



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 103675

(13) C2

(51) МПК

A61K 35/407 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД**

(21) Номер заявки: а 2011 14305	(72) Винахідник(и): Сич Наталія Сергіївна (UA), Демчук Марія Петрівна (UA), Новицька Алла Володимирівна (UA), Архипенко Інна Володимирівна (UA)
(22) Дата подання заявки: 05.12.2011	(73) Власник(и): ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ "ЦЕНТР ЕМБРІОНАЛЬНИХ ТКАНИН "ЕМСЕЛЛ", вул. Сирецька, 37-а, м. Київ, 04073 (UA)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 11.11.2013	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: UA 42374 U 25.06.2009 UA 59678 A 15.09.2003 RU 2384345 C2 20.03.2010
(41) Публікація відомостей про заявку: 10.06.2013, Бюл.№ 11	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 11.11.2013, Бюл.№ 21	

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ РОЗСІЯНОГО СКЛЕРОЗУ**(57) Реферат:**

Винахід належить до галузі медицини, а саме до неврології і клітинної терапії, та може бути використаний при лікуванні хворих на розсіяний склероз. Спосіб лікування розсіяного склерозу включає заготівлю та трансплантацію суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин. Перед трансплантацією суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин попередньо виконують премедикацію шляхом внутрішньовенного введення 10 мг димедролу і 30 мг преднізолону. Як стовбурові клітини використовують стовбурові клітини фетальної печінки, що виділені з тканин трупа людського фетуса 4-8 тижнів гестації. При цьому суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки вводять внутрішньовенно в об'ємі не менше за 0,1 мл з кількістю клітин, що містять ядра, не меншою за $0,1 \times 10^8$ /мл, і вмістом прогеніторних клітин CD34 від 0,3 до $2,5 \times 10^6$ /мл за одну трансплантацію. Після проведення трансплантації суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки кожні три місяці здійснюють контроль активності патологічного процесу за клінічними, лабораторними показниками та даними нейровізуалізації.

UA 103675 C2

Винахід належить до галузі медицини, а саме до неврології і клітинної терапії, та може бути використаний при лікуванні хворих на розсіяний склероз.

Відомо, що розсіяний склероз (РС) - це хронічне прогресуюче захворювання центральної нервової системи, що клінічно проявляється розсіяною органічною неврологічною симптоматикою, зокрема патологією рухової, чутливої, координаційної сфер, розладами зору та порушенням функції тазових органів. РС є актуальною проблемою охорони здоров'я у всіх країнах внаслідок тяжких соціальних наслідків. Дане захворювання в основному уражає молодих людей працездатного віку, а в 70 % випадків РС вперше з'являється у віці 30 років. При цьому через 10 років 37 % хворих потребують сторонньої допомоги, а 80 % - не можуть працювати. Далі через 15 років кожен другий хворий не здатний самостійно пересуватись, а через 25 років - прикутий до ліжка [2, 4]. Особливо викликає стурбованість зростання захворюваності серед осіб молодого віку, що призводить до ранньої інвалідизації у найбільш працездатному віці. Тому питання своєчасної діагностики та ефективного лікування хворих на РС залишається актуальним для сучасної медицини, а соціальне значення цієї проблеми змушує клініцистів приділяти їй підвищену увагу [2].

Проте, незважаючи на великі досягнення у вивченні патогенезу РС, включаючи імунологічні та імуногенетичні дослідження з виходом на нові напрями патогенетичної терапії, це захворювання залишається однією з невирішених проблем сучасної неврології.

Причини виникнення РС на сьогоднішній день точно не з'ясовані. При цьому найбільш розповсюдженою є гіпотеза мультифакторіальної етіології РС. Допускають, що комбінація зовнішніх факторів діє на генетично схильних осіб, викликає хронічне запалення, аутоімунні реакції та демієлінізацію. Наявність в тканині головного та спинного мозку вогнищ демієлінізації або бляшок є визначальною межею РС. Велике значення в розвитку вказаних змін мають аутоімунні механізми. Вирішальну роль при запуску запальних та аутоімунних реакцій має підвищення рівня експресії молекул адгезії та антигенпрезентуючих молекул (HLA-молекул) на ендотелії судин мозку та гліоцитах. На ранніх стадіях утворення бляшки під впливом різних хемокінів відбувається активація Т-лімфоцитів в результаті впливу тригерних факторів. Потім імунні клітини проникають через гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ) в структуру центральної нервової системи, де запускають складний каскад запальних реакцій, переважно за участю Т-хелперів 1 типу, які призводять до демієлінізації нервових волокон та пошкодження аксонів.

Тому основні зусилля у лікуванні РС мають бути спрямовані на зниження гостроти процесу, ефективне попередження рецидивів, подовження тривалості ремісії, уповільнення темпу інвалідизації, а відтак - і підвищення функціональної активності та покращення якості життя хворих. Лікування РС на сучасному етапі базується на аутоімунній характеристиці цього захворювання з призначенням імуноотропних засобів. Оскільки за механізмом розвитку та типом клінічного перебігу РС є неоднорідним гетерогенним захворюванням, терапія таких хворих має бути диференційованою та ґрунтуватися на клініко-неврологічних, імунологічних характеристиках і даних магнітно-резонансної томографії залежно від типу перебігу, ступеня тяжкості та стадії захворювання.

Сучасні терапевтичні засоби, що застосовуються при лікуванні РС, поділяються на дві основні групи: засоби патогенетичної і симптоматичної терапії. Засоби патогенетичної терапії спрямовані на попередження деструкції тканини мозку активованими клітинами імунної системи, відновлення процесу мієлінізації нервових волокон з позитивним впливом на імунорегуляцію і стан ГЕБ.

Відомо, що при загостренні РС одним з основних підходів до лікування є призначення препаратів із групи кортикостероїдів. При цьому найбільш ефективними на сьогоднішній день є високі дози (пульс-терапія) глюкокортикоїдів. Зазвичай призначають наступне лікування: 1-5-й день - внутрішньовенно крапельно вводять 1000 мг метил преднізолону, 6-8-й день - 80 мг преднізолону всередину, 9-11-й день - 60 мг преднізолону всередину, 12-14-й день - 40 мг преднізолону всередину, 15-17-й день - 20 мг преднізолону всередину, 18-20-й - 10 мг преднізолону всередину. Або 1-5-й день - внутрішньовенно крапельно вводять 1000 мг метилпреднізолону, потім продовжують пероральний прийом метипреду коротким курсом (п'ятиденними циклами), поступово знижуючи дозу з 24 мг до 5 мг, або целестону 0,5 мг 2 рази на добу - 5 днів, потім 1 раз на добу - 5 днів, потім через день - 10 днів. Така схема введення високих доз глюкокортикоїдів має більш високу ефективність та суттєво зменшує побічні ефекти.

Глюкокортикоїди зменшують вираженість запальної реакції, набряку та відновлюють проведення нервового імпульсу по збережених волокнах, що і приводить до швидкого позитивного клінічного ефекту, але не впливають на перебіг захворювання у подальшому. Глюкокортикоїди мають також антиалергічну, імуносупресивну дію, є потужними індукторами

апоптозу лейкоцитів. Проте імунологічний ефект такого лікування не розповсюджується на клітинну активність та матриксну металопротеїназу в лікворі. У цьому разі інколи виникають побічні ефекти у вигляді шлунково-кишкових кровотеч та психічних розладів, переважно серед хворих з пероральним прийомом препарату. Серед інших побічних ефектів можна відмітити наступне: шлунково-кишковий тракт (стероїдні виразки шлунка та кишечника, кровотечі, перфорації, езофагіт, диспепсія); зі сторони кістково-м'язової системи (міопатія, остеопороз, патологічні переломи, компресійні переломи хребтів, асептичний некроз головки стегнової кістки); зі сторони шкіри (крововиливи, угрі, стрії, атрофія шкіри та підшкірної клітковини); зі сторони ендокринної системи (затримка статевого дозрівання, пригнічення гіпоталамо-гіпофізарно-наднирникової системи, порушення менструального циклу, стероїдний діабет, маніфестація латентного діабету); зі сторони серцево-судинної системи (гіпертензія); зі сторони центральної нервової системи (неврівноваженість, психоз, псевдопухлини мозку); зі сторони очей (глаукома, задня субкапсулярна катаракта, екзофтальм); метаболічні (гіперглікемія, гіперліпідемія, підвищення апетиту, кушингоїдний синдром, негативний азотистий баланс).

Новим напрямком патогенетичної терапії РС є попередження наступних загострень захворювання за допомогою методів довготривалої імунокорекції. Так, використання β -інтерферонів в лікуванні РС є одним із найбільш значимих досягнень в області вивчення даного захворювання в останні роки. До сімейства інтерферонів входить три основних види природних білків - α -, β - та γ -інтерферони. Вказані білки мають антивірусну та імуномодельючу дію, причому α - та β -інтерферони надають протизапальну дію, а γ -інтерферон є одним із основних запальних цитокінів, які активують імунну систему та стимулюють антиген-специфічні реакції. Існують обмеження в призначенні інтерферонів. Так, їх не призначають пацієнтам з первинно-прогресуючим перебігом, пацієнтам з легкими формами та доброякісним довготривалим перебігом захворювання (EDSS менше 1,5 балів), а також з тяжкими формами, коли EDSS складає більше 6,5 балів. Крім того, існує багато протипоказань щодо призначення даної групи препаратів: наявність у пацієнта відхилень від норми лабораторних показників, що може призвести до розвитку тяжких лікарських реакцій, наприклад, наявність виражених змін показників функції печінки та нирок, лейкопенія, моноклональна гамопатія; наявна або анамнестична депресія [2].

Основним недоліком відомого способу є його недостатня ефективність для збільшення тривалості ремісії, зменшення неврологічного дефіциту та недоказаний вплив на покращення когнітивної функції і якості життя хворого.

Відомий спосіб лікування РС, що включає концентрацію та збір периферичних гемопоетичних стовбурових клітин хворого методом лейкофорезу з використанням спеціальних фільтрів, причому для мобілізації периферичних гемопоетичних стовбурових клітин використовують колоній-стимулюючий фактор нейпоген у дозі 10 мг/кг протягом 3-4 днів, після чого в отриманий пул периферичних гемопоетичних стовбурових клітин додають кріопротектор та зберігають в рідкому азоті до трансплантації [1, 4]. Далі проводять етап кондиціонування з використанням супресивної терапії по методиці BEAM, а саме: кармустин 300 мг/м² в 1 день, цитозинарабіозин 200 мг/м² та етопозид 200 мг/м² на 3, 4 і 5 дні та мелхалан 140 мг/м² в останній день. Після цього здійснюють трансплантацію периферичних гемопоетичних стовбурових клітин. При цьому між етапами збору периферичних гемопоетичних стовбурових клітин хворого та кондиціонування існує проміжок часу, як правило, від 2 до 3 тижнів для нормалізації показників периферичної крові. Спосіб застосовують після того, як хворий пройшов загальноприйнятну терапію, а саме: солумедролом, потім інтерферони, але не вдалося досягти ні покращення загального стану, ні зменшення неврологічного дефіциту, ні ремісії, ні покращення когнітивних функцій.

Зазначений спосіб лікування РС дозволяє зменшити клінічні прояви захворювання, покращити лабораторні показники та покращити функціональні можливості хворого при забезпеченні зменшення частоти ускладнень та збільшенні тривалості ремісії у порівнянні з загальноприйнятим лікуванням.

Недоліком відомого способу лікування РС є висока частота тяжких ускладнень, таких як і при алогенній трансплантації, які у 2-4 % випадків призводять до смерті, що є наслідком жорсткого режиму кондиціонування. При цьому повторне введення периферичних гемопоетичних стовбурових клітин є імунобіологічно обмеженим.

Відомий спосіб лікування РС, що включає приготування суспензії, яка містить клітини людського ембріона, вибрані із групи, яка складається із гемопоетичних клітин печінки, гемопоетичних клітин селезінки і їх суміші, і фармацевтично прийнятне рідке середовище і 1 мл якої містить: ядромісні клітини 5-200x10⁶, колонієутворюючі одиниці гранулоцитів/макрофагів 20-200x10³, колонієутворюючі одиниці гранулоцитів, еритроцитів, моноцитів/макрофагів і

мегакаріоцитів $0,5-10 \times 10^3$ і ранні попередники гемопоєза CD 34+ $1-20 \times 10^6$ і щонайменше одноразове введення такої приготовленої ex tempore або замороженої при криогенних температурах і розмороженої після зберігання суспензії в організм реципієнта (патент України на винахід № 64826, дата публікації - 15.03.2004 р., кл. МПК 2006.01: A61K 35/54, A61K 35/407, A61K 35/28). При цьому поряд з основною суспензією виготовляють щонайменше одну додаткову суспензію, що містить клітини, вибрані із групи, яка складається з стовбурових клітин гемопоєза печінки, стовбурових клітин гемопоєза селезінки, гепатоцитів, тимоцитів, епітеліоцитів первісного харчового каналу, нервових клітин мозку і сумішей клітин щонайменше двох однозначних видів, і щонайменше одну таку додаткову суспензію вводять в організм пацієнта поряд з основною суспензією.

Зазначений спосіб лікування РС забезпечує отримання неочікуваного ефекту, що полягає у в подовженні тривалості ремісії, а в деяких випадках - і у клінічному одужанні деяких хворих, які раніше вважалися невиліковними, зокрема при лікуванні хворих із запущеними формами розсіяного склерозу.

Найбільш близьким до способу лікування РС, що заявляється, є спосіб лікування РС з використанням стовбурових клітин, що включає заготівлю, кріоконсервування та ін'єкційне введення стовбурових клітин, причому як стовбурові клітини застосовують алогенні ембріональні нейроклітини, які вводять реципієнту ендолумбально в кількості 30-40 млн. за одну трансплантацію, яких може бути 1-3 на курс лікування (деклараційний патент України на корисну модель № 15356, дата публікації - 15.06.2006 р., кл. МПК (2006): A61K 35/48).

Зазначений спосіб лікування РС дозволяє зменшити частоту несприятливих побічних ефектів та створити передумови для посилення локомоторної активності хворих на РС.

Недоліком відомого способу лікування РС є недостатня тривалість ремісії та незначне відновлення неврологічних функцій, зокрема, неврологічного дефіциту, когнітивних функцій та функціональних можливостей.

Отже, використання тільки зазначених способів лікування хворих на РС недостатньо, що і зумовило пошук альтернативних способів лікування.

Задачею даного винаходу є удосконалення способу лікування розсіяного склерозу, в якому за рахунок запропонованої послідовності проведення лікування забезпечується висока ефективність лікування при збільшенні обсягу відновлення неврологічних функцій та збільшенні тривалості ремісії без необхідності підбору донора за антигенами гістосумісності. В результаті - зменшується неврологічний дефіцит, покращуються когнітивні функції, якість життя та функціональні можливості хворих після лікування. Крім того, забезпечується запобігання виникненню алергійних реакцій у хворих на РС при проведенні лікування.

Поставлена задача вирішується запропонованим способом лікування розсіяного склерозу, що включає заготівлю та трансплантацію суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин, в якому перед трансплантацією суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин попередньо виконують премедикацію шляхом внутрішньовенного введення 10 мг димедролу і 30 мг преднізолону, а як стовбурові клітини використовують стовбурові клітини фетальної печінки, що виділені з тканин трупа людського фетуса 4-8 тижнів гестації, причому суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки вводять внутрішньовенно в об'ємі не менше за 0,1 мл з кількістю клітин, що містять ядра, не меншою за $0,1 \times 10^8$ /мл, і вмістом прогеніторних клітин CD34 від 0,3 до $2,5 \times 10^6$ /мл за одну трансплантацію, а після проведення трансплантації суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки кожні три місяці здійснюють контроль активності патологічного процесу за клінічними, лабораторними показниками та даними нейровізуалізації.

Краще, коли перед проведенням трансплантації суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки додатково виконують клініко-неврологічне, нейропсихологічне, імунологічне та нейровізуальне обстеження стану хворого.

У випадку загострення РС, перед проведенням трансплантації суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки додатково проводять медикаментозну терапію. При цьому як медикаментозну терапію призначають введення глюкокортикоїдів та проведення плазморефузії протягом 2-3 тижнів. А трансплантацію суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки проводять через 2-3 місяці після проведення медикаментозної терапії.

Нами було встановлено, що за рахунок введення суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки людини 4-8 тижневої гестації внутрішньовенно в об'ємі не менше за 0,1 мл з кількістю клітин, що містять ядра, не меншою за $0,1 \times 10^8$ /мл, і вмістом прогеніторних клітин CD34 від 0,3 до $2,5 \times 10^6$ /мл за одну трансплантацію, забезпечується відновлення мієлінізації аксонів та відновлюється проведення нервового імпульсу по збережених нервових волокнах, в результаті чого досягається збільшення обсягу відновлених неврологічних функцій

та збільшення тривалості ремісії без виникнення побічних ускладнень при високій ефективності лікування РС в цілому. При цьому виключається необхідність підбору донора за антигенами гістосумісності та забезпечується можливість трансплантації суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки повторно. Крім того, проведення перед трансплантацією суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки премедикації шляхом внутрішньовенного введення 10 мг димедролу і 30 мг преднізолону дозволяє запобігти виникненню алергійних реакцій у хворих на РС під час проведення лікування.

При цьому використання фетальної печінки з метою отримання стовбурових клітин визначається здатністю таких клітин зазнавати змін та диференціації у відповідь на оточуючий вплив або відповідно їх внутрішній програмі. Ця "пластичність" включає в себе ріст, розмноження, міграцію та встановлення зв'язків з іншими клітинами. Відомо, що фетальні клітини діляться частіше та швидше, ніж клітини зрілих тканин. Їх імплантація є більш ефективною також з огляду на утворення великої кількості ростових центрів. Фетальні клітини можуть виробляти значну кількість різних речовин, таких як ангіогенний і нейротрофічний фактори, які можуть сприяти виживанню та росту, або можуть прискорювати регенерацію за рахунок оточуючих клітин хазяїна. Багато фетальних клітин мають здатність виживати при більш низькому рівні кисню, ніж їх повністю диференційовані аналоги, що робить їх більш стійкими до ішемічного ушкодження як під час маніпуляцій *in vitro*, так і після трансплантації. Проліферуючі або незрілі клітини фетуса переважно не мають довгих відростків або сильної міжклітинної адгезії і, таким чином, менше зазнають травматизації під час приготування суспензії клітин. Ці властивості дозволяють трансплантувати фетальні клітини шляхом внутрішньовенної ін'єкції суспензії. Дані характеристики можуть пояснити і підвищене виживання фетальних клітин і тканин в порівнянні з дорослими після кріоконсервування. При цьому саме фетальна печінка є концентрованим джерелом гемопоетичних стовбурових клітин. Особлива перевага фетальної печінки як джерела гемопоетичних стовбурових клітин полягає в імунологічній незрілості цієї тканини.

Спосіб лікування РС здійснюють наступним чином.

Перед початком проведення лікування РС за допомогою проведення трансплантації суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки виконують клініко-неврологічне, нейропсихологічне, імунологічне та нейровізуальне обстеження стану хворого.

При цьому в період загострення хворому на РС перед проведенням трансплантації суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки додатково проводять медикаментозну терапію. Для цього призначають глюкокортикоїди та проводять плазмореффузію протягом 2-3 тижнів. А саму трансплантацію суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки проводять через 2-4 місяці.

Перед проведенням лікування РС здійснюють заготівлю суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки. Для цього використовують стовбурові клітини фетальної печінки, які виділені з тканин трупів людського фетуса 4-8 тижнів гестації, що загинули внаслідок медичного абортів в тих випадках, коли вагітність переривали за соціальними показниками при відсутності патології розвитку чи інфікованості фетуса. Вказані фетуси отримують при штучному перериванні вагітності у здорових жінок, які пройшли обстеження на наявність вірусних та гемічних інфекцій. При цьому проводять пренатальну діагностику фетуса на наявність сифілісу, гепатитів В, С та ВІЛ-інфекції.

Збір фетусів або фрагментів фетальних тканин та їх обробку проводять в операційній з дотриманням правил асептики та антисептики. Фетуси або фрагменти фетальних тканин переносять в стерильну посудину з розчином Хенкса з антибіотиком. Далі роботу проводять в стерильних умовах боксу. Фетуси або фрагменти фетальних тканин переносять в стерильні чашки Петрі з розчином Хенкса з антибіотиком, де обережно розкривають черевну порожнину і відокремлюють фетальну печінку. За допомогою ножиць фетальну печінку розрізують на невеликі фрагменти та подрібнюють до отримання однорідної маси. Отриману тканину фетальної печінки переносять в гомогенізатор Поттера та гомогенізують в розчині Хенкса. Клітини фетальної печінки змивають зі стінок та товчачки гомогенізатора розчином Хенкса в мірні пробірки, пропускаючи через фільтр для переливання крові, а потім через голки щоразу меншого діаметра.

Отриману суспензію, яка містить стовбурові клітини фетальної печінки, продукти життєдіяльності клітин, розливають в поліетиленові стерильні пробірки об'ємом 0,3-1,8 мл та додають кріопротектор. Як кріопротектор використовують 10 % диметилсульфоксид. Пробірки маркують. Після чого проводять кріоконсервацію суспензії стовбурових клітин фетальної печінки за програмою, яка забезпечує високу функціональну активність клітин. Така кріоконсервація забезпечує тривале зберігання вказаної суспензії та дозволяє протягом

необхідного часу провести дослідження для визначення інфікованості фетуса та взятих від нього клітин. При цьому готову суспензію стовбурових клітин фетальної печінки досліджують на бактеріальну стерильність, наявність вірусних та паразитарних інфекцій (Enzygnost Anti-HIV1/-HIV2, HbsAg, Anti-HBc, Anti-CMV/IgG+IgM, Anti-Rubella Virus/IgG, Varicella/Zoster, Toxoplasmosis/IgG, IgM).

При формуванні банку фетальних тканин для лікування хворих на РС суспензія стовбурових клітин фетальної печінки повинна мати наступні параметри: вміст клітин, що містять ядра (підрховують загальну кількість клітин, які містять ядра, в одиниці об'єму за допомогою клітинного аналізатора чи візуально під мікроскопом в лічильній камері), повинен становити не менш ніж $0,1 \times 10^8$ /мл суспензії; вміст прогеніторних клітин CD34 (визначають методом непрямого імунофлуоресцентного тесту з моноклональними антитілами) повинен складати від 0,3 до $2,5 \times 10^6$ /мл суспензії; вміст живих клітин після кріоконсервування - 70 %. Суспензії стовбурових клітин фетальної печінки зберігають в кріобанку в рідкому азоті при температурі -196°C .

Пробірки, що містять суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки, безпосередньо перед трансплантацією виймають з рідкого азоту, занурюють у водяну баню при температурі $+37^\circ\text{C}$ та витримують до появи рідкої фази. Подальші маніпуляції проводять при кімнатній температурі з суворим дотриманням правил асептики. Час перебування розмороженої суспензії при кімнатній температурі не повинен перевищувати 2 годин.

Далі перед трансплантацією суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки виконують премедикацію шляхом внутрішньовенного введення 10 мг димедролу і 30 мг преднізолону через систему для переливання крові. Після чого разом із фізіологічним розчином вводять внутрішньовенно суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки зі швидкістю 20-40 крапель за хвилину. Об'єм лікувальної дози для однієї трансплантації підбирають індивідуально, але не менше за 0,1 мл з кількістю клітин, що містять ядра, не меншою за $0,1 \times 10^8$ /мл і вмістом прогеніторних клітин CD34 від 0,3 до $2,5 \times 10^6$ /мл. Така кількість клітин забезпечує необхідну якість суспензії та достатня для отримання високої ефективності лікування.

Після проведення трансплантації суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки хворий знаходиться під спостереженням. Обов'язково після проведення трансплантації суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки кожні три місяці здійснюють контроль активності патологічного процесу за клінічними, лабораторними показниками та даними нейровізуалізації. При цьому точки спостереження вибирають згідно з протоколом трансплантації фетальної клітинної суспензії, розробленого на основі клінічного досвіду. При проведенні повторної трансплантації суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки у випадках, коли рівень активності патологічного процесу зберігається або підвищується, контроль активності патологічного процесу за клінічними, лабораторними показниками та даними нейровізуалізації проводять таким же чином, як і при першій трансплантації.

Ефективність лікування оцінюють за зменшенням неврологічного дефіциту, покращенням когнітивних функцій, якості життя, функціональних можливостей хворих та продовженням тривалості ремісії. Віддалені результати лікування оцінюють шляхом виявлення наявності вогнищ та атрофічного процесу при нейровізуалізації.

Винахід, що заявляється, пояснюється наступними прикладами.

Приклад 1. Хвора К., історія хвороби № 2312. Знаходилась в блоці клітинної терапії на базі Київської міської клінічної лікарні швидкої медичної допомоги (КМКЛШМД) з приводу лікування РС, цереброспінальна форма, нижня пірамідна недостатність. Вважає себе хворою з 2008 року, коли з'явилися скарги на слабкість в ногах, відчуття "скутості" в ногах, хиткість при ході.

На початку захворювання хвора приймала високі дози глюкокортикоїдів (пульс-терапія). Після лікування за даними магнітно-резонансної томографії головного мозку збереглися активні вогнища демієлінізації.

За даними клініко-неврологічного, нейропсихологічного, імунологічного та нейровізуального обстеження виявлено: очні щілини, зіниці D=S, горизонтальний ністагм при погляді вліво, двоїння при погляді прямо; девіація язика вліво, ковтає самостійно; сухожилкові рефлекс D<S з рук, з ніг; лівобічна гемігіпостезія; підвищений м'язовий тонус зліва; пальце-носову та коліно-п'яткову проби виконує з інтенцією з двох сторін; адіадохокінез; симптом Штрюмпеля позитивний з двох сторін; хиткість в позі Ромберга. За даними шкали EDSS - 4,5 бала. Відмічено зниження когнітивних функцій за даними шкали MMSE - 26 балів. Проведено імунологічне дослідження крові в динаміці (таблиця № 1).

Перед трансплантацією хворій була виконана премедикація шляхом внутрішньовенного введення 10 мг димедролу і 30 мг преднізолону. Далі проведена трансплантація суспензії

кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки в об'ємі 3,0 мл шляхом струменевого внутрішньовенного крапельного введення. Характеристика введеної суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки: зразок П 254, вік фетуса - 8 тижнів гестації; кількість клітин, які містять ядра, - 50×10^6 /мл, вміст прогеніторних клітин CD34 - $2,1 \times 10^6$ /мл.

Після проведеного лікування РС шляхом трансплантації суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки відмічено зменшення м'язового тону, зменшення неврологічного дефіциту за даними шкали EDSS - 3,5 бала та відмічено покращення когнітивної функції за даними шкали MMSE - 28 балів. Спостерігалось покращення якості життя за даними тесту SF-36 в наступних субтестах: духовній сфері та соціальній адаптації. Відмічено покращення імунологічних властивостей крові. Протягом перших кількох діб після повторної трансплантації спостерігався синдром раннього після трансплантаційного покращання, який проявлявся зменшенням загальної слабкості, збільшенням працездатності, енергії, покращанням сну та апетиту.

Таблиця 1

Показники	Норма	До лікування	Після лікування		
			Через 3 місяці	Через 6 місяців	Через 12 місяців
В-лімфоцити - CD19+, %	5,00-15,00	12,40	12,70	10,55	6,35
$\times 10^9$ /л	0,21 \pm 0,08	0,20832	0,2363	0,1372	0,1778
Т-лімфоцити - CD3+, %	50,00-75,00	53,45	55,00	52,20	53,25
$\times 10^9$ /л	1,34 \pm 0,02	0,89796	1,023	0,6786	0,9878
Т-хелпери - CD4+, %	25,00-40,00	35,80	33,05	33,05	31,60
$\times 10^9$ /л	0,86 \pm 0,01	0,60144	0,6148	0,4267	0,5862
Т-супресори - CD8+, %	20,00-35,00	17,00	22,45	18,70	21,30
$\times 10^9$ /л	0,52 \pm 0,01	0,2856	0,4175	0,2431	0,3952
NK-натуральні кілери %	5,00-15,00	8,30	11,40	12,26	5,80
CD16+ $\times 10^9$ /л	0,39 \pm 0,01	0,13944	0,2121	0,1594	0,1076
хелперно-супресорне співвідношення CD4+/CD8+	0,90-2,40	2,10	1,47	1,77	1,48
лейкоцити, $\times 10^9$ /л	4,0-8,8	5,6	6,0	5,2	3,5
лімфоцити, %	19-37	30	31	25	53
абс. лімфоцити, $\times 10^9$ /л	1,2-3,0	1,68	1,86	1,3	1,855

Приклад 2. Хвора В., історія хвороби № 2145. Знаходилась в блоці клітинної терапії КМКЛШМД з приводу лікування РС, ремітуючий перебіг, цереброспінальна форма, нижній спастичний парепарез, мозочково-атактичний синдром.

Вважає себе хворою з 2001 року, коли з'явились скарги на оніміння лівої половини грудної клітини та лівої руки. Діагноз встановлений в 2006 році, коли з'явився ретроульбарний неврит. Діагноз підтверджений магнітно-резонансною томографією головного мозку.

На початку захворювання хвора приймала циклоферон, тималін, гропрінозин та імунофан.

За даними клініко-неврологічного, нейропсихологічного, імунологічного та нейровізуального обстеження виявлено: всебічно орієнтована, зіниці D=S, горизонтальний дрібнорозмашистий ністагм вправо; язик по середній лінії; легкий парез VII пари черепномозкових нервів справа; дизартрія; сухожилкові рефлексі S>D з рук, D=S з ніг; брюшні рефлексі не викликаються; пальце-носову пробу виконує задовільно з двох сторін, коліно-п'яткову проби виконує з інтенцією зліва; чутливість - гіпестезія на лівій нозі; м'язовий тонус S>D з ніг; хиткість в позі Ромберга. Патологічних стопних знаків не виявлено. Ходить самостійно, самостійно себе обслуговує. Порушення функції тазових органів не виявлено. За даними шкали EDSS - 5,0 балів. Відмічено зниження когнітивних функцій за даними шкали MMSE - 25 балів. Проведено імунологічне дослідження крові в динаміці (таблиця № 2).

Перед трансплантацією хворій була виконана премедикація шляхом внутрішньовенного введення 10 мг димедролу і 30 мг преднізолону. Далі проведена трансплантація суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки в об'ємі 1,8 мл шляхом струменевого внутрішньовенного крапельного введення. Характеристика введеної суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки: зразок Т 608207, вік фетуса - 8 тижнів гестації, кількість клітин, які містять ядра, - 50×10^6 /мл, вміст прогеніторних клітин CD34 - $2,1 \times 10^6$ /мл.

- Після проведеного лікування РС шляхом трансплантації суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки відмічено зменшення неврологічного дефіциту за даними шкали EDSS - 3,5 бала та відмічено покращення когнітивної функції за даними шкали MMSE - 29 балів, відсутність активності процесу за даними магнітно-резонансної топографії головного мозку. Спостерігалось покращення якості життя за даними тесту SF-36 в наступних субтестах: духовній сфері, соціальній адаптації та фізичній активності. Поступово почали збільшуватись рухи в ногах, покращилась мова та відновилась чутливість в лівій нозі. Через 6 місяців після трансплантації активність захворювання не визначалась.

Таблиця 2

Показники	Норма	До лікування	Після лікування		
			Через 3 місяці	Через 6 місяців	Через 12 місяців
В-лімфоцити - CD19+, %	5,00-15,00	4,10	8,40	11,10	8,40
x10 ⁹ /л	0,21±0,08	0,07134	0,14322	0,1909	0,0823
Т-лімфоцити - CD3+, %	50,00-75,00	53,35	47,65	47,80	51,08
x10 ⁹ /л	1,34±0,02	0,92829	0,81243	0,8222	0,5006
Т-хелпери - CD4+, %	25,00-40,00	32,85	31,00	30,55	36,27
x10 ⁹ /л	0,86±0,01	0,57159	0,52855	0,5255	0,3554
Т-супресори - CD8+, %	20,00-35,00	20,50	16,05	18,20	17,33
x10 ⁹ /л	0,52±0,01	0,3567	0,27365	0,3130	0,1698
NK-натуральні кілери	5,00-15,00	9,30	6,20	7,75	9,60
CD16+	x10 ⁹ /л	0,39±0,01	0,10571	0,1333	0,0941
хелперно-супресорне співвідношення CD4+/CD8+	0,90-2,40	1,60	1,93	1,69	2,09
лейкоцити, x10 ⁹ /л	4,0-8,8	5,8	5,5	4,3	7,0
лімфоцити, %	19-37	30	31	40	14
абс. лімфоцити, x10 ⁹ /л	1,2-3,0	1,74	1,705	1,72	0,98

10

- Отже, з 2004 до 2011рр. в блоці клітинної терапії на базі Київської міської клінічної лікарні швидкої медичної допомоги було проліковано 83 хворих на РС згідно зі способом лікування РС, що заявляється. У всіх хворих спостерігався синдром раннього після трансплантаційного покращання у вигляді збільшення фізичної та розумової активності, зменшення м'язового тону, покращання сну, апетиту. Поступово знижувалась активність захворювання за клінічними та лабораторними показниками (таблиця № 3), покращились когнітивна функція, якість життя та зменшився неврологічний дефіцит. Ні в одному з випадків не спостерігались ускладнення чи побічна реакція та не спостерігалась реакція «трансплантат проти хазяїна» після проведення трансплантації суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки.

20

Таблиця 3

Шкали, бали	До лікування	Після лікування			
		Через 3 місяці	Через 6 місяців	Через 9 місяців	Через 12 місяців
EDSS, бали	6,72±0,25	6,01±0,53	4,72±0,25*	4,13±0,12*	4,01 ±0,23*
MMSE, бали	24,37±0,57	25,17±0,37	27,79±0,86*	28,05±0,32*	29,05±0,24*
SF-36, загальний бал	91,980,21	95,610,42	100,4	99,06±0,45	
- фізична сфера	8,40±0,21	9,34±0,43	10,23±0,52	11,2±0,42	13,5±0,5
- психологічна сфера	9,8±0,25	10,21 ±0,42	12,63±0,12	12,91±0,21	14,5±0,31
- рівень незалежності	10,1±0,23	10,78±0,41	11,24±0,34	12,4±0,51	13,8±0,38*
соціальні взаємовідношення	12,58±0,21	12,97±0,53	13,01±0,21	13,04±0,32	13,41±0,59
оточуюче середовище	13,1 ±0,24	13,52±0,31	13,87±0,61	14,02±0,21	14,4±0,12
- духовна сфера	12,52±0,31	12,87±0,21	13,1±0,42	13,6±0,57	15,2±0,39*
- рольове фізичне функціонування	13,7±0,34	13,9±0,52	14,02±0,42	14,6±0,34	14,32±0,51
- шкала болі	11,78±0,61	12,02±0,71	12,3±0,14	12,7±0,23	12,78±0,31

* p<0,05 - у хворих на розсіяний склероз після лікування відносно до хворих до лікування

Таким чином, запропонований спосіб лікування розсіяного склерозу дозволяє забезпечити високу ефективність лікування при збільшенні обсягу відновлення неврологічних функцій та збільшенні тривалості ремісії без необхідності підбора донора за антигенами гістосумісності. В результаті чого зменшується неврологічний дефіцит, покращуються когнітивні функції, якість життя та функціональні можливості хворих. Крім того, забезпечується запобігання виникнення алергійних реакцій у хворих на РС.

Джерела інформації:

1. А.А. Новик, А.Н. Богданов, М.М. Одинак, С.В. Волошин, Г.Н. Биссага. Опыт первых трансплантаций стволовых кроветворных клеток при рассеянном склерозе. // Клиническая онкология и гематология. - 2001. - №4. - С. 36.

2. Волошина Н.П. Сравнительная оценка эффективности отечественных и зарубежных интерферонов при рецидивирующем течении рассеянного склероза / Международный неврологический журнал. - 2010. - №2(32).- С. 19-24.

3. Patten S.B. Depressive symptoms in a treated multiple sclerosis cohort /S.B. Patten, S. Fridhandler, C.A. Beck, M.M. Luanne //Multiple Sclerosis. - 2003. - Vol. 9. - P. 616-620.

4. Karussis D. Use of Stem Cells for Treatment of Multiple Sclerosis /D. Karussis, I. Kassis//Expert Rev. Neurother. - 2007. - Vol.7(9). - P. 1189-1201.

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб лікування розсіяного склерозу, що включає заготівлю та трансплантацію суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин, який **відрізняється** тим, що перед трансплантацією суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин попередньо виконують премедикацію шляхом внутрішньовенного введення 10 мг димедролу і 30 мг преднізолону, а як стовбурові клітини використовують стовбурові клітини фетальної печінки, що виділені з тканин трупа людського фетуса 4-8 тижнів гестації, причому суспензію кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки вводять внутрішньовенно в об'ємі не менше за 0,1 мл з кількістю клітин, що містять ядра, не меншою за $0,1 \times 10^8$ /мл, і вмістом прогеніторних клітин CD34 від 0,3 до $2,5 \times 10^6$ /мл за одну трансплантацію, а після проведення трансплантації суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки кожні три місяці здійснюють контроль активності патологічного процесу за клінічними, лабораторними показниками та даними нейровізуалізації.

2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що перед проведенням трансплантації суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки додатково виконують клініко-неврологічне, нейропсихологічне, імунологічне та нейровізуальне обстеження стану хворого.

3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що перед проведенням трансплантації суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки додатково проводять медикаментозну терапію.

4. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що як медикаментозну терапію призначають введення глюкокортикоїдів та проведення плазморефузі.

5. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що медикаментозну терапію проводять протягом 2-3 тижнів.

6. Спосіб за п. 3, який **відрізняється** тим, що трансплантацію суспензії кріоконсервованих стовбурових клітин фетальної печінки проводять через 2-3 місяці після проведення медикаментозної терапії.

Комп'ютерна верстка А. Крулевський

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601