних суспензіях виробляється підрахунок ядровмістних клітин в 1мл суспензії.

Програма вірусологічного і бактеріологічного контролю нативних клітинних суспензій обмежена.

Дослідження на бактеріальну стерильність проводиться, однак його результати стають відомі після трансплантації. Тому первинний харчовий канал береться тільки з цілого ембріону зі розтинанням черевної порожнини в стерильних умовах. Такий матеріал вважається умовно бактеріологічно стерильним.

Фетальна діагностика на наявність віл-інфекції, вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції, вірусу краснухи і герпеса проводиться також ретроспективно. Тому нативні клітинні суспензії готуються тільки при повній пренатальній діагностиці донора, включаючи в себе дослідження крові донора на наявність сифілісу, віл-інфекції, вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції. При застосуванні нативних клітинних суспензій проводиться також дослідження крові реципієнта на наявність вірусних інфекцій: вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції, герпеса.

Незважаючи на те, що з застосуванням нативних клітинних суспензій зв'язувалася надія отримання більш висловленого клінічного ефекту трансплантації, наш досвід використання нативних і кріоконсервованих клітинних суспензій дозволив прийти до укладення, що ефект застосування нативних клітинних суспензій не перевищує ефект кріоконсервованих клітинних суспензій. В нинішній час ми не схильні рекомендувати нативні клітинні суспензії для трансплантації і віддаємо перевагу кріоконсервованим клітинним суспензіям.

Кріоконсервування клітинних суспензій.

Після приготування клітинні суспензії, включаючи додання кріопротектора, отримані клітинні суспензії розливають в поліетиленові контейнери з пробками, які закручуються, ємністю 2мл. В кожний контейнер вміщується суспензія в кількості від 0.5 до 2мл.

В якості кріопротектору використовується диметилсульфоксид (ДМСО, хімічно чистий). ДМСО є добре

відомим кріопротектором. Перед використанням ДМСО пропускається через мілліпоровий фільтр (діаметр пор 0.22mm).

При легкому змішуванні клітинної суспензії в неї перед кріоконсервуванням додається по краплинам рівної кількості КС обсяг свіжес зробленого робітничого розчину ДМСО (1.4моль на літр). Підсумкова концентрація ДМСО в отриманій КС складає 3-10%.

Відмиття препарату від ДМСО перед трансплантацією не вимагається. Його концентрація в контейнерах складає від 3 до 10%. При його розведенні в ізотонічному розчині хлористого натрію при вступі реципієнту вона відповідно падає в 50-100 раз і не є токсичною для організму.

Більш того, ДМСО є провідником біологічних активних речовин через біологічні бар'єри і мембрани, сприяючи біологічному ефекту трансплантації.

Для клітинної суспензії кожного ембріону обов'язково є 6 контрольних контейнерів наступного призначення:

1 контейнер, що містить 0.5мл клітинної суспензії, передвизначений для тестування функціональної спроможності КС після розморожування;

3 контейнери, що містять по 1.0-1.5мл клітинної суспензії, передвизначені для вірусологічного контролю даного ембріону. Клітинні суспензії для цих контейнерів готуються з шкіряно-м'язового лоскута цього же ембріону також як клітинні суспензії з печінки. Один контейнер досліджується на наявність вірусних інфекцій в лабораторії установи-виготівника клітинної суспензії, другий контейнер передається для паралельного дослідження державної контролюючої лабораторії. Третій контейнер залишається в кріосховищі для постійного зберігання з метою підтвердження в подальшому безпеки матеріалу, включаючи вірусологічну і бактеріальну. Матеріал, в якому хоча б в 1 контейнері виявляються віруси, знищується разом зі всім матеріалом від цього же ембріону шляхом зпалювання.

2 контейнери, що містять по 1.0-1.5мл змивної води з лабораторного посуду і інструментів, передвизначені для дослідження бактеріальної стерильності. 1-й контейнер досліджується в лабораторії установи-виготівника, 2-й в державній контрольній лабораторії.

Всі контейнери, за винятком 2-х призначених для вірусологічного контролю і 2-х, призначених для бактеріологічного контролю, наражаються на програмному кріозаморожувачі до -196 градусів Цельсія. Контейнери містяться в камеру програмного заморожувача вертикально. Заморожування проводять в 3 етапу:

1 - від температури приміщення до -4 градусів Цельсія зі швидкістю 1 градус Цельсія в хвилину;

2 - від -4 до -10 градусів - зі швидкістю 0.1 градус в хвилину;

3 - від -10 до -190 градусів - зі швидкістю 7 градусів в хвилину. Після цього контейнери переносять в біосейфи, де зберігають в рідкому азоті необмежений час до використання.

Операції кріоконсервування і розморожування безумовно відбиваються на характеристиках матеріалу. Тому в засобі, що заявляється дослідження характеристик клітинних суспензій виробляється після виконання обох цих процедур, то є вже після розморожування раніше кріоконсервованого матеріалу. Таким чином забезпечується контроль результатів роботи відносно якості кріоконсервування і розморожування.

Крім того, ми визнали доцільним використати один з відомих засобів кріоконсервування, що, певно, є одним з кращих по відношенню до нашого об'єкту, складається з трьох стадій заморожування (Федотенков А.Г., Шишкін І.Д., Данілова Л.А. та ін. Кріоконсервування кісткового мозку при низьких температурах для клінічної мети. Проблеми гематології 1966, т.10, 12, стор.45-50).

Разом з тим, спеціальні роботи, проведені для оцінки впливу кріоконсервування, свідчать "cryopreservation did not adversely change the population, viability or immunological capacity of human Fetal liver transplantation" (Ek S., Ringden O., Markling L., Westgren M. Cryopreservation of fetal stem Cells. Bone Marrow transplantation, 11 Suppl, 1: 123, 1993).

Розморожування клітинних суспензій.

Розморожування клітинних суспензій виробляється безпосередньо перед їхнім застосуванням. Програма розморожування включає дві фази - швидку і повільну.

Швидку фазу разморозки матеріал минає шляхом приміщення контейнера в водяну лазню з температурою 40гр. Цельсія до появи рухомий центральної льодинки в контейнері.

Далі слідує повільна фаза при звичайній кімнатній температурі, доки в контейнері витягнутому з води не зникне льодинка.

При кімнатній температурі розморожена клітинна суспензія зберігатися до трансплантації не більш 2 годин.

Тестування функціонального стану кріоконсервованих клітинних суспензій.

Після приготування клітинної суспензії і її кріоконсервування контрольний контейнер, що містить 0.5мл клітинної суспензії, використовується для тестування функціонального стану матеріалу. Для цього він розморожується по програмі, по якій перед трансплантацією виробляється розморожування всіх інших контейнерів.

В розмороженої порції клітинної суспензії узвичаєними засобами визначається загальна кількість ядровмістних клітин в 1мл (клітинним аналізатором або візуально під мікроскопом в рахувальній камері).

Саме на ці характеристики КС, отримані після розморожування, ми орієнтуємося при оцінці функціональної спроможності КС при виборі матеріалу для трансплантації.

Ми не проводимо прижиттєву забарвлення мазков КС для визначення відсотка пошкодження клітин т. До. При відпрацьованій технології приготування клітинних суспензій ці характеристики мало корелюють з клінічним ефектом і не відповідають на питання про функціональну повноцінність КС.

Тестування вірусної і бактеріальної стерильності.

3 контейнери, що містять по 1.0-1.5мл клітинної суспензії, передвизначені для вірусологічного контролю даного ембріону. Клітинні суспензії для цих контейнерів готуються з шкіряно-м'язового лоскута цього же ембріону так же як клітинні суспензії з печінки. Один контейнер досліджується на наявність вірусних інфекцій в лабораторії установи-виготівника клітинної суспензії, другий контейнер передається для паралельного

дослідження державної контролюючої лабораторії. Третій контейнер залишається в кріосховищі для постійного зберігання з метою підтвердження в подальшому безпеки матеріалу, включаючи вірусологічну і бактеріальну. Матеріал, в якому хоча б в 1 контейнері виявляються віруси, знищується разом зі всім матеріалом від цього же ембріону шляхом зпалювання.

2 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл змивної води з лабораторного посуду і інструментів, передвизначені для дослідження бактеріальної стерильності. 1-й контейнер досліджується в лабораторії установи-виготівника, 2-й в державній контрольній лабораторії.

Пренатальна діагностика донора ембріонального матеріалу включає дослідження на сифіліс, віл-інфекцію, вірусні гепатити В, і С, токсоплазмоз, цитомегаловірус.

Фетальна діагностика матеріалу включає віл-інфекцію, вірусні гепатити В, і С, токсоплазмоз, цитомегаловірус, віруси рубелли, герпеса.

Повторна діагностика донора на наявність віл-інфекції проводиться через 90-100 днів після аборт.

Властивості лікарського препарату.

1. Поліпшення трофіки органів, поліпшення мікроциркуляції, досягнення повнокров'я в стінці кишки.

2. Підсилення процесів регенерації, до швидкого загоювання виразкових дефектів, що приводяться і закриття їх епітеліальним пластом.

3. Підсилення кишкового бар'єру, зменшення явищ кишкової інтоксикації, зменшення або зникнення пропасниці.

4. Поліпшення психоемоційного стану пацієнта, поява волі до видужання, нормалізація формули сну, поява апетиту, зростання обсягу рухів.

Терапевтичне використання препарату.

Показання до застосування лікарського препарату.

1. Імунні і аутоімунні, алергічні поразки кишечника.

2. Кишковий синдром при цитостатичній хворобі, включаючи променеві поразки.

3. Ішемічні поразки кишечника (ішемічний коліт).

4. Виразкові і ерозивні процеси.

5. Явища інтоксикації: слабкість, пітливість, підвищення температури, порушення дієздатності, зниження ваги (кахексія).

Шляхи введення клітинних суспензій.

Клітинні суспензії, приготовані з харчового каналу, найбільш часто вводяться внутришньовенно, підшкірно, субкапсульно, всередину порожнини, в підслизистий шар, у виразковий дефект.

Можливо спільне використання клітинних суспензій, що рекомендувалися для лікування захворювань кишечника.

Вибір для введення обсягу клітинної суспензії, що пропонується.

5.0мл - це максимальний обсяг клітинної суспензії, що може бути отриманий з вхідного матеріалу при означених кількісних характеристиках; 0.5мл - це мінімальний обсяг, придатний для технічного обслуговування маніпуляції трансплантації, оскільки частина клітин завжди залишається в флаконі, в трубках, в голках і т. ін. Тому контейнер завжди повинен містити препарат в означених межах обсягу.

Як вказувалося вище, звичайно в течію одного лікувального сеансу вводять 0.5-2.0мл клітинної суспензії.

Повторне введення препарату.

При повторному введенні препарату на наступних етапах лікування пацієнта більш прийнятним є використання клітинної суспензії з того же ембріону, що був використаний в перший раз. Саме для реалізації цієї особливості засобу приготована з ембріонального органу суспензія розливається в декілька контейнерів. Ембріональна суспензія закріплюється за конкретним пацієнтом і зберігається в кріобанці для наступного використання у цього ж пацієнта.

Автори відносять до позитивних якостей засобу, що пропонується можливість досягнути повноцінного лікувального ефекту при застосуванні малих доз фетального матеріалу.

Протипоказання до застосування.

1. Васкуліт в гострій фазі. Капіляріт, флебіт, артрит. Трансплантація можлива після активного лікування і досягнення ремісії через 2-3 місяця.

2. Гострий тромбоз. Лікування можливо через 3-6 місяці.

3. Гемофтальмопатія. Лікування можливо тільки через 2-3 місяця після розвитку гемофтальмопатії.

4. Різко виражена гіпертензія малого кола, зв'язана з васкулітом, тромбозом, долевою пневмонією, з розвитком гострого або підгострого cor pulmonale.

5. Мієлокарциноз.

6. Термінальні стадії захворювання (висловлена інтоксикація, глибокі розлади обміну речовин, важка загальна декомпенсація).

7. Наявність очагів хронічної інфекції. Необхідна їх санація.

Препарат 8 - Нервові клітини ембріонального мозку людини.

Приготування лікарського препарату.

Використають ембріони 5-14 тижнів гестації. Ембріони одержують при штучному припиненні вагітності у здорових жінок, що заздалегідь обстежилися на наявність вірусних і геміческих інфекцій. В меті збереження цілісності ембріону аборт проводять вакуумекстракцією. Ембріони переносять в стерильні чашки Петрі, заповнені розчином Хенкса з додаванням антибіотика аміноглікозидного ряду (напр., гентаміцин в концентрації 160мг гентаміцину на 1000мл розчину Хенкса).

Приготування розчину Хенкса (Hanks, Wallace, 1949): Розчин Хенкса (Hanks, Wallace, 1949) використовувався в якості середовища для приготування клітинних суспензій. Цей розчин є загальноприйнятим для приготування поживних середовищ.

NaCl	8.0г
Kcl	0.4г

CaCl ₂	0.14г
MgCl ₂	0.1г
MgSO ₄ ·7H ₂ O*	0.1г
Na ₂ HPO ₄	0.06г
KH ₂ PO ₄	0.06г
NaHCO ₃	0.07г
Глюкоза	1.00г
Фенол (водорозчинна форма)	0.02г

(води бідистильованої перегнаної в склі до 1л)

Хлористий кальцій (CaCl₂) заздалегідь розчиняють в 30-50мл води і поволі додають до розчину інших солей. За наявності цієї солі з більшим змістом кристалізаційної води (Na₂HPO₄·12H₂O*) її додають в кількості 2г. Отриманий розчин фільтрують через паперовий або ватно-марлевий фільтр. Після цього розчин розливають в скляний посуд, закривають ватно-марлевими пробками і стерилізують текучим паром при температурі 100 градусів Цельсія без тиску по 20 хвилин 3 дня підряд.

Розчин при доданні індикатора фенолового червоного має червоно-рожевий колір. Для настанови pH в розчин Хенкса додають стерильний 1.4% розчин двовуглекислого натрію (NaHCO₃).

Розчин Хенкса при роботі з культурою тканин повинен мати pH 7.2-7.4.

При доданні в клітинну суспензію після гомогенізації використовується розчин Хенкса, що не містить фенолового червоного.

Зберігають розчин при 4-60 градусів Цельсію, але можна також і при кімнатній температурі. Термін придатності один місяць.

Подальша робота проводиться в стерильних умовах боксу. Ембріони переносять в стерильні чашки Петрі, заповнені середою Хенкса з антибіотиками, де, обережно розчинивши черепну порожнину, витягають мозок, з якого окремо готують клітинну суспензію.

Орган поміщують в гомогенізатори, розрізають на невеликі фрагменти і подрібнюють до отримання однорідної маси. Клітини змивають зі стінок і пестика гомогенізатора середою Хенкса в мірні пробірки, пропускаючи через фільтр для переливання препаратів крові, а після цього через голки діаметру, що зменшується.

Порція приготованої таким чином суспензії переноситься в поліетиленовий циліндр і герметично закривається. Ця порція може бути використана для трансплантації нативної суспензії. Інші порції будуть піддані кріоконсервуванню.

Ембріональні клітинні суспензії розливаються в поліетиленові контейнери ємністю від 0.5 до 2.0мл (в залежності від подальшого призначення)

Приготування і використання нативних клітинних суспензій.

Нативні клітинні суспензії одержують після пропущення гомогената ембріональних тканин через фільтр для переливу препаратів крові і голки діаметру, що зменшується.

Нативні клітинні суспензії застосовують по тим же показанням і з допомогою тих же засобів введення, що і кріоконсервовані клітинні суспензії. Нативні клітинні суспензії використовуються в течію 6-8 годин від моменту взяття матеріалу. Від моменту отримання і до моменту вступу нативних клітинних суспензій реципієнту вони храняться при температурі +5-7 градусів Цельсія.

Стислі терміни від моменту приготування до моменту введення нативних клітинних суспензій зумовлюють особливості їх тестування, а саме редукційну програму тестування у порівнянні з кріоконсервованими клітинними суспензіями.

В нативних клітинних суспензіях виробляється підрахунок ядровмістних клітин в 1мл суспензії. Однак тестування нативних клітинних суспензій на КОЕ-ГМ ('colony-forming units of the granulocyte/macrophage (CFU GM)'), КОЕ-ГММ ('colony-forming units of the granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, megakaryocyte (CFU GEMM)') і СД34 ('progenitor cells (CD34)') перед трансплантацією не проводиться.

Програма вірусологічного і бактеріологічного контролю нативних клітинних суспензій також обмежена.

Дослідження на бактеріальну стерильність проводиться, однак його результати стають відомі після трансплантації. Тому ембріональний мозок в цьому випадку береться тільки з цілого ембріону зі розтинанням черепної порожнини в стерильних умовах. Такий матеріал вважається умовно бактеріологічно стерильним.

Фетальна діагностика на наявність віл-інфекції, вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції, вірусу краснухи і герпеса проводиться також ретроспективно. Тому нативні клітинні суспензії готуються тільки при повній пренатальній діагностиці донора, включаючи в себе дослідження крові донора на наявність сифілісу, віл-інфекції, вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції. При застосуванні нативних клітинних суспензій проводиться також дослідження крові реципієнта на наявність вірусних інфекцій: вірусного гепатиту В, і С, токсоплазмозу, цитомегаловірусної інфекції, герпеса.

Незважаючи на те, що з застосуванням нативних клітинних суспензій зв'язувалася надія отримання більш вираженого клінічного ефекту трансплантації, наш досвід використання нативних і кріоконсервованих клітинних суспензій дозволив прийти до укладення, що ефект застосування нативних клітинних суспензій не перевищує ефект кріоконсервованих клітинних суспензій. В нинішній час ми не схильні рекомендувати нативні клітинні суспензії для трансплантації і віддаємо перевагу кріоконсервованим клітинним суспензіям.

Кріоконсервування клітинних суспензій.

Після приготування клітинної суспензії, включаючи додання кріопротектора, отримані клітинні суспензії розливаються в поліетиленові контейнери з пробками, які закручуються ємністю 2мл. В кожний контейнер міститься суспензія в кількості від 0.5 до 2мл.

В якості кріопротектора використовується діметилсульфоксид (ДМСО, хімічно чистий). ДМСО є добре відомим кріопротектором. Перед використанням ДМСО пропускається через мілішпоровий фільтр (діаметр шпор 0.22mm).

При легкому змішуванні клітинної суспензії в неї перед кріоконсервуванням додається по краплинам рівний кількості КС обсяг свіжесробленого робітничого розчину ДМСО (1.4моль на літр). Підсумкова концентрація ДМСО в отриманій КС складає 3-10%.

Відмиття препарату від ДМСО перед трансплантацією не вимагається. Його концентрація в контейнерах складає від 3 до 10%. При його розведенні в ізотонічному розчині хлористого натрію при вступі реципієнту вона відповідно падає в 50-100 раз і не є токсичною для організму.

Більш того, ДМСО є провідником біологічних активних речовин через біологічні бар'єри і мембрани, сприяючи біологічному ефекту трансплантації.

Для клітинної суспензії кожного ембріону обов'язково є 6 контрольних контейнерів наступного призначення:

1 контейнер, що містить 0.5мл клітинної суспензії, передвизначений для тестування функціональної спроможності КС після розморожування;

3 контейнери, що містять по 1.0-1.5мл клітинної суспензії, передвизначені для вірусологічного контролю даного ембріону. Клітинні суспензії для цих контейнерів готуються з шкіряно-м'язового лоскута цього же ембріону так же як клітинні суспензії з мозку. Один контейнер досліджується на наявність вірусних інфекцій в лабораторії установи-виготівника клітинної суспензії, другий контейнер передається для паралельного дослідження державної контролюючої лабораторії. Третій контейнер залишається в кріосховищі для постійного зберігання з метою підтвердження в подальшому безпеки матеріалу, включаючи вірусологічну і бактеріальну. Матеріал, в якому хоча б в 1 контейнері виявляються віруси, знищується разом зі всім матеріалом від цього же ембріону шляхом зпалювання.

2 контейнери, що містять по 1.0-1.5мл змивної води з лабораторного посуду і інструментів, передвизначені для дослідження бактеріальної стерильності. 1-й контейнер досліджується в лабораторії установи-виготівника, 2-й в державній контрольній лабораторії.

Всі контейнери, за винятком 2-х призначених для вірусологічного контролю і 2-х, призначених для бактеріологічного контролю, наражаються на програмному кріозаморожувачі до -196 градусів Цельсія. Контейнери містять до камери програмного заморожувача вертикально. Заморожування проводять в 3 етапу:

1 - від температури приміщення до -4 градусів Цельсія зі швидкістю 1 градус Цельсія в хвилину;

2 – від -4 до -10 градусів - зі швидкістю 0.1 градус в хвилину;

3 – від -10 до -190 градусів - зі швидкістю 7 градусів в хвилину. Після цього контейнери переносять в біосейфи, де зберігають в рідкому азоті необмежений час до використання.

Операції кріоконсервування і розморожування безумовно відбиваються на характеристиках матеріалу. Тому в засобі, що заявляється дослідження характеристик клітинних суспензій виробляється після виконання обох цих процедур, то є вже після розморожування раніше кріоконсервованого матеріалу. Таким чином забезпечується контроль результатів роботи відносно якості кріоконсервування і розморожування.

Крім того, ми визнали доцільним використати один з відомих засобів кріоконсервування, що, певно, є одним з кращих по відношенню з нашому об'єкту, складається з трьох стадій заморожування (Федотенков А.Г., Шишкін І.Д., Данілова Л.А. і ін. Кріоконсервування кісткового мозку при низьких температурах для клінічної мети. Проблеми гематології 1966, т.10, 12, стор.45-50).

Разом з тим, спеціальні роботи, проведені для оцінки впливу кріоконсервування, свідчать "cryopreservation did not adversely change the population, viability or immunological capacity of human Fetal liver transplantation" (Ek S., Ringden O., Markling L., Westgren M. Cryopreservation of fetal stem Cells. Bone Marrow transplantation, 11 Suppl, 1: 123, 1993).

Розморожування клітинних суспензій.

Розморожування клітинних суспензій виробляється безпосередньо перед їхнім застосуванням. Програма розморожування включає дві фази - швидку і повільну.

Швидку фазу розморозки матеріал минає шляхом приміщення контейнера в водяну лазню з температурою 40гр. Цельсія до появи рухомої центральної льодинки в контейнері.

Далі слідує повільна фаза при звичайній кімнатній температурі, доки в контейнері втягнутом з води не зникне льодинка.

При кімнатній температурі розморожена клітинна суспензія зберігається до трансплантації не більш 2 годин.

Тестування функціонального стану кріоконсервованих клітинних суспензій.

Після приготування клітинної суспензії і її кріоконсервування контрольний контейнер, що містить 0.5мл клітинної суспензії, використовується для тестування функціонального стану матеріалу. Для цього він розморожується по програмі, по якій перед трансплантацією виробляється розморожування всіх інших контейнерів.

В розмороженої порції клітинної суспензії узвичаєними засобами визначається:

Загальна кількість ядровмістних клітин в 1мл (клітинним аналізатором або візуально під мікроскопом в рахувальній камері),

"Colony-forming units of the granulocyte/macrophage (CFU GM) " used in international scientific publications; this term means "an hematopoietic cell which is capable of producing a colony composed of granulocyte and macrophage progeny in semi-solid medium". КОЕ ГМ в 1мл (засобами клонування КОЕ в метилцеллюлозе Nashi V., Bodger M., Hoffbrand a. Development of pluripotent hematopoietic progenitor cells in the human fetus//Blood. - 1983. - Vol.62. - N.4 - P.118-123.)

"Colony-forming units of the granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, megakaryocyte (CFU GEMM)", meaning "a multipotential hematopoietic cell which is capable of producing a colony composed of granulocyte, erythrocyte, monocyte/macrophage, and megakaryocyte progeny in semi-solid medium". КОС ГЕММ в 1мл (теж same) (ibid).

"contents of early precursors of hemopoiesis", the authors propose to replace it with a commonly used English term "progenitor cells (CD34)". CD34 в 1мл (indirect immunofluorescent test with the panel of monodonal

antibodies).

Саме на ці характеристики КС, отримані після розморожування, ми орієнтуємося при оцінці функціональної спроможності КС при виборі матеріалу для трансплантації.

Ми не проводимо прижиттєву забарвлення мазков КС для визначення відсотка пошкодження клітин т. до. При відпрацьованій технології приготування клітинних суспензій ці характеристики мало корелюють з клінічним ефектом і не відповідають на питання про функціональну повноцінність КС.

Тестування вірусної і бактеріальної стерильності.

3 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл клітинної суспензії, передвизначені для вірусологічного контролю даного ембріону. Клітинні суспензії для цих контейнерів готується з шкіряно-м'язового лоскута цього ж ембріону також як клітинні суспензії з мозку. Один контейнер досліджується на наявність вірусних інфекцій в лабораторії установи-виготівника клітинної суспензії, другий контейнер передається для паралельного дослідження державної контролюючої лабораторії. Третій контейнер залишається в кріосховищі для постійного зберігання з метою підтвердження в подальшому безпеки матеріалу, включаючи вірусологічну і бактеріальну. Матеріал, в якому хоча б в 1 контейнері виявляються віруси, знищується разом зі всім матеріалом від цього ж ембріону шляхом зпалювання.

2 контейнера, що містять по 1.0-1.5мл змивної води з лабораторного посуду і інструментів, передвизначені для дослідження бактеріальної стерильності. 1-й контейнер досліджується в лабораторії установи-виготівника, 2-й в державній контрольній лабораторії.

Пренатальна діагностика донора ембріонального матеріалу включає дослідження на сифіліс, віл-інфекцію, вірусні гепатити В, і С, токсоплазмоз, цитомегаловірус.

Фетальна діагностика матеріалу включає віл-інфекцію, вірусні гепатити В, і С, токсоплазмоз, цитомегаловірус, віруси рубелли, герпеса.

Повторна діагностика донора на наявність віл-інфекції проводиться через 90-100 днів після абортів.

Властивості лікарського препарату. 1. Поліпшення нервової трофіки органів.

2. Підсилення процесів регенерації, до швидкого загоювання виразкових дефектів, що приводяться і закриття їх епітеліальним пластом.

3. Поліпшення психоемоційного стану пацієнта, поява волі до видужання, нормалізація формули сну, поява апетиту, зростання обсягу рухів.

4. Нормалізація функціональної активності кишки: при діареї, зменшення частоти стільця, при запорах - поява регулярного стільця.

5. Обезболюючий ефект.

Терапевтичне використання препарату. Показання до застосування лікарського препарату.

1. Імунні і аутоімунні, алергічні поразки кишечника.

2. Атонія, гіпокінезія, спастичні стани кишків.

3. Виразковий і ерозивний процеси.

4. Астено-невротичний синдром, депресивні стани.

Шляхи введення в організм.

Клітинні суспензії, приготовані з ембріонального мозку, найбільш часто вводяться підшкірно, інтракраниально, інтраспинально, підкапсульно, всередину порожнини, а також в тканині органів в вигляді імплантацій для формування нервових утворень.

Можливо спільне використання клітинних суспензій, що рекомендувалися для лікування захворювань кишечника.

Вибір для введення обсягу, що пропонується клітинної суспензії.

5.0мл це максимальний обсяг клітинної суспензії, що може бути отриманий з вхідного матеріалу при означених кількісних характеристиках; 0.5мл - це мінімальний обсяг, придатний для технічного обслуговування маніпуляцій трансплантації, оскільки частина клітин завжди залишається в флаконі, в трубках, в голках і т. ін. Тому контейнер завжди повинен містити препарат в означених межах обсягу.

Як вказувалось вище, звичайно в течію одного лікувального сеансу вводять 0.5-2.0мл клітинної суспензії.

Повторне введення препарату.

При повторному введенні препарату на наступних етапах лікування пацієнта більш прийнятним є використання клітинної суспензії з того ж ембріону, що був використаний в перший раз. Саме для реалізації цієї особливості засобу приготована з ембріонального органу суспензія розливається в декілька контейнерів. Ембріональна суспензія закріплюється за конкретним пацієнтом і зберігається в кріобанці для наступного використання у цього ж пацієнта.

Автори відносять до позитивних якостей засобу, що пропонується можливість досягнути повноцінного лікувального ефекту при застосуванні малих доз фетального матеріалу.

Протипоказання до застосування.

1. Васкуліт в гострій фазі. Капіляріт, флебіт, артрит. Трансплантація можлива після активного лікування і досягнення ремісії через 2-3 місяця.

2. Гострий тромбоз. Лікування можливо через 3-6 місяці.

3. Гемофтальмопатія. Лікування можливо тільки через 2-3 місяця після розвитку гемофтальмопатії.

4. Різко виражена гіпертензія малого кола, зв'язана з васкулітом, тромбозом, долевою пневмонією з розвитком гострого або підгострого cor pulmonale.

5. Мієокарциоз.

6. Термінальні стадії захворювання (висловлена інтоксикація, глибокі розлади обміну речовин, важка загальна декомпенсація).

7. Наявність очажів хронічної інфекції. Необхідна їхня санація.

Комбіноване застосування препаратів.

Для лікування захворювань тонкої і товстої кишків препарати, що заявляються лікарські на основі ембріональних клітинних суспензій можуть застосовуватися порізно, а також в поєднанні один з іншим.

Поєднання залежить від характеру хвороби, її активності, висловленості основних синдромів, супутніх захворювань і індивідуальних особливостей пацієнтів.

Так наприклад, за наявності неспецифічного виразкового коліту хронічної рецидивуючої форми середньоважкої течії субтотальної поразки помірної активності запалення з ускладненнями в вигляді афтозного стоматиту, поліартриту, рекомендується лікування клітинними суспензіями препаратів 1, 5, 6, 7 або препаратів 3, 5, 6, 7 або препаратів 4, 5, 6, 7.

Клінічні приклади.

Приклад 1. Хвора О., 34р., спостерігається в клініці з 1996 року.

Надійшла в Республіканський проктологічний центр з скаргами на учащення стільця до 6-7 раз в добу, несформований, без домішок, підвищення температури тіла до 37.3°C у вечір.

Аналіз хвороби: вважає себе хворою в течію року: рік назад мав місце епізод учащення стільця до 8 раз в добу з домішкою слизи, крові; в течію місяця означені явища купировались мимовільно. Останнє погіршення почалося місяць назад, коли стілець поступово почастішав до 12 раз в добу, з'явилася домішка слизи, крові, через 3 тижні підвищилася температура тіла до 38°C. Схудла на 5кг.

Об'єктивно: загальний стан середнього ступеня тяжкості. Шкіряні покрови бліді. Тони серця ритмічні, посилені, пульс - 104 в 1хв.; артеріальний тиск - 90/70мм рт.ст. В легенях везикулярне дихання. Живіт м'який, симетричний, при пальпації хвороблив в лівих бокових відділах.

Дані колоноскопії. Колоноскоп введений в баню сліпої кишки і через баугінієву заслонку на 10см в тонку кишку. Слизова тонкої кишки блідо-рожева, бархатиста. Баугінієва заслонка півмісячної форми, орієнтована в просвіт бані сліпої кишки. Слизова сліпої, висхідної і поперечно-ободової кишки без видимої органічної патології. Слизова нисхідної, сигмовидної, прямої кишки гіпермірована, пухка, набрякла, інфільтрована, з нальотом фібрина, багатьма ерозіями і окремо що лежать виразками, одиничними запальними поліпами. Судинний малюнок змщений, гаустрація згладжена. В просвіті кишки помірна кількість гнійно-кров'янистого що відділяється.

Укладення: Хвороба Крона лівої половини товстої кишки.

Дані ирригоскопії: вступ контрастної взвеси визначає висловлену нечіткість, нерівність контурів починаючи з прямої кишки до середньої третини поперечно-ободочної кишки. Просвіт нерівномірно звужений, випрямлені гаустри, ліві відділи кишки скорочені. На контурах і в просвіті безліч ерозій, виразок, дрібних і великих дефектів. В сигмовидному відділі кишки безліч спикуюподібних виступів. Поперечно-ободочна кишка провисає, баня сліпої кишки розміщена низько. Спорожнення повне, рельєф слизової в правих відділах - збережені складки. При вертикальному огляді хворої - птоз всіх відділів товстої кишки.

Укладення: Хвороба Крона, здебільшого лівостороння поразка.

Дані загального аналізу крові: еритроцити - 2.9 · 10¹², гемоглобін - 87г/л, лейкоцити - 6.2 · 10⁹, СОЕ - 25мм/ч.

Діагноз: Хвороба Крона товстої кишки, лівостороння поразка, середнього ступеня тяжкості, хронічна форма, II ступінь активності.

На тлі прийому салофалька в дозі 4г/доба per os, інфузійної коригуючої терапії була проведена трансплантація гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини, зразок А-755, 7нд. 29.11. 96.

Хвора транспфузію перенесла задовільно. Через місяць після трансплантації: хвора виписана з клініки, знаходиться вдома. Прийом салофалька припинила, приймає сульфасалазин 0.5 2т.х4р., препарати залоза. Почуває себе задовільно. Стілець 3р в добу, м'якооформлений, без домішок. В загальному аналізі крові: гемоглобін - 114г/л, еритроцити - 3.2 · 10¹², кольоровий показник - 1.0; лейкоцити - 4.0 · 10⁹; палочкоядерні - 4, сегментоядерні - 4 6, еозинофіли - 3, лімфоцити - 44, моноцити - 3, СОЕ - 5мм/год.

В течію наступних 9 місяців хвора знаходиться в стані клінічної ремісії, лікарських препаратів не приймає. Спостереження триває.

Приклад 2.

Хворий К., 1958р. Р., спостерігається в клініці з 1996 року. Надійшов в Республіканський проктологічний центр 24.10.96, з скаргами на частий стілець до 10-15 раз в добу, з домішкою крові, слизи; підвищення температури до 37.2°C, різку слабкість, набряклість гомілок, гомілковостопних суглобів.

З аналізу: вважає себе хворим в течію 2-х років. Не обстежився, не лікувався. Останнє загострення тривало 2 місяці: почалося гостро, стілець почастішав до 30 разів на добу з домішкою крові, слизи. Був госпіталізований в інфекційне відділення, після цього - в гастроентерологічне.

Об'єктивно: загальний стан важкий. Шкіряні покрови бліді, субіктиричні; тургор шкіри знижений. Серце — тони приглушені, ритмічні, пульс - 90 в 1; артеріальний тиск - 110/80мм рт.ст. Легені - дихання везикулярне. Живіт м'який, хвороблив по ходу нисхідної і сигмовидної кишки. Відзначається набряклість гомілок, гомілковостопних суглобів.

Дані об'єктивних обстежень:

1) При проктологічному огляді: періанальна зона гіперемірована, шкіра мацерірована. Тонус сфінктеру знижений. Ректо-романоскопія проведена на 12см: кишка ригідна, слизова набрякла, контактено кровоточе, покрита щілеподібними виразками.

2) Ірригоскопія (25.10.96): малою кількістю контрастної суспензії, дозованим вступом виконані всі відділи товстої кишки. Починаючи з прямої, контури нерівні, ширина просвіту нерівномірна звужена, сигмовидна, нисхідна, ободова кишка значно звужена, деформована, з наявністю кількісних ерозій, ділянок з дефектами наповнення - псевдополіпів, виразок, кишка має кількісні спикуюподібні вип'ячування - почастішавші що деформувалися гаустри. В області селезінкового згину до сред. Третини нисхідної кишки - ширина просвіту кишки збережена, однак контури нерівні, безліч дрібних ерозій, в просвіті слизь. Поперечна ободова кишка випрямлена, зі зглаженням печінковим згином, укорочена.

Праві відділи значно деформовані, скорочені, баня сліпої кишки контрастирована незначно (в просвіті повітря).

Вихідний відділ нерівномірно звужений по типу стійких структур, даний стан зберігається в процесі

дослідження. Спорожнення одночасне, рельєф місцями змащений, має безліч ерозій, слизі, стовщень і складок, що деформувалися.

Укладення: тотальна поразка товстої кишки хворобою Крона.

3) Ендоскопічне дослідження не проводилося із-за тяжкості стану хворого.

В лабораторних дослідженнях: загальний аналіз крові: гемоглобін - 73г/л, гематокрит - 27, лейкоцити - $6.5 \cdot 10^9$, палочкоядерні - 20, сегментоядерні - 44, лімфоцити - 26, моноцити - 8, СОЕ - 50мм/ч, загальний білок - 61г/л.

Діагноз: Хвороба Крона товстої кишки, тотальна поразка, хронічна рецидивна форма, важка течія, висловлена активність запального процесу. Внекишкові прояви у вигляді артриту гомілковостопного суглобу.

Хворому призначене лікування: дієта 4, салофальк 0.25 4т.х4р., метронідазол 1тх3р, проводилась інтенсивна інфузійна коригуюча терапія.

Хворому показане оперативне лікування, почата предопераційна підготовка.

26.10.96 хворому проведена трансплантація гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини, зразок 3 - 23, 12тиж. 2.5мл.

На наступний день хворий відзначав прилив сил, температура тіла нормалізувалась. За наступні 3-4 дні зменшилась набряклість, гомілковостопних суглобів, частота стільця почала знижуватися і на 30.10.96 складала 3-4 разу на добу, без домішок. Продовжували епізодичні турбувати жагучі болі у животі.

Через 2 тижні після трансплантації дані загального аналізу крові: гемоглобін - 93г/л, еритроцити - $3.0 \cdot 10^{12}$, лейкоцити - $4.6 \cdot 10^9$, палочкоядерні - 2, сегментоядерні - 50, еозинофіли - 1, лімфоцити - 43, моноцити - 4, СОЕ - 48мм/год, ретикулоц. 1.2%, загальний білок - 6 г/л.

Зважаючи на поліпшення стану хворого оперативне лікування не робилось, хворий був виписаний додому.

Через 2 місяця після трансплантації: самопочуття хворого задовільне, стілець 2-3 рази на добу (консистенція густої кашки), інколи турбують болі у животі, епізодичні болі в області суглобів. Продовжує базисну терапію (салофальк 2т.х4р.).

Загальний аналіз крові від 18.12.96: гемоглобін - 120г/л; еритроцити - $3.65 \cdot 10^{12}$; кольоровий показник - 0.98; тромб - 240.109; лейкоцити - $4.6 \cdot 10^9$; палочкоядерні - 3; сегментоядерні - 5; еозинофіли - 2; лімфоцити - 39; моноцити - 3; СОЕ - 4мм/год.

Через 5 місяців після трансплантації хворий почуває себе цілком задовільно, стілець 1-2 разу в добу, м'якооформлений, без домішок. Спостереження триває.

Приклад 3.

Хворий Т., 28 років, надійшов в Республіканський проктологічний центр, 28.08. 96 з скаргами на частий стілець (10 разів на добу) з домішкою крові, слизі, схуднення, запаморочення, загальну слабкість.

Нездужає 1 місяць. Захворювання почалося знезапче: в течію 3-х днів стілець почастишав до 15 разів на добу, кожний раз зі стільцем виділялась значна кількість крові (30мл). Не лікувався. Страждає гемороєм. Втрата маси 17кг.

На час огляду (03.05.96) загальний стан важкий. Шкіряні покрови бліді, вологі, тургор шкіри знижений. Тони серця глухі, систолічний шум на вершині, пульс - 90 в 1; артеріальний тиск - 100/60мм рт.ст. В легенях - дихання везикулярне. Живіт м'який, вірної форми, хвороблив при пальпації в лівій підвздошній області, sigma звужена, щільна, болісна. Перитональних симптомів немає. Температура тіла нормальна.

Дані ректо-романоскопії: Огляд до 10см слизиста гіперемірована, контактено кровотооче, пухка, з ерозіями і псевдополіпами. Укладення: неспецифічний виразковий коліт.

Дані колоноскопії: зона поразки розповсюджується вище Баугінієвої заслонки і на всю ободову кишку у вигляді дифузного ерозивного процесу, зглаженості гаустр, відсутності судинного малюнку. В просвіті кишки значна кількість слизі і кров'янисто-гнійного що відділяється. Кишка укорочена, уявлена у вигляді труби. Укладення: неспецифічний виразковий коліт, тотальна поразка.

В аналізі крові: еритроцити - $3.1 \cdot 10^{12}$, гемоглобін - 100г/л, лейкоцити - $12.6 \cdot 10^9$, еозинофіли - 3, юні - 2, палочкоядерні - 17, сегментоядерні - 57, лімфоцити - 11, моноцити - 10, анізоцитоз+.

В аналізі сечі: жовта, кисла, питома щільність - 1015, білок - 0.264г/л, епітелій плоский - в значній кількості, епітелій поліморфний - багато, лейкоцити - 10-12, еритроцити - малозмінені 2-4, циліндри 5-7 (з нашаруванням лейкоцитів), циліндри гіалінові - 4-6, циліндри епітеліальні - 2-4, слизь - в значній кількості.

Діагноз: неспецифічний виразковий коліт, важка форма, тотальна поразка, активність III ст. Вторинна залізодефіцитна анемія першого ступеня.

Хворий одержував базисну терапію: сульфосалазін 0.5 2т.х3р., метронідазол 0.5 1т.х3р., діазолін 1т.х3р., вітаміни B1, B6, B12, C.

В зв'язку з швидким прогресуванням хвороби, відсутністю ефекту від консервативної терапії, вираженим схудненням (втрата ваги склала 17кг) було вирішене провести трансплантацію гемопоетичних клітин ембріональної печінки людини. 05.09 зроблена внутрішньовенна трансфузія ембріональних клітинних суспензій. Було введено 3.83×10^8 кріоконсервованих клітин ембріональної печінки людини 12 тижнів гестації.

Ще під час трансфузії (через 30-40 хвилин після початку трансфузії) хворий відзначив прилив сил. На наступний день хворий повідомив, що спав краще, ніж звичайно, покращився апетит, посилювався кров'яний обіг в кистях, стопах. Відзначив зникнення домішки крові до калу. Протягом наступних 2-х тижнів частота стільця зменшувалася і до 19.09 складала 2-3р. на добу, стілець без патологічних домішок, кашкоподібний.

В аналізі крові: еритроцити - 2.92×10^{12} г/л, гемоглобін - 90г/л; ретикулоцити - 1.7%; лейкоцити - 8.6×10^9 /л; еозинофіли - 6, палочкоядерні - 13, сегментоядерні - 41, лімфоцити - 28, моноцити - 9.

19.09 вироблена повторна трансплантація. Внутрішньовенно було введено 1.87×10^8 кріоконсервованих клітин ембріональної печінки людини 12 тижнів гестації. Обидві трансфузії не супроводжувались побічними реакціями.

На 3-ій день (22.09.96) у хворого з'явилися признаи вірусної інфекції (ОРВІ): катаральні явища, підвищення температури до 38.5°C . Частота стільця не змінилася.

23.09 хворий виписаний з клініки для продовження лікування в амбулаторних умовах. Через 2 тижні після

другої (і через місяць після першої) трансплантації частота стільця 1 раз в добу, стілець оформлений/ без домішок. Хворий додав в вазі 4кг. Почуває себе задовільно. Дотримується дієти.

В аналізі крові: еритроцити - $2.74 \times 10^{12}/л$, гемоглобін - 90г/л, лейкоцити - $5.4 \times 10^9/л$: еозинофіли - 3, палочкоядерні - 9, сегментоядерні - 65, лімфоцити - 22, моноцити - 1, СОЕ - 12мм/год.

У зв'язку з анемічним синдромом що зберігся, хворому були призначені препарати залоза і вирішене провести третю трансплантацію ембріональних клітинних суспензій.

Трансплантація була проведена 16.10.96, введено 8.28×10^7 криоконсервованих клітин ембріональної печінки людини в терміні 7 тижнів гестації. На наступний день хворий відзначив поліпшення загального самопочуття, підвищення апетиту. На 3-ій день з'явилась домішка крові до стільця, стілець почастишав до 4-х разів на добу, на 7 день стілець нормалізувався. Хворий продовжував приймати салофальк ще у протязі 1 місяця.

В загальному аналізі крові на 8-ой день після трансплантації: еритроцити - $3.4 \times 10^{12}/л$, гемоглобін - 110г/л, кольоровий показник - 0.9, лейкоцити - $6.2 \times 10^9/л$, палочкоядерні - 10, сегментоядерні - 63, лімфоцити - 23, моноцити - 9, СОЕ - 4мм/ч. Гематологічні показники залишалися на тому же рівні в течію наступних 4-х місяців, а через 6 місяці склали: еритроцити - $3.8 \times 10^{12}/л$, гемоглобін - 120г/л, кольоровий показник - 0.9, лейкоцити - 5.2, палочкоядерні - 6, сегментоядерні - 69, еозинофіли - 1, лімфоцити - 23, моноцити - 1, СОЕ - 3мм/ч.

Згодом рік хворий знаходився в стані стійкої клініко-гематологічної ремісії: почуває себе задовільно, лікарських препаратів не приймає. Додав у вазі 16кг. Відновив трудову діяльність в повному обсязі. Спостереження триває.

Приклад 4. Хворий П., 16 років, спостерігається в клініці з листопада 1994р.

Нездужає неспецифічним виразковим колітом в течію 8 років. Захворювання почалося гостро: знеацька почастишав стілець до 20 разів на добу, виділення великої кількості крові зі стільцем, підвищення температури до $39^{\circ}C$. Був госпіталізований в інфекційне відділення, де була виключена наявність гострих кишкових інфекцій. Тільки через 1.5 місяці після почала захворювання дитина надійшла в НДІ педіатрії акушерства і гінекології, де був поставлений діагноз неспецифічного виразкового коліту і почата базисна терапія (сульфосалазін, преднізолон). Після двох місяців лікування в стаціонарі стан покращився: стілець 4-5 разів на добу, без домішок. Лікування преднізолоном тривало ще 6 місяці (доза, що підтримує, 10мг/доба). Через місяць після припинення прийому препарату – знов загострення.

В наступні 5 років загострення у вигляді почастишання стільця до 5-20р. на добу, патологічних домішок до стільця (кров, слиз), епізодів підвищення температури до 38-40 градусів Цельсію мали місце 2-4 рази на рік, з приводу чого дитина надходила на стаціонарне лікування в НДІ педіатрії акушерства і гінекології. Необхідно відзначити, що фізичний розвиток дитини за ці 5 років хвороби був вкрай повільним, дитина майже не додавала в зростанні і вазі.

У листопаді 1994 (01.11) вперше була проведена трансплантація ембріональних гемопоетичних клітин: зразок 3-94, (трансплантація проводилась на тлі стихаючого загострення). Наступна ремісія на тлі підтримної терапії тривала 6 місяців. Мати дитини відзначає, що дитина почала швидко рости: за рік після першої трансплантації хлопчик зріс на 10см. Друга трансплантація була виконана 01.03.95 (зразок 3-253). Як і попередню, трансплантація проводилась на тлі стихаючого загострення, в комбінації з базисною терапією (сульфосалазін до 4г/доба, преднізолон 20мг/доба). Прийом преднізолону продовжували в течії 3-х місяців з поступовим зниженням дози.

Після заміни преднізолону почалося загострення: стілець до 20р. в добу, підвищення температури до 38 градусів Цельсію (2-3 дні). Через 10 днів - частота стільця 4-5 разів на добу, рідкий, інколи слиз з прожилками крові. В жовтні 1995р. у дитини підвищилася температура до 39 градусів Цельсію, в зв'язку з цим він надійшов в НДІ педіатрії акушерства і гінекології.

Дані загального аналізу крові від 12.10.95: гемоглобін - 100г/л, еритроцити - 3.3×10^{12} , кольоровий показник - 0.9, лейкоцити - 8.0×10^9 , тромбоцити - 228×10^9 , лейкоцитарна формула: палочкоядерні - 3, сегментоядерні - 67, еозинофіли - 4, лімфоцити - 19, моноцити - 7, СОЕ - 3мм/ч. Показники біохімічного аналізу - у межах норми. Було почате звичайне протирецидивне лікування (салофальк 2г/доба, преднізолон не призначався). Через 1.5 місяці на тлі прийому, що тривається сульфосалазіну у дозі 3г/доба у дитини підвищилася температура до 41 градуса Цельсія, головний біль, загальна слабкість, запаморочені стани, стілець 2-3р. на добу з домішкою крові і слизу.

Дитина надійшла в НДІ педіатрії акушерства і гінекології в важкому стані. При обстеженні була виявлена гостра полісегментарна пневмонія, з приводу чого приймав лікування антибіотиками. Пневмонія прийняла затяжну течію, що зажадало тривалого застосування антибіотиків. По даним загального аналізу крові гемоглобін утримувався біля 90г/л.

01.02.96р. була проведена 4-та трансплантація ембріональної клітинної суспензії (зразок 3-376), після чого намітилась позитивна динаміка в стані дитини (на тлі що тривається антибактеріальної терапії): через тиждень стілець 1р. на добу, кашкоподібний або оформлений, з домішкою слизу, але без крові (на час трансплантації стілець 3-4 рази на добу, водянистий), підвищена температура тіла утримувалась ще біля 2-х тижнів, після цього нормалізувалась (з 15.02 температура тривало нормальна), дитина була виписана в задовільному стані. 21.02.96 було рекомендоване оперативне лікування, продовження базисної терапії (сульфосалазін 3г/сут, преднізолон знизити з 12.5мг до нуля за 1.5 місяця).

Через 8 місяців на тлі помірно висловленого загострення була вироблена 5-та трансплантація (зразок До-944) дата проведення 17.10. 96. В течію 2-х місяців після трансплантації дитина почувала себе задовільно, після цього з'явилася сиплість голосу, субребрильна температура (до $37.50^{\circ}C$) трималась біля 1 місяця, у зв'язку з цим дитина надійшла на стаціонарне лікування у НДІ педіатрії акушерства і гінекології з приводу двосторонньої хронічної пневмонії з переважною поразкою правого легена, правостороннього субатрофічного бронхіту.

Зважаючи на те, що клініко-лабораторні дані, дані ректо-романоскопії вказували на мінімальну активність

запального процесу в кишечникові, вирішене було трансплантацію не проводити. Після виписки в течію півроку дитина знаходилась вдома, дієти практично не дотримувалась, не приймала лікарських препаратів, вела активний образ життя і почувала себе задовільно: стілець 1-3 рази на добу, без домішок, напівсформований. В кінці серпня 1997р. Загострилися явища полінозу у вигляді вазомоторного риніту, кон'юнктивіту на тлі чого з'явилася домішка крові до стільця, почашення стільця до 5-6 разів на добу, схуднув на 2кг за 1.5 місяця, не лікувався, у зв'язку з цим звернулися в клініку клітинної терапії.

По даним обслідування: гемоглобін - 122г/л, лейкоцити - $5.6 \cdot 10^9$, еозинофіли - 2, палочкоядерні - 2, сегментоядерні - 53, лімфоцити - 39, моноцити - 4, СОЕ - 3мм/ч. По даним ректо-романоскопії мінімальна активність запального процесу в rectum. Було призначена базисна терапія (салофальк 2г/доб), проведена 6-а трансплантація (зразок До-776).

Незважаючи на те, що захворювання почалося з віку 8 років, затримки зростання і розвитку в нинішній час немає: зростання дитини 170см, вага - 60кг, причому мати дитини підкреслює, що після затримки в зростанні в течію перших п'яти років хвороби, дитина почала рости після почала застосування трансплантацій.

Слідє також відзначити, що дитина страждає полінозом, що виявляються у вигляді вазомоторного риніту, фарингіту, кон'юнктивіту навесні-восени. Вже після першої трансплантації ембріональної клітинної суспензії мати відзначила висловлене зменшення симптомів полінозу в сезон звичайних загострень, тільки напередодні 6-ої трансплантації прояви поліноза були висловленими.

Враховуючи, що хвороба виникла в дитячому віці і продовжується 8 років, висока імовірність озлоякістлення, у зв'язку з цим хворому показане 2 рази на рік проводити ректальну біопсію для виявлення можливих передракових змін.

Спостереження за пацієнтом триває. На нинішній час можна відзначити, що у даного пацієнта спостерігається перехід хронічної безперервної форми в хронічну рецидивуючу, причому ступінь тяжкості рецидивів знижується, а тривалість і повнота ремісій зростають.

Приклад 5.

Хвора Я., 1958р. Р., спостерігається в клініці з 1994 року.

Діагноз: неспецифічний виразковий коліт, хронічна рецидивуюча форма, середнього ступеня тяжкості, лівобічна поразка. Долихосігма.

Аналіз хвороби: вважає себе хворою з літа 1992р. Захворювання почалося поступово: стілець прийняв жидку консистенцію, через 3 місяці з'явилася домішка слизі, крові до калу, стілець почастішав до 10 разів на добу. Лікувалася сульфосалазіном, преднізолоном, знаходилась на дозі що підтримує 1.25мг. Друге загострення - літо 1993 року, купировано в процесі амбулаторного лікування, знов підтримувалася доза преднізолону - 1.25мг. Наступна ремісія - 1 рік, загострення влітку 1994 року, через 2 тижні після відміни преднізолону, у зв'язку з цим надійшла на стаціонарне лікування в клініку клітинної терапії.

Скарги: стілець 6-7 разів в добу, з кров'ю, рідкий, набряклість животу, загальна слабкість.

При надходженні: гемоглобін - 62г/л, еритроцити - $1.8 \cdot 10^{12}$, ЦП - 1.0, лейкоцити - $4.8 \cdot 10^9$, палочкоядерні - 7, сегментоядерні - 47, еозинофіли - 3, лімфоцити - 42, моноцити - 3, СОЕ - 20мм/год. В процесі лікування приймала сульфосалазін (2тх4р.), преднізолон (з 15мг до 1.25мг/доб), гемотрансфузії.

Хвора обстежена:

Ректо-романоскопія від 4.10.94р.: тубус введений на 20см, слиzysta набрякна, гіпермирована, є безліч дрібних поверхніх ерозій, на стінках сліди слизі, фібрину.

Ірігоскопія від 06.10.94. Введено 1л барієвої суспензії, дуже швидке ретроградне проходження контрасту. Відзначається деяке звуження просвіту кишки, двоконтурність; "облисіння" слизистої, відсутність перистальтики в лівих відділах кишечника. Сигмовидна кишка подовжена, робить додатковий згин. Укладення: рентгенологічні ознаки неспецифічного виразкового коліту, Долихосігма.

Фиброколоноскопія від 05.10.94.: Колоноскоп введений у ректосигмоїдний. Відділ, де визначається структура кишки за рахунок щільного утворення з гіпергрануляціями. Взята прицільна біопсія з 3-х крапок. Слиzysta прямої кишки гіпермирована, ерозійована. Судинний малюнок погано висловлений. Укладення: неспецифічний виразковий коліт зі структурою ректо-сигмоїдного відділу. Сг?

Дані патогистологического дослідження: Сг виключений.

При виписці загальний аналіз крові (13.10.94): гемоглобін - 100г/л, еритроцити - $3.0 \cdot 10^{12}$, кольоровий показник - 1.0, лейкоцити - $4.8 \cdot 10^9$, палочкоядерні - 2, сегментоядерні - 68, еозинофіли - 1, лімфоцити - 26, моноцити - 3, СОЕ - 4мм/год.

Трансплантація не проводилась.

Повторно звернулася в клініку 20.02.95 з приводу загострення процесу: стілець полурідкий, 3-4 рази на добу, домішка крові до калу. При надходженні загальний аналіз крові: гемоглобін - 104г/л, еритроцити - $3.0 \cdot 10^{12}$, кольоровий показник - 1.0, лейкоцити - $4.0 \cdot 10^9$; палочкоядерні - 10, сегментоядерні - 51, еозинофіли - 4, 6 - 2, лімфоцити - 17, моноцити - 16, СОЕ - 7мм/год.

Хворій була проведена трансплантація ембріональної клітинної суспензії, зразок 3-259, 8 тижнів, 2.5мл. Після трансплантації хвора почувала себе задовільно, стілець 2-3 рази на добу. При виписці загальний аналіз крові: гемоглобін - 74г/л, еритроцити - $2.3 \cdot 10^{12}$, кольоровий показник - 0.9; тромбоцити - 155.10^{12} , лейкоцити - $7.0 \cdot 10^9$; палочкоядерні - 8, сегментоядерні - 744, еозинофіли - 1, лімфоцити - 16, моноцити - 1, СОЕ - 34мм/год.

Слідє відзначити, що після трансплантації хворій вдалося повністю скасувати преднізолон (вона знаходилась на 1/4т. - 1.25мг в течію 2.5 років), але продовжувала приймати дозу, що підтримує сульфосалазіна 1тх2р.. В травні 1995р. Звернулася до лікаря в зв'язку з вагітністю, що настала, при обстеженні загальний аналіз крові: гемоглобін - 68г/л, еритроцити - $2.5 \cdot 10^{12}$, кольоровий показник - 0.8; рет. - $6.2 \cdot 10^{12}$, тромбоцити - 245.109, лейкоцити - $4.3 \cdot 10^9$, 6-1, палочкоядерні - 1, сегментоядерні - 78, лімфоцити - 18, моноцити - 2, СОЕ - 53мм/год. У зв'язку з важкою течією вагітності була перервана штучними родами в серпні і в вересні при обстеженні: гемоглобін - 117г/л, еритроцити - $4.2 \cdot 10^{12}$, кольоровий показник - 0.88, тромбоцити - 248.109, лейкоцити - $6.3 \cdot 10^9$, палочкоядерні - 0, сегментоядерні - 48, еозинофіли - 2, лімфоцити

-44, моноцити - 6, СОЕ - 26мм/год.

Деяке погіршення стану почалося в грудні 1995 року, почав частішати стілець, схудла на 8кг за наступні 2 місяця, у зв'язку з цим надійшла в клініку 06.02.96р. (стілець 5-6 разів з домішкою слизу, з прожилками крові). При надходженні загальний аналіз крові: гемоглобін - 120г/л, еритроцити - $3.7 \cdot 10^{12}$, ЦП - 0.98, тромбоцити - 280, лейкоцити - $5.2 \cdot 10^9$; палочкоядерні - 2, сегментоядерні - 64, еозинофіли - 3, лімфоцити - 30, моноцити - 1, СОЕ - 6мм/год.

Була проведена друга трансплантація ембріональної клітинної суспензії, зразок До-283, 8 тижнів, 2.2мл.

Була проведена ректоколоноскопія (19.02.96.): колоноскоп введений в баню сліпої кишки. Слизова тонкої кишки не змінена. Слизова сліпої і висхідної кишки блідо-рожевого кольору. Починаючи з печінкового згину визначаються дільничі поразки у вигляді окремо лежачих афтозних виразок і запальних поліпів. Слизова набрякна, судинний малюнок висловлений, гаустрація згладжена. Починаючи з рівня сигмовидної кишки визначається різкий кордон візуально незмінної і поразеної слизистої. Слизова набрякна, гіперемірована, контактна кровоточе, судинний малюнок буде відсутній. В просвіті кишковий вміст з кров'ю.

Укладення: Хвороба Крона товстої кишки з переважною поразкою лівих відділів, активна фаза.

При виписці загальний аналіз крові: гемоглобін - 120г/л, еритроцити - $3.6 \cdot 10^{12}$, кольоровий показник - 1.0, тромбоцити - 280, лейкоцити - $5.6 \cdot 10^9$; палочкоядерні - 5, сегментоядерні - 64, еозинофіли - 2, моноцити - 1, СОЕ - 7мм/год.

Наступне надходження в клініку 23.01.97 у зв'язку з початком стільця до 10-12 разів (2 тижні тому), в нинішній час стілець 6-7 разів, невелика кількість слизу, крові, турбує загальна слабкість, піднудіння. Почала приймати месалазін по 0.5 4 рази на день. Через 7 днів у хворої піднялася температура тіла до 38 градусів Цельсія, з'явилися болі в лівому колінному суглобі, порушення його функції. Діагноз: Синовіт.

Ще через 7 днів, 07.02.97 на рентгенокопії органів грудної порожнини знайдені численні дрібні порожнини праворуч в області S1, а ліворуч S2 визначені порожнини 1.0-1.5см з рівнем рідини. Діагностована септична абсцедуюча пневмонія. 10.02.97 на тлі різкого підвищення температури до 40 градусів Цельсія діагностован сепсис (посіви крові - негативні).

Робилось лікування цефобідом внутрішньовенно. В течію наступних 2-х тижнів стан хворої нормалізувався: температура тіла - 36.7°C , стілець 1-2р. На добу, м'якооформлений. Рентгенологічно в легенях - позитивна динаміка.

При надходженні загальний аналіз крові (за 20.01.97): гемоглобін - 98г/л, еритроцити - $3.2 \cdot 10^{12}$, ЦП - 1.0, лейкоцити - $6.8 \cdot 10^9$, палочкоядерні - 9, сегментоядерні - 68, еозинофіли - 1, лімфоцити - 19, моноцити - 3, СОЕ - 12мм/год.

26.02.97 хворій проведена третя трансплантація ембріональної клітинної суспензії (зразок До-835). Хвора трансплантацію перенесла задовільно. При виписці загальний аналіз крові: гемоглобін - 110г/л, еритроцити - $3.3 \cdot 10^{12}$, кольоровий показник - 1.0, лейкоцити - $5.4 \cdot 10^9$, палочкоядерні - 3, сегментоядерні - 70, еозинофіли - 1, лімфоцити - 22, моноцити - 4, СОЕ - 40мм/год.

Наступне звернення в клініку 21.07.97 в зв'язку з загостренням процесу і скаргами на початок стільця до 15 разів на добу, домішка крові і слизу до стільця, помірні болі у лівій половині живота, загальну слабкість, втрату ваги 5-6кг за 3 місяця (погіршення з травня 1997р.). Хворій була призначена базисна терапія (салофальк 0.5 2т.х4р.; салофальк свічки 0.25 1т.х3р.; преднізолон починаючи з 30мг per os зі зниженням дози на 5мг в тижб. до 0. Було вирішено провести трансплантації ембріональних клітинних суспензій з інтервалом в 7 днів: 15.07.97 - зразок 3-110, і 21.07.97 - зразок 3-371. Трансфузію хвора перенесла задовільно. При виписці стан хворої задовільний, стілець 3 рази в добу, без домішок.

При надходженні загальний аналіз крові: гемоглобін - 90г/л, еритроцити - $3.0 \cdot 10^{12}$, кольоровий показник - 0.98, лейкоцити - $5.4 \cdot 10^9$; палочкоядерні - 10, сегментоядерні - 66, еозинофіли - 4, лімфоцити - 18, моноцити - 2, СОЕ - 22мм/год.

При виписці загальний аналіз крові: гемоглобін - 110г/л, еритроцити - $3.5 \cdot 10^{12}$, лейкоцити - $6.2 \cdot 10^9$; палочкоядерні - 8, сегментоядерні - 78, еозинофіли - 2, лімфоцити - 11, моноцити - 1, СОЕ - 8мм/год.

До звернення в клініку, в течію перших двох років захворювання, хвора примушена була приймати підтримуючі дози преднізолону (1.25мг) постійно і профілактичні сульфасалазін 0.5 1т.х2р. Після використання ембріональних клітинних суспензій стало можливим припинити постійний прийом глюкокортикоїдів і сульфасалазіна, перейшовши до використання цих препаратів тільки для купірування загострень процесу.

В нинішній час (листопад 1997р.) хвора почуває себе задовільно, прийом салофалька і преднізолону припинений, набрала в вазі 8кг. Середня тривалість ремісії складає 1 рік. Слідє відзначити, що на час звернення в клініку хвора є інвалідом 2 групи, не працювала із-за поганого стану здоров'я. В нинішній час хвора залишається на інвалідності, але працює, соціально активна.