



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **81884** (13) **C2**  
(51) МПК (2006)  
**A61K 35/39** (2006.01)  
**A61K 35/407** (2006.01)  
**A61M 5/00**  
**A61M 5/50**

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

**(54) КОМПЛЕКСНИЙ БІОТРАНСПЛАНТАТ, СПОСІБ ОДЕРЖАННЯ БІОТРАНСПЛАНТАТА ДЛЯ ЛІКУВАННЯ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ ТА СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ЦУКРОВОГО ДІАБЕТУ**

1

2

(21) а200703482

(22) 30.03.2007

(24) 11.02.2008

(72) ТУРЧИН ІВАН СЕМЕНОВИЧ, UA, ЛАРІН ОЛЕКСАНДР СЕРГІЙОВИЧ, UA, ДРОЗДОВИЧ ІРИНА ІНОКЕНТІЇВНА, UA, СИДОРЕНКО ЛАРИСА МИКОЛАЇВНА, UA, СІЧИНАВА РЕВАЗ МЕЛЬЯНОВИЧ, UA

(73) УКРАЇНСЬКИЙ НАУКОВО-ПРАКТИЧНИЙ ЦЕНТР ЕНДОКРИННОЇ ХІРУРГІЇ, ТРАНСПЛАНТАЦІЇ ЕНДОКРИННИХ ОРГАНІВ І КЛІТИН МІНІСТЕРСТВА ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ, UA

(56)	RU	2100966	C1,	10.01.98.
	UA	48859	A,	15.08.02.
	RU	2153344	C1,	27.07.2000.
	SU	1578192	A1,	15.07.90.
	RU	2008953	C1,	15.03.94.
	RU	2095410	C1,	10.11.97.
	RU	2135193	C1,	27.08.99.

UA 32157 A, 15.12.2000.

(57) 1. Комплексний біотрансплантат для лікування цукрового діабету, що складається з органної культури підшлункової залози, який **відрізняється** тим, що додатково містить органну культуру печінки і фізіологічний розчин, взяті при наступному співвідношенні, ваг. %:

залози	25-30
органна культура печінки	8-10
фізіологічний розчин	решта.

2. Біотрансплантат за п. 1, який **відрізняється** тим, що він як органну культуру підшлункової залози містить тканину хвостової частини підшлункової залози.

3. Біотрансплантат за п. 1, який **відрізняється** тим, що він як органну культуру печінки, містить

тканину останньої, взяту із зони вище жовчного міхура.

4. Спосіб одержання біотрансплантата за п. 1, який включає виділення фрагментів матеріалу, отримання мікрофрагментів та культивуванням органної культури, який **відрізняється** тим, що виділені фрагменти підшлункової залози і печінки охолоджують до 3-5 °С, промивають, подрібнюють до мікрофрагментів, повторно промивають, мікрофрагменти підшлункової залози витримують при 3-5 °С протягом 50-70 хвилин, а мікрофрагменти печінки відмивають охолодженим до 3-5 °С розчином Хенкса і мікрофрагменти підшлункової залози та печінки культивують окремо у живильному середовищі, причому отриману органну культуру промивають фізіологічним розчином при t 21-29 °С.

5. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що культивування мікрофрагментів підшлункової залози здійснюють у живильному середовищі при ваговому співвідношенні фрагмент: живильне середовище (0,8-1,2):(5-7), протягом 4,5-5,5 діб при періодичній зміні живильного середовища через 11,5-12,5 годин.

6. Спосіб за п. 4 або 5, який **відрізняється** тим, що використовують живильне середовище у складі: середовище 199, середовище RPMI, ембріональна теляча сироватка та антибіотик

(13) **C2**  
(11) **81884**  
(19) **UA**

цефазолін при наступному співвідношенні компонентів, об'ємні %:

середовище 199 55-65

середовище RPMI 25-34

ембріональна теляча сироватка 8,5-9

антибіотик (0,003-0,005 % розчин) 1,5-2.

7. Спосіб за п. 4, який **відрізняється** тим, що культивування мікрофрагментів печінки здійснюють у живильному середовищі при  $t$  3-5 °C, протягом 4,5-5,5 діб при періодичній зміні через 23,5-24,5 години живильного середовища.

8. Спосіб за п. 4 або 7, який **відрізняється** тим, що використовують живильне середовище у складі: гідролізат лактальбуміну, середовище Ігла MEM та ембріональна теляча сироватка при співвідношенні компонентів, об'ємні %:

гідролізат лактальбуміну 55-65

середовище Ігла MEM 30-35

ембріональна теляча сироватка 5-10.

9. Спосіб лікування цукрового діабету біотрансплататом за п. 1 шляхом трансплантації останнього, який **відрізняється** тим, що трансплантацію виконують у підшкірну жирову клітковину передньої черевної стінки на 40-60 мм вище пупка через спільний ін'єкційний канал послідовно, спочатку культуру підшлункової залози, а потім органну культуру печінки на 9-15 мм нижче.

10. Спосіб лікування за п. 9, який **відрізняється** тим, що ін'єкцію органної культури роблять у 4-5 напрямках від ін'єкційної точки.

Винахід відноситься до галузі біотехнології і стосується лікарських препаратів (біотрансплантат), які містять речовину із матеріалу тваринного походження для лікування цукрового діабету, способу його одержання та способу лікування цукрового діабету.

З літературних та патентних джерел інформації відомі способи одержання культури підшлункової залози [1. Пат. РФ №2008953, МПК 5 А 61N5/02, А 61K3100. Способ лечения сахарного диабета // Горбунов О.М., Белокопытов Ю.Ю., Рововая Л.М. Заявл. 1990. Опубл. 1994], [2. Пат. РФ №2095410, МПК 6 C12N35/00. Способ получения культуры эндокринной ткани // Кирпатовский И.Д., Каитова З.С., Лысенко А.И. Заявл. 1995. Опубл. 1997], але ці способи стосуються переважно отримання культури острівцевих клітин ( $\beta$ -клітин). Слід зазначити, що відомі способи виключають можливість застосування нових багатокомпонентних живильних (ростових) середовищ та антибіотиків нової генерації.

Відомі також способи вирощування клітин печінки (одношарова культура) шляхом їх культивування на шматочках слюди [4. Корпачев В.В., Онищенко Д.С. Стимулирующий эффект биологически активных веществ селезенки на функциональную активность гепатоцитов // Физиол. журн. - 1989. Т.35, №3. С.80-83.] або на матрицях із вуглецевого сорбенту [5. Автор. свид. СССР №1578192, МПК 5 C12N5/00. Способ выращивания клеток печени // Осипова Л.А., Алексеева Т.А., Немлий Н.И., Быкорез А.И. и др. Заявл. 1988. Опубл. 1990]. Але багатоетапна обробка клітинного матеріалу на всіх етапах (центрифугування, трипсинізація тощо) сприяє

механічному травмуванню гепатоцитів та зменшенню їх кількості. Відомий також спосіб одержання клітин ембріональної печінки [6. Пат. РФ №2153344, МПК 7 А61K35/407, А61P43/00. Способ трансплантации эмбриональных печеночных клеток в эксперименте // Тимебулатов В.М., Рахматуллин СИ., Хасанов А.Г. и др. - Заявл. 1999. Опубл. 2000]. Спосіб полягає в тому, що виділену печінку відмивають у середовищі 199, вміщують у свіже середовище 199 та гомогенізують. Гомогенат центрифугують, для трансплантації використовують переважно середній шар, в якому залишається основна кількість живих гепатоцитів. До недоліків цього способу відноситься те, що при гомогенізації відбувається руйнування структури паренхіми печінки і, особливо, при подальшому центрифугуванні, зниження відсотка життєздатних клітин, тобто для реалізації мети даного винаходу необхідним є отримання значно більшої кількості вихідного матеріалу.

Найближчим аналогом до винаходу за технічною суттю та досягненим результатом є біотрансплатат, який містить  $\beta$ -клітини підшлункової залози і спосіб отримання його, [3. Пат. РФ №2135193, МПК 6 А61K35/39. Способ получения материала, содержащего бета- клетки поджелудочной железы для трансплантации больным сахарным диабетом с использованием феномена миграции клеток // Скалецкий Н.Н., Шумаков В.И. Заявл. 1997. Опубл. 1999, Бюл. 24]. Біотрансплатат складається із підшлункової залози. Спосіб його отримання полягає у виділенні цілої підшлункової залози, подрібненні її до мікрофрагментів розміром до 1мм, відмиванні цих мікрофрагментів (матеріалу) розчином Хенкса з

антибіотиками, культивування у культуральних матрацах при температурі 35-40°C протягом від двох діб до шести тижнів при періодичному зниженні температури до 4-25°C. При цьому одноразово чи періодично знижують концентрацію сироватки у культуральному середовищі (середовище 199).

Недоліком цього способу є те, що для культивування використовують усю підшлункову залозу, не враховуючи, що анатомічно β-клітини розташовані переважно у її хвостовій частині. Крім того, багаторазова зміна температурного режиму та концентрації окремих компонентів (сироватки) ростового середовища змінює (робить несталим) фізико-хімічні параметри, що не сприяє адаптації β-клітин та їх проліферації. Досить тривале культивування (до 6 тижнів) поступово зменшує кількість і функціональну активність β-клітин.

Таким чином, вказані недоліки знижують життєздатність культури та негативно впливають на функціональну активність β-клітин.

Відомий спосіб трансплантаційного лікування цукрового діабету, ускладненого гепатопатією, що включає імплантацію у черевну стінку реципієнта ксенокультури неонатальних підшлункових залоз та фетальних гепатоцитів [7. Пат. України №48859, МПК 6 А61В17/00. Спосіб трансплантаційного лікування ускладненого цукрового діабету // Кот О.Г., Турчин І.С., Гусак В.К., Андрієнко В.В. Заявл. 2002. Опубл. 2002, №8], який прийнято за найближчий аналог. Згідно останньому ксенокультури підшлункової залози та фетальні гепатоцити імплантують через дві пункційні точки на відстані не менше 5см одна від одної, тобто практично тканинна культура підшлункової залози та гепатоцити трансплантуються не сумісно, а окремо, що виключає можливість безпосереднього впливу останніх на функціональну активність трансплантованих β-клітин. Крім того, у винаході відсутні свідчення щодо розрахункової дози трансплантаційних матеріалів.

В основу винаходу поставлена задача отримання біотрансплатату із підвищеною функціональною активністю β-клітин та удосконалення способу його одержання і способу лікування шляхом одержання біотрансплатата органної культури, в якому за рахунок підбору інгредієнтів та оптимальних умов культивування останніх досягається підвищення функціональної активності β-інсулоцитів та подовження їх життєздатності *in vitro* та *in vivo*.

Для рішення поставленої задачі запропонований біотрансплантат для лікування цукрового діабету, спосіб його одержання та спосіб лікування цукрового діабету.

Біотрансплантат для лікування цукрового діабету, що включає органну культуру підшлункової залози, у якому, відповідно до винаходу, додатково введено органну культуру печінки і компоненти взяті при співвідношенні, % ваг.

органну культуру підшлункової залози	25-30%
органну культуру печінки	8-10%
фізіологічний розчин	Решта

а також тим, що біотрансплантат, як органну культуру підшлункової залози, містить тканину хвостової частини та тим, що біотрансплантат, як органну культуру печінки, містить тканину останньої, взятую із зони вище жовчного міхура.

Спосіб одержання біотрансплатату за п.1, який включає видалення фрагментів матеріалу, отримання мікрофрагментів та культивуванням органної культури у якому, відповідно до винаходу, видалені фрагменти підшлункової залози і печінки охолоджують до 3-5°C, промивають, подрібнюють до мікрофрагментів, повторно промивають, мікрофрагменти підшлункової залози витримують при 3-5°C протягом 50-70 хвилин, а мікрофрагменти печінки відмивають охолодженим до 3-5°C розчином Хенкса та мікрофрагменти підшлункової залози і печінки культивують окремо у живильному середовищі, причому отриману органну культуру промивають фізіологічним розчином при t 21-29°C, а також тим, що культивування мікрофрагментів підшлункової залози здійснюють у живильному середовищі при ваговому співвідношенні тканина підшлункової залози:живильне середовище (0,8-1,2):(5-7) протягом 4,5-5,5 діб при періодичній зміні живильного середовища через 11,5-12,5 годин, а також тим, що використовують живильне середовище у складі: середовище 199, середовище RPMI, ембріональна теляча сироватка та антибіотик цефазолін при співвідношенні компонентів, % об'єму (мл)

середовище 199	55-65
середовище RPMI	25-34
ембріональна теляча сироватка	8,5-9
антибіотик (0,003-0,005 % розчин)	1,5-2

а також тим, що культивування мікрофрагментів печінки здійснюють у живильному середовищі при t 3-5°C протягом 4,5-5,5 діб при періодичній зміні живильного середовища через 23,5-24,5 годин та також тим, що для культивування тканини печінки використовують живильне середовище у складі: гідролізат лактальбуміну, середовище Ігла MEM та ембріональна теляча сироватка при співвідношенні компонентів, % об'єму (мл)

Гідролізат лактальбуміну	55-65
середовище Ігла MEM	30-35
ембріональна теляча сироватка	5-10

Спосіб лікування цукрового діабету біотрансплататом за п.1 шляхом трансплантації останнього, за яким, відповідно до винаходу, трансплантацію виконують у підшкірну жирову клітковину передньої черевної стінки на 40-60мм вище пупка через спільний ін'єкційний канал послідовно, культуру підшлункової залози, а органної культури печінки на 9-15мм нижче, а також тим, що ін'єкцію органної культури роблять у 4-5 напрямках від ін'єкційної точки.

Запропонована група винаходів пов'язана єдиним винахідницьким задумом отримання життєздатної *in vitro* та *in vivo* органної культури, що приведе до уникнення гострого відторгнення біотрансплатата та значно підвищить рівень інсуліну. Задум втілюється новим вперше запропонованим біотрансплантатом (органною культурою) для лікування цукрового діабету,

способом його отримання та способом лікування цукрового діабету цим біотрансплататом. Запропонований відповідно до винаходу Біотрансплантат вперше складається із двох компонентів (органної культури підшлункової залози і органної культури печінки), причому органну культуру підшлункової залози отримують із мікрофрагментів хвостової частини останньої, а органну культуру печінки отримують із мікрофрагментів тканини із зони, розташованої вище жовчного міхура, а використання нової послідовності операцій отримання біотрансплатату у заявлених параметрах приводить до отримання біотрансплатату без зруйнування структури паренхіми печінки і, особливо, з великим відсотком життєздатних клітин, та в якому  $\beta$ -клітини вирізняються високою функціональною активністю - рівень інсуліну у культуральному середовищі коливається від  $28,2 \pm 3,68$  мк од./мл до  $36,7 \pm 0,5$  мк од./мл (у людини за стандартним методом аналізу рівень інсуліну у крові  $29$  мк од./мл), що в свою чергу при трансплантації відповідно до способу, який заявляється, дозволяє уникнути гострого відторгнення біотрансплатату, а наявність гепатоцитів приводить до активування проліферації острівцевих клітин та збільшення секреції інсуліну, а також гепатоцити виконують імуноізоляційну та антитоксичну функції.

Технологія отримання біотрансплатату.

Виділену у стерильних умовах у новонароджених поросят хвостову частину підшлункової залози (період ішемії 3-5хв.) вміщують у флакони із охолодженням ( $4^{\circ}\text{C}$ ) розчином Хенкса і промивають останнім 2-3 рази. Потім тканинний матеріал подрібнюють до мікрофрагментів діаметром  $0,5-0,6$  мм і відмивають (до 5 разів) охолодженим розчином Хенкса із антибіотиком (цефазолін або триаксон)  $1\text{мг}/100\text{мл}$  і витримують у холодильнику протягом 1-1,5 год. при температурі  $4^{\circ}\text{C}$ . Після чого розчин Хенкса зливають і у кожний флакон наливають живильне середовище складу: середовище 199 (55-65%), середовище RPMI-1640 (25-34%), ембріональна теляча сироватка (8,5-9%) та антибіотик цефазолін,  $0,003-0,005\%$  розчин (1,5-2%). Вагове співвідношення тканина:живильне середовище -  $(0,8-1,2):(5-7)$ . Матеріал культивують у ротаційному апараті (швидкість обертання ролера 1,5-2 оберти/хвилину) при температурі  $25-26^{\circ}\text{C}$  протягом 5 діб, заміну живильного середовища проводять кожні 11,5-12,5 год. Після закінчення строку культивування органну культуру 4-7 разів відмивають фізіологічним розчином кімнатної температури ( $20-22^{\circ}\text{C}$ ) і вживають для трансплантації. Життєздатність культури визначають за допомогою морфологічних та гормональних досліджень. Отримана органна культура підшлункової залози, в якій  $\beta$ -клітини вирізняються високою функціональною активністю - рівень інсуліну у культуральному середовищі коливається від  $28,2 \pm 3,68$  мк од./мл до  $36,7 \pm 0,5$  мк од./мл (у людини за стандартним методом аналізу рівень інсуліну у крові  $29$  мк од./мл).

В стерильних умовах у новонароджених поросят видаляють печінку. Для культивування

використовується тканина із зони розташованої вище жовчного міхура, яку поділяють на 3-5 часток, вага кожної з яких дорівнює 200-205 мг. Кожну частку вміщують в окремий флакон із охолодженням до  $4^{\circ}\text{C}$  гідролізатом лактальбуміну. Після 5-7 разового відмивання тканину подрібнюють до фрагментів діаметром  $0,6-0,8$  мм. Отриману суспензію переносять в інший стерильний флакон та відмивають охолодженим до  $4^{\circ}\text{C}$  розчином Хенкса (6-8) разів до отримання прозорої надосадної рідини. Відмитий тканинний матеріал заливають живильним середовищем (склад: гідролізат лактоальбуміну 55-65%, середовище Ігла MEM 30- 35% та ембріональна теляча сироватка 5-10мл) і культивують при температурі  $3-5^{\circ}\text{C}$  протягом 4-6 діб. Заміну живильного середовища здійснюють кожні 23,5-24,5 години. Органну культуру відмивають 5-8 разів нагрітим до  $27-29^{\circ}\text{C}$  фізіологічним розчином і використовують як складовий елемент комбінованого ксенотрансплантату хворим на цукровий діабет у кількості 1-1,5 г. Життєздатність культури контролюють за допомогою гістологічного дослідження.

Біотрансплантат для лікування цукрового складається з органної культури підшлункової залози та органної культури печінки, отриманих за вище зазначеними технологіями при співвідношенні, % ваг., органна культура підшлункової залози 25-30%, органна культура печінки 8-10%, решта - фізіологічний розчин.

Біотрансплантат вводять хворому на цукровий діабет у підшкірну жирову клітковину передньої черевної стінки на 4-6 см вище пупка через спільний (один) ін'єкційний канал: спочатку вводиться органна культура підшлункової залози у 4-5 напрямках від ін'єкційної точки, а потім на 1-1,5 см нижче останньої так само вводиться органна культура печінки. Культури вводяться у ваговому співвідношенні 3:1. Загалом діаметр сумісного трансплаційного поля складає 2-2,5 см, що забезпечує реалізацію безпосередньої взаємодії  $\beta$ -клітин та гепатоцитів *in situ*. При сумісній трансплантації запропонованим способом приживлення трансплантату відбувається на 2-3 дні раніше, а ефект трансплантації за клінічними та гормональними показниками (інсулін, С-пептид) подовжується на 7-8 місяців (спостерігається протягом 15-16 місяців), порівняно із таким при трансплантації лише органної культури підшлункової залози.

Таким чином, запропоновані умови одержання органної культури підшлункової залози та органної культури печінки та подальший їх сумісній трансплантації придатні для лікування хворих на цукровий діабет.

Приклад виконання за винаходом

Приклад 1. Культивування тканини підшлункової залози.

Спосіб здійснюється наступним чином. Виділену у стерильних умовах у новонароджених поросят хвостову частину підшлункової залози (період ішемії 2-5хв.) вміщують у флакон із охолодженням ( $4^{\circ}\text{C}$ ) розчином Хенкса і промивають останнім 2-3 рази. Потім тканинний матеріал подрібнюють до фрагментів діаметром  $0,4-0,7$  мм і

відмивають (до 5 разів) охолодженим розчином Хенкса із антибіотиком (цефазолін «Дарниця» або CF-тріаксон, 1мг/100мл) і вмішують на 1год в холодильник при температурі 4°C. Після чого у кожний флакон наливають живильне середовище складу: середовище 199 (60%), середовище RPMI-1640 (30%), ембріональна теляча сироватка (10%) та антибіотик цефазолін 0,5мг/100мл середовища. Вагове співвідношення тканина:живильне середовище дорівнює 1:6. Матеріал культивують у ротаційному апараті при температурі 26°C протягом 5 діб. Заміну культурального середовища проводять кожні 12 годин. Після закінчення строку культивування тканину підшлункової залози 5-8 разів відмивають фізіологічним розчином кімнатної температури (20-22°C) 1 передають для трансплантації.

Приклад 2. Культивування тканини печінки.

Спосіб здійснюється наступним чином. В стерильних умовах у новонароджених поросят видаляють печінку. Для культивування використовується тканина із розташованої вище жовчного міхура зони печінки, яку попередньо поділено на 3-5 часток, вага кожної з яких дорівнює 200-205мг. Кожну частку вміщують в окремий флакон із охолодженим до 4°C гідролізатом лактальбуміну. Після 5 разового відмивання тканину подрібнюють до фрагментів діаметром 0,6-0,8мм. Отриману суспензію переносять у інший стерильний флакон та відмивають охолодженим до 4°C розчином Хенкса (7-8 разів) до отримання прозорої надосадної рідини, яку потім зливають. Відмитий тканинний матеріал заливають живильним середовищем складу: гідролізат лактальбуміну - 60%, середовище Ігла MEM - 35% та ембріональна теляча сироватка - 5%. Флакони вміщують у холодильник при температурі 4°C матеріал культивують за таким температурним режимом протягом 4-6 діб. Заміну живильного середовища здійснюють кожні 24 години в один і той же час. Після закінчення культивування отриману органну культуру 6-8 разів відмивають нагрітим до 28-29°C 0,9% фізіологічним розчином і використовують для трансплантації хворим на цукровий діабет у кількості 1,0-1,5г.

Приклад 3. Культивування тканини підшлункової залози із тканиною печінки новонароджених поросят.

Для визначення впливу гепатоцитів на функціональну активність  $\beta$ -клітин через 36год культивування до органної культури підшлункової залози додавали культивовану того ж строку тканину печінки у ваговому співвідношенні 1:0,5 та 1:1. Сумісне культивування проводили до 5 діб. При сумісному культивуванні рівень інсуліну у культуральному середовищі значно підвищується -  $74,98 \pm 1,90$  од./мл та  $78,9 - 5,9$  од./мл, відповідно, контроль -  $21,4 \pm 2,4$  мк од./мл. Спостерігається підвищення функціональної активності  $\beta$ -клітин, за даними морфометричного аналізу виявляються ознаки гіпертрофії  $\beta$ -клітин та їх ядер об'єм їх збільшується на 15-20% порівняно із контролем, ступінь деструктивних змін менш виразна.

Порівняльна оцінка ефективності різних способів та комбінацій трансплантації органних культур хворим

Органні культури підшлункової залози та печінки новонароджених поросят вводять (трансплантують) хворим на цукровий діабет за допомогою одноразового шприца об'ємом 20 мл із товстою голкою (типу голки Дюфо) у підшкірну жирову клітковину передньої черевної стінки на 4-6 см вище пупка рівними порціями кожну окремо або в певних комбінаціях (сумісно):

а) Органні культури підшлункової залози та печінки після роздільного культивування вводили кожну окремо по різні сторони від пупка. У таких хворих спостерігався легкий больовий синдром та виразна гіперемія шкіри у місці введення культури печінки. Тривалість клінічного ефекту спостерігалась протягом 5-6,5міс.

б) Тканину підшлункової залози та тканину печінки культивували протягом 4,5 діб окремо, потім об'єднували в один флакон і культивували сумісно протягом 12 годин. Після трансплантації сумісної органної культури у хворих виявляються ознаки гіперемії та набряк у місці введення, але больовий синдром відсутній. Тривалість клінічного ефекту складає 6-7міс.

в) Органні культури підшлункової залози і печінки вводяться через спільний (один ін'єкційний) канал. Спочатку вводиться органна культура підшлункової залози у 4-5 напрямках від ін'єкційної точки, а потім (голка залишається на місці) тим же шприцом на 1-1,5см нижче ін'єкційної точки також у 4-5 напрямках вводиться органна культура печінки. У всіх хворих відсутній больовий синдром та місцева реакція, а клінічний ефект спостерігається протягом 1-12 місяців. Таким чином, в організмі хворого створюється (формується) локальний біотрансплантат, в якому завдяки циркуляції тканинної рідини забезпечується можливість взаємовпливу та взаємодії між пулами різних типів клітин.

Вплив сумісної трансплантації органної культури підшлункової залози та органної культури печінки на перебіг цукрового діабету у хворих.

Дослідження проведені на 8 хворих на інсулінзалежний цукровий діабет 1 типу віком від 21 до 57 років (середня тривалість захворювання  $18,98 \pm 0,86$  року). У всіх хворих відмічався лабільний перебіг захворювання у стадії медикаментозної субкомпенсації. Доза екзогенного інсуліну, який отримували хворі, складала від 41 од./добу до 80 од./добу, Середня добова доза дорівнювала  $51,3$  од./добу. Всім хворим було проведено сумісну трансплантацію 5-добової органної культури підшлункової залози і органної культури печінки новонароджених поросят у підшкірну жирову клітковину передньої черевної стінки живота через спільний ін'єкційний канал. Спочатку вводиться органна культура підшлункової залози у 5 напрямках від ін'єкційної точки, а потім на 1см нижче також у 5 напрямках вводиться органна культура печінки. Кількість трансплантаційного матеріалу, відповідно, дорівнювала 3-5г та 0,5-1,5г в залежності від маси тіла хворого. Після ксенотрансплантації хворі перебували в умовах стаціонару протягом 2

тижнів, отримуючи антигістамінну терапію та інсулін, доза якого була зменшена на 10-60%. Хворі були обстежені через 14 діб, 3міс., 6міс., 9міс., 12міс. та 14-15міс. після трансплантації. Слід зазначити, що больовий синдром був відсутній безпосередньо після операції у 7 хворих, лише у одного зник через 3 доби.

Компенсація цукрового діабету спостерігалася у 7 хворих через 10 днів, а у одного хворого через місяць після трансплантації. Через 7-14 діб після трансплантації рівень глікозованого гемоглобіну дорівнював  $8,45 \pm 0,69\%$  (що не відрізняється від такого перед трансплантацією). Через 3 та 6 місяців після трансплантації рівень глікозованого гемоглобіну складав  $8,62 \pm 0,27\%$  та  $6,77 \pm 0,43\%$  ( $p < 0,05$ ). Рівень холестерину був у межах, що відповідний до таких у здорових осіб.

У більшості випадків С-пептид у крові хворих до трансплантації не визначався або базальний рівень його був низьким ( $0,16 \pm 0,20$ нг/мл), а через 7-14 діб після ксенотрансплантації він дорівнював  $0,36 \pm 0,1$ нг/мл, через 3 місяці -  $0,97 \pm 0,23$ нг/мл, через 9 місяців -  $0,94 \pm 0,23$ нг/мл ( $p < 0,02$ , порівняно з контролем). Підвищення рівня С-пептиду у крові після ксенотрансплантації свідчить про її стимулюючу дію на  $\beta$ -клітини підшлункової залози реципієнта, при цьому слід зазначити, що ця реакція є більш виразною при комбінованій трансплантації.

У жодного із хворих після сумісної трансплантації не спостерігалось проявів гострого відторгнення трансплантату.

Найбільш виразний клінічний ефект спостерігався у хворих на цукровий діабет із лабільною формою перебігу.

Порівняльна оцінка ефективності відомого способу лікування цукрового діабету (ксенотрансплантація органної культури підшлункової залози) та запропонованого (сумісна ксенотрансплантація органних культур підшлункової залози та печінки) наведена у таблиці:

в порівнянні з таким при трансплантації монокультури.

Перелік використаних аналогів

1. Пат. РФ №2008953, МПК 5 А61N5/02, А61K3100. Способ лечения сахарного диабета // Горбунов О.М., Белокопытов Ю.Ю., Рововая Л.М. Заявл. 1990. Оpubл. 1994.
2. Пат. РФ №2095410, МПК 6 C12N35/00. Способ получения культуры эндокринной ткани // Кирпатовский И.Д., Каитова З.С., Лысенко А.И. Заявл. 1995. Оpubл. 1997.
3. Пат. РФ №2135193, МПК 6 А61K35/39. Способ получения материала, содержащего бета- клетки поджелудочной железы для трансплантации больным сахарным диабетом с использованием феномена миграции клеток // Скалецкий Н.Н., Шумаков В.И. Заявл. 1997. Оpubл. 1999, Бюл. 24.
4. Корпачев В.В., Онищенко Д.С. Стимулирующий эффект биологически активных веществ селезенки на функциональную активность гепатоцитов // Физиол. журн. - 1989. Т.35, №3. С.80-83.
5. Автор, свид. СССР №1578192, МПК 5 C12N5/00. Способ выращивания клеток печени // Осипова Л.А., Алексеева Т.А., Немлий Н.И., Быкорез А.И. и др. Заявл. 1988. Оpubл. 1990.
6. Пат. РФ №2153344, МПК 7 А61K35/407, А61P43/00. Способ трансплантации эмбриональных печеночных клеток в эксперименте // Тимебулатов В.М., Рахматуллин СИ., Хасанов А.Г. и др. - Заявл. 1999. Оpubл. 2000.
7. Пат. України №48859, МПК 6 А61В17/00. Спосіб трансплантаційного лікування ускладненого цукрового діабету // Кот О.Г., Турчин І.С., Гусак В.К., Андрієнко В.В. Заявл. 2002. Оpubл. 2002, №8.

Таблиця

Показники	Способи трансплантації	
	Монотрансплантація органної культури підшлункової залози (відомий)	Комбінована трансплантація (пропонований)
Суб'єктивне покращення стану хворих	Через 4-6 тижнів після трансплантації	Через 2-3 тижні після трансплантації
Стабілізація перебігу діабету	Через 2-3міс. після трансплантації	Через 1,4-2,0міс.
Зменшення дози екзогенного інсуліну	На 49-53%	На 60-65 %
Тенденція до зменшення мікро- та макроангіопатій	Через 3-4міс. після трансплантації	Через 2-2,5міс після трансплантації
Концентрація С-пептиду в крові хворих	$0,9 \pm 1,0$ мг/мл	$1,0-1,2$ мг/мл
Термін перебування хворого в стаціонарі	2-3 тижні	1,5-2 тижні
Тривалість терапевтичного ефекту	7-8міс.	14-16міс.

Таким чином, клінічні спостереження після сумісної ксенотрансплантації органної культури підшлункової залози та органної культури печінки свідчать про більш високий терапевтичний ефект