



СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(19) SU (11) 1258415 A1

(50) 4 A 61 K 37/26

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ СССР  
ПО ДЕЛАМ ИЗОБРЕТЕНИЙ И ОТКРЫТИЙ

# ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К АВТОРСКОМУ СВИДЕТЕЛЬСТВУ

(21) 3381600/28-14

(22) 10.02.82

(46) 23.09.86. Бюл. № 35

(71) Киевский научно-исследовательский институт эндокринологии и обмена веществ

(72) В. П. Комиссаренко, И. В. Комиссаренко, А. С. Ефимов, И. С. Турчин и А. Г. Лысенко

(53) 616.379.008.64(088,8)

(56) Проблемы эндокринологии, 1981, № 1, с. 25-30.

(54)(57) СРЕДСТВО ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА, содержащее культуру островковых клеток поджелудочной же-

лезы и физиологический раствор, отличающееся тем, что, с целью сокращения сроков лечения, оно содержит 8-12-дневную культуру островковых клеток поджелудочной железы новорожденных поросят и дополнительно сыворотку реципиента при следующем соотношении компонентов, мас. %:

|   |           |
|---|-----------|
| 8-12-дневная культура островковых клеток поджелудочной железы |           |
| новорожденных поросят   | 1,34-1,62 |
| Сыворотка реципиента  | 1,45-2,87 |
| Физиологический раствор                                       | Остальное |

US SU (11) 1258415 A1



Изобретение относится к медицине и касается средства для лечения сахарного диабета.

Цель изобретения - сокращение сроков лечения за счет подбора необходимого количества гормонально-активных островковых клеток и специфической их обработки.

Средство содержит 8-12-дневную культуру островковых клеток поджелудочной железы новорожденных поросят и дополнительно сыворотку реципиента при следующем соотношении компонентов, мас. %:

|   |           |
|---|-----------|
| 8-12-дневная культура островковых клеток поджелудочной железы новорожденных поросят | 1,34-1,62 |
| Сыворотка реципиента  | 1,45-2,87 |
| Физиологический раствор   | Остальное |

Средство получают следующим образом.

Выделенные в асептических условиях поджелудочные железы новорожденных поросят помещают в стерильную колбу с охлажденным до 4°C раствором Хенкса и антибиотиками (1000 ед/мл пенициллина и 1000 мкг/мл стрептомицина). В боксе железы переносят в стерильную чашку Петри и измельчают глазными ножницами на кусочки размером 0,5-1 мм. Перекладывают измельченную ткань в стерильную колбу и промывают раствором Хенкса до отхождения промывных вод. После промывания раствор Хенкса сливают, а колбу вносят 3-5 мл рабочего раствора коллагеназы (0,1% в 0,3%-ном растворе трипсина). Раствор фермента наливают с таким расчетом, чтобы измельченная ткань была покрыта слоем жидкости толщиной в 15-20 мм. В колбу опускают стерильный магнит, закрывают стерильной резиновой пробкой и ставят колбу на магнитную мешалку для перемешивания. Скорость перемешивания должна быть такой, чтобы над магнитом образовалась небольшая воронка, а в колбе не происходило образование пены. Дезагрегацию ткани проводят при температуре 25-27°C. Первую порцию клеток, отделившихся от кусочков ткани через 15-20 мин не используют. В дальнейшем через каждые 10 мин производят слив жидкости со взвешенными в ней клетками во флаконе емкостью 250 мл

с добавлением 50-70 мл среды 199 с 50% сыворотки для инактивации протеолитических ферментов. К оставшейся ткани вновь добавляют раствор фермента и ставят на магнитную мешалку для ее дальнейшей дезагрегации. Такую процедуру повторяют несколько раз в течение 30-40 мин. По мере заполнения флаконов производят центрифугирование в течение 10 мин при 600-700 об/мин. По окончании центрифугирования надосадочную жидкость сливают, а осадок ресуспендируют в питательной среде, которая состоит из равных объемов среды 199, 0, 5% гидролизата лактальбумина с добавлением 20% бычьей сыворотки и 100 ед/мл пенициллина. Взвесь клеток засевают во флаконы Карреля. Культивирование проводят при 37°C в течение 8-12 дней (время функциональной активности клеток), после чего начинается их постепенное физиологическое отмирание.

25

За 24 ч до пересадки состав питательной среды меняют. Для лучшего приживания трансплантата к равным объемам среды 199 и 0,5% гидролизата лактальбумина добавляют 1,5-3% сыворотки реципиента. Культуру, предназначенную для пересадки, отделяют от поверхности стекла при помощи 0,2%-ного раствора версена. С этой целью в культуральные флаконы вносят несколько миллиметров подогретого до 37°C раствора с таким расчетом, чтобы клетки были покрыты слоем жидкости толщиной в 1,5-2 мм. Затем их помещают в термостат при 37°C на 15-20 мин. В течение этого промежутка времени жидкость 3-4 раза осторожно перемешивают. Взвесь клеток отмывают от раствора версена питательной средой методом центрифугирования. Для трансплантации берут 50-70 млн. клеток культуры, добавляют 3-5 мл физиологического раствора и 0,045-0,15 мл (1,5-3%) сыворотки реципиента и вводят больному. Сыворотку реципиента получают за 24 ч до пересадки культуры  $\beta$ -клеток путем забора крови в стерильных условиях (8-10 мл). Затем кровь ставят в холодильник на 2 ч при 4-6°C для отстаивания. После образования сгустка крови последнюю центрифугируют 20 мин при 2000 об/мин,

30

35

40

45

50

55

Полученная сыворотка готова к применению.

При цитологическом анализе культур островковых клеток поджелудочной железы новорожденных поросят обнаружено 4 периода их развития: адаптационный (2-24 ч), интенсивного роста (2-7 дней), стабилизации (8-12 дней) и физиологического отмирания (с 13 дня). Длительность этих периодов зависит от количества посеянных клеток. Наибольшее количество инсулина изучаемая культура выделяет в период стабилизации (8-12 дней). За первые 7 сут культура выделяет 65-80 мке/мл инсулина, на 8-12 сут. - 110-280 мке/мл инсулина. Начиная с 13 дня количество инсулина прогрессивно уменьшается и на 13-20 день в культуральной среде определяют 30-40 мке/мл инсулина, последний определяют радиоиммунологическим методом.

**Пример 1.** В случае трансплантации культур с низким содержанием ингредиентов (островковых клеток 1,34 мас.%, сыворотки реципиента 1,45 мас.%, остальное - физиологический раствор) недостаточная эффективность способа связана с малым количеством  $\beta$ -клеток, сниженной адаптацией культур клеток в организме реципиента.

Больной Я., 43 года. Производят трансплантацию островковых клеток поджелудочных желез новорожденных поросят (70 млн) с содержанием сыворотки 1,34 мас.%. До трансплантации потребность в инсулине составляла 90 ед в сутки при колебаниях гликемии от 6,1 до 11,3 ммоль/л. Спустя 2 недели после трансплантации на фоне улучшения общего состояния суточная доза инсулина уменьшилась до 76 ед., колебания уровня гликемии в пределах 4,2-6,4 ммоль/л. Относительно удовлетворительное состояние наблюдалось в течение 4-6 мес.

**Пример 2.** При трансплантации культур с высоким содержанием

ингредиентов (островковых клеток 1,62 мас.%, сыворотки реципиента 2,87 мас.%, остальное - физиологический раствор) снижение эффективности применения способа обусловлено токсическим влиянием значительных концентраций сыворотки реципиента на  $\beta$ -клетки. Больная Б. Производят трансплантацию культур островковых клеток поджелудочных желез новорожденных поросят (120 млн) с содержанием сыворотки 2,87 мас.%. До трансплантации суточная потребность в инсулине составляла 46 ед., колебания уровня гликемии 6,1-16,3 ммоль/л. В течение 3 мес после проведенной ксенотрансплантации суточная потребность в инсулине уменьшилась до 32 ед, колебания уровня гликемии в пределах 3,6-12,3 ммоль/л.

**Пример 3.** Более благоприятное влияние на течение сахарного диабета отмечено при трансплантации средства с оптимальным содержанием ингредиентов (островковых клеток 1,48 мас.%, сыворотки реципиента 2,16 мас.%, остальное - физиологический раствор).

Больная К., 20 лет производят трансплантацию культур островковых клеток поджелудочных желез новорожденных поросят (90 млн) с содержанием сыворотки 2,16 мас.%. Перед трансплантацией потребность в инсулине 210 ед. с колебаниями гликемии 4,4-16,3 ммоль/л при крайне лабильном течении заболевания. В течение 6-8 мес после трансплантации потребность в инсулине не снизилась до 76 ед, течение заболевания приобрело стабильный характер.

Сравнительная оценка эффективности предлагаемого и известного способов лечения сахарного диабета посредством трансплантации культуры островковых клеток поджелудочных желез плодов человека и культуры островковых клеток поджелудочных желез новорожденных поросят приведена в таблице.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

| Показатели   | Способ                                |                                       |
|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
|  | Известный                             | Предлагаемый                          |
| Субъективное улучшение общего состояния больного                                 | Через 3 мес. после трансплантации     | Через 4-6 недель после трансплантации |
| Стабилизация течения диабета   | Через 5-6 мес. после трансплантации   | Через 2-3 мес. после трансплантации   |
| Появление тенденции к снижению дозы экзогенного инсулина                         | Через 40-50 дней после трансплантации | Через 6-10 дней после трансплантации  |
| Уменьшение суммарной дозы инсулина   | На 40-44%                             | На 50-54%                             |
| Регресс полинейропатий, ангиопатий, нефропатий                                   | После 8 мес. после трансплантации     | Через 3-4 мес. после трансплантации   |
| Сокращение сроков стационарного лечения. Продолжительность стационарного лечения | 1-1,5 мес.                            | 2-3 недели                            |

Составитель М. Позняк

Редактор С. Патрушева

Техред И. Верес

Корректор С. Черни

Заказ 5052/4

Тираж 660

Подписное

ВНИИПИ Государственного комитета СССР

по делам изобретений и открытий

113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5

Производственно-полиграфическое предприятие, г. Ужгород, ул. Проектная, 4