



УКРАЇНА

(19) UA (11) 41303 (13) C2

(51) 7 A61K35/54, A61K35/407, A61P7/06

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

### (54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ АПЛАСТИЧНОЇ АНЕМІЇ

(21) 94042152

(22) 04.04.1994

(24) 17.09.2001

(46) 17.09.2001, Бюл. № 8, 2001 р.

(72) Смикодуб Олександр Іванович, Третяк Наталя Миколаївна, Новицька Алла Володимирівна, Снігирь Наталя Валентинівна

(73) ЦЕНТР ЕМБРІОНАЛЬНИХ ТКАНИН "ЕМ-СЕЛЛ", UA

(56) Грищенко В.И., Лобынцева Г.С., Вотякова И.А. и др. Гемопозитические клетки эмбриональной печени // К.: Наук. думка, 1988.

Клиническое применение криоконсервированных гемопозитических клеток эмбриональной печени человека // Методические рекомендации МЗ Украины, 1991, 9 с.

Бибешко В.Г., Макарецца Т.М., Киреева С.С. Оценка клинической эффективности транспланта-

ции клеток аллогенной эмбриональной печени человека в комплексном лечении детей, больных гипопластической анемией // Гематология и переливание крови, 1984, вып. 19, С. 17-21

(57) 1. Способ лечения апластической анемии, включающий парентеральное введение нативных или криоконсервированных гемопозитических клеток эмбриональной печени человека, **отличающийся** тем, что больному предварительно подсаживают в подкожную жировую клетчатку кроветворную печень и/или селезенку по меньшей мере одного эмбриона человека.

2. Способ по п. 1, **отличающийся** тем, что перед подсаживанием кроветворную печень и/или селезенку помещают в мешочек, изготовленный из амниотической оболочки плаценты.

Изобретение относится к медицине и может быть использовано в клинике для лечения больных апластической анемией, анемий другого происхождения, связанных с дефицитом выработки эритропоэтина (геморосткового фактора).

Апластические анемии объединяют группу заболеваний, основным признаком которых является резкое угнетение костно-мозгового кроветворения, что приводит к развитию панцитопении.

Известно, что в печени и селезенке эмбриона человека в возрасте от 5 до 24 недель происходит кроветворение с высоким содержанием популяции стволовых клеток. Эритропоэз стимулируют гемопозитические факторы роста подобные эритропоэтину, выделяемые эмбриональными тканями печени и селезенки.

Имплантация эмбриональной печени и (или) селезенки человека в амниотической оболочке или прямо в подкожную клетчатку проводится с целью создания депо гемопозитических факторов роста, особенно эритроидного ряда и задействует 2 момента:

1) усиливает гемопоз (эритропоэз) костного мозга реципиента;

2) является источником ростовых факторов для гемопозитических клеток эмбриональной печени человека.

Наиболее близким по техническому решению к предлагаемому является способ восстановления кроветворения у больных апластическими анемиями, включающий введение криоконсервированных с поливинилпирролом кроветворных клеток эмбриональной печени человека (Бибешко В.Г. и др., 1984 г.). Использовали аллогенные клетки эмбриональной печени, взятые от нескольких эмбрионов, у детей с гипоплазией костного мозга. Клинико-гематологическая ремиссия носила транзиторный характер. Улучшение клинических и гематологических показателей в течение 7-10 месяцев наблюдали у 3-х из 11 больных.

Однако данному способу присущи недостатки:

1. Одновременное использование гемопозитических клеток нескольких эмбрионов;

2. Отсутствие депо гемопозитических веществ, которые стимулировали бы кроветворение как реципиента, так и подсаженных эмбриональных гемопозитических клеток.

В основу изобретения положена задача разработки способа лечения апластических анемий, в котором путем создания более лучших условий жизнедеятельности трансплантата достигается восстановление кроветворения и переход в стадию ремиссии.

(19) UA (11) 41303 (13) C2

Способ осуществляется следующим образом.

Эмбриональную печень и селезенку, извлеченную стерильно из цельного эмбриона возрастом 5-14 недель, полученного во время искусственного аборта, промывают раствором Хэнкса с антибиотиком. Из амниотической оболочки посредством кисетного шва кетгутом формируют мешочки размерами 3х3 см и помещают в него одну или несколько эмбриональных печеней, а также одну или несколько селезенок. Затем под местной анестезией подшивают мешочек в подкожную жировую клетчатку живота больного. Эмбриональные печень и(или) селезенка могут имплантироваться в подкожную жировую клетчатку реципиента и без мембранного покрытия.

Через 7-10 дней после имплантации и заживления раны первичным натяжением вводят внутривенно или другим путем нативные или криоконсервированные гемопоэтические клетки эмбриональной печени человека, учитывая возраст эмбриона, количество КОЕ бл., количество СД<sub>34</sub>, вид и степень выраженности клинических проявлений, а также наличие относительных противопоказаний к внутривенному введению клеток - наличие васкулитов, поражения сосудов сетчатки глаза, гипертония малого круга кровообращения.

Проводится исследование на бактериальную стерильность, наличие вирусных и паразитных инфекций (Enzygnost Anti-HIV1/-HIV2, HBsAg, Anti-HBc, Anti-CMV/IgG+IgM, Anti-Rubella Virus/IgG, Varicella/Zoster, Toxoplasmosis/IgG, Toxoplasmosis/IgM).

Эффект способа оценивается по:

- общему анализу крови, включающему определение ретикулоцитов, тромбоцитов;
- наличию в периферической крови ядерного сдвига влево;
- данным миелограмм;
- определению фетального гемоглобина в эритроцитах периферической крови.

По данному способу пролечено 3 больных. Способ поясняется следующими примерами.

#### Пример 1

Больная С., 1944 г. рождения, поступила в гематологическое отделение № 1 ЦРКБ № 25 г. Киева 23.03.1993 г. с диагнозом: Апластическая анемия. История болезни № 3768.

Основные жалобы при поступлении: слабость, пятнисто-петехиальная сыпь на коже, десневые кровотечения, одышка при физической нагрузке. Считает себя больной с августа 1992 г. Лечилась в гинекологическом отделении с 25.11.1992 г. по 15.12.1992 г. по поводу маточного кровотечения, постгеморрагической анемии. Диагноз апластической анемии установлен в марте 1993 г.

Анализ периферической крови и данные миелограмм приведены в табл. 1, 2.

Больной проводилось следующее лечение: преднизолон 60 мг, лейкоген, аспаркам, поливитамины, этамзилат. В связи с отсутствием эффекта от проводимой терапии, 13.04.1993 г. проведена имплантация печени эмбриона 9 недель в амниотической оболочке в подкожную жировую клетчатку живота. Постимплантационный период

прошел без осложнений. На 11 день отмечался подъем гемоглобина до 70 г/л.

23.04.1993 г. была проведена трансплантация гемопоэтических клеток эмбриональной печени. Возраст эмбриона - 11 недель, объем введенных клеток - 2 мл, клеточность -  $50 \times 10^6$ /мл, КОЕ бл. -  $1 \times 10^3$ /мл, СД<sub>34</sub>-11,2 x  $10^4$ /мл. Способ введения - внутривенный.

Трансплантацию больная перенесла удовлетворительно. Никаких реакций в момент трансплантации не отмечалось. Синдром раннего посттрансплантационного улучшения не был выражен. Существенной динамики в показателях периферической крови в ранние сроки не было выявлено. При выписке сохранялась панцитопения, хотя общее состояние больной было относительно удовлетворительным.

Больная прекратила прием преднизолона, несмотря на это, состояние больной медленно улучшалось: меньше слабость, реже возникали и быстрее проходили синяки на коже. В анализах периферической крови отмечено повышение количества гемоглобина, эритроцитов, ретикулоцитов, тромбоцитов. Клиническая и гематологическая ремиссия сохраняется на день подачи заявки.

#### Пример 2

Больной О., 25 лет, поступил в гематологическое отделение № 1 ЦРКБ № 25 г. Киева 31.03.1993 г. с диагнозом: Апластическая анемия.

Основные жалобы при поступлении: слабость, одышка при небольшой физической нагрузке, сердцебиение.

Страдает апластической анемией с января 1993 г.

Анализ периферической крови и данные миелограмм приведены в табл. 3, 4.

Больному проводилось следующее лечение: преднизолон 60 мг, аспаркам, гемотрансфузии, анаболические гормоны. В связи с отсутствием эффекта от проводимой терапии 30.04.1993 г. проведена имплантация печени и селезенки эмбриона 7 недель в амниотической оболочке в подкожную жировую клетчатку живота. Посттрансплантационный период прошел без осложнений. На 11 день отмечался подъем гемоглобина до 70 Г/л.

11.05.1993 г. больному внутривенно были введены гемопоэтические клетки эмбриональной печени человека. Возраст эмбриона 7 недель, объем введенных клеток 2 мл, клеточность  $17,6^6$ /мл, КОЕ бл. -  $2,6 \times 10^3$ /мл, СД<sub>34</sub>- $1,7 \times 10^4$ /мл. Посттрансплантационный период протекал без осложнений. Изменений в состоянии больного и данных периферической крови выявлено не было. В связи с этим была проведена повторная трансплантация гемопоэтических клеток эмбриональной печени. Возраст эмбриона 7 недель, объем введенных клеток - 1,8 мл, клеточность -  $71,0 \times 10^6$ /мл, КОЕ бл. -  $3,2 \times 10^3$ /мл, СД<sub>34</sub>- $26 \times 10^4$ /мл.

После 2-ой трансплантации к 4-8 неделе отмечается положительная динамика восстановления эритропоэза, мегалоцитопоэза (табл. 3, 4).

Больной находится в стадии клинической и гематологической ремиссии.

## Источники информации

1. Грищенко В.И., Лобынцева Г.С., Вотякова И.А. и др. Гемопозитические клетки эмбриональной печени. К.: «Наукова думка», 1988 г.

2. Клиническое применение криоконсервированных гемопозитических клеток эмбриональной печени человека. Методические рекомендации МОЗ Украины, 1991.

3. Бебешко В.Г., Макарцева Т.М., Киреева С.С. Оценка клинической эффективности трансплантации клеток аллогенной эмбриональной печени человека в комплексном лечении детей, больных гипопластической анемией. Гематология и переливание крови, 1984 г., вып. 19, с. 17-21.

Таблица 1

Показатели периферической крови больной С., 49 лет страдающей апластической анемией  
 Имплантация ЭП 11 недель – 13.04.93 г.  
 Трансплантация ГК ЭПЧ – 23.04.93 г.

Дата	24.03. 93 г.	06.04. 93 г.	16.04. 93 г. 3 сут.	19.04. 93 г. 6 сут.	20.04. 93 г. 7 сут.	23.04. 93 г. 10 сут.	26.04. 93 г. 3 сут.	29.04. 93 г. 6 сут.	04.05. 93 г. 11 сут.	28.05. 93 г. 35 сут.	15.06. 93 г. 53 сут.	19.07. 93 г. 81 сут.	07.10. 93 г. 162 сут.
Показатели крови													
Эритроциты, Т/л	2,7	1,85	1,8	1,72	1,74	2,3	2,46	2,30	1,96	2,2	2,6	3,3	3,8
Гемоглобин, Г/л	84	50	50	50	52	70	72	70	64	80	70	96	110
Цвет. показатель	0,93	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	1,0	0,9	1,0	0,8
Ретикулоциты, %	0,1		1		4			5		12	15		6
Лейкоциты, Г/л	3,0	6,3	4,7	5,1	6,5	6,0	4,65	4,55	6,05	3,0	3,0	3,7	3,6
Базофилы, %													
Эозинофилы, %	1	2	1	1	1	1	2	1	1	2	1	1	1
Миелоциты, %													
Метамиелоциты, %													
Палочкоядерные, %	1	1	2	1	1	1	3	4	6	4	6	1	1
Сегментоядерные, %	47	48	50	52	48	49	52	49	44	43	52	48	78
Лимфоциты, %	42	41	41	42	46	43	40	42	45	47	40	49	15
Моноциты, %	9	8	6	4	4	6	3	4	4	4	1	1	2
Тромбоциты, %	35,0	18,0	16,0	8,0	6,6	4,0	4,0	6,0	34,0	90,0	70,0	110,0	120,0
СОЭ, мм/ч	39	40	37	40	30	32	37	30	25	25	45	25	26
Эритроциты, содержащие фетальный гемоглобин							1%			4%	8%		7%

Таблица 2

Показатели костного мозга больной С., страдающей апластической анемией

Показатели	Дата	24.03.1993 г.	10.07.1993 г.
Количество мегакариоцитов в 1 мм <sup>3</sup>		0	30
Миелокариоциты		9250	20000
Бласты		5	2,0
Промиелоциты нейтрофильные		13	3,0
Миелоциты нейтрофильные		11	12,0
Метамиелоциты нейтрофильные		6	6,0
Палочкоядерные нейтрофильные		7	17
Сегментоядерные нейтрофильные		13	15
Эозинофилы		1	3
Моноциты		3	3
Лимфоциты		23	7,0
Плазм. клетки		1	1
Нормоциты:			
базофильные		4	5
полихроматофильные		7	8,0
оксифильные		16	18,0
Лейко-эритроид. отношение		2,3:1	2,2:1
К/м индекс нейтрофилов		0,7	0,6

Таблица 3

Показатели периферической крови больного О., 25 лет, страдающего апластической анемией  
 Имплантация ЭП 7 недель – 30.04.1993 г.  
 I трансплантация ГК ЭПЧ – 11.05.1993 г.  
 II трансплантация ГК ЭПЧ – 02.06.1993 г.

Дата (сутки)	27.04. 93 г.	04.05. 93 г. 4-е	06.05. 93 г. 6-е	11.05. 93 г. 11-е	12.05. 93 г. 1-е	15.05. 93 г. 4-е	17.05. 93 г. 6-е	21.05. 93 г. 11-е	24.05. 93 г. 14-е	01.06. 93 г. 21-е	04.06. 93 г. 2-е	07.06. 93 г. 5-е	09.06. 93 г. 7-е	13.06. 93 г. 11-е	15.06. 93 г. 13-е	02.07. 93 г. 30-е	04.08. 93 г. 60-е	02.09. 93 г. 90-е	11.10. 93 г. 120-е
Показатели крови																			
Эритроциты, Т/л	1,82	1,7	1,8	2,38	2,7	2,24	1,8	1,98	1,63	2,2	2,15	2,2	2,1	2,3	1,8	2,3	2,38	2,3	3,0
Гемоглобин, Г/л	54	50	50	70	78	70	60	60	50	62	62	62	62	62	65	60	70	80	82
Цвет. показа- тель	0,9	0,9	0,9	0,9	0,87	0,9	0,9	0,9	0,9	0,85	0,85	0,85	0,85	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9	0,9
Ретикулоциты, %	1		4				4		3	4					12		11		9
Лейкоциты, Г/л	4,5	3,5	2,95	4,2	2,4	3,1	2,05	2,85	2,15	2,9	5,35	4,3	4,0	3,5	3,8	4,0	3,5	4,0	3,8
Базофилы, %																			
Эозинофилы, %					1														
Миелоциты, %											1								
Метамиелоци- ты, %																			
Палочкоядер- ные, %	5	10	10	7	5	4,5	1	7	5	1"	1"	2	5	4	1	2	3	4	2
Сегментоядер- ные, %	51	45	34	43	45	20	48	40	39	10"	11"	50	45	50	54	50	48	53	55
Лимфоциты, %	38	39	35	46	32	68,5	46	47	50	28"	31"	62	46	40	40	42	41	39	35
Моноциты, %	6	6	4	4	6	6,5	4	6	6	10"	4"	6	4	6	5	6	8	4	8
Тромбоциты, %	14	18	18	8	14	20	10	6	8	4	8	10	12	14	18	20	14	30	45
СОЭ, мм/ч	40	50	40	50	30	50	40	38	54	72	61	50	50	48	40	40	30	30	30
Эритроциты, содержащие фетальный ге- моглобин					1%			1%		0					3%		8%		6%
Нормобласты					2:100					1:100									
Плазматиче- ские клетки, %										1	2								

" - абсолютное количество клеток в мазке.

Таблица 4

Показатели миелограмм больного О., страдающего апластической анемией

Показатели	Дата	16.04.1993 г.	15.09.1993 г.
Количество мегакариоцитов в 1 мм <sup>3</sup>		Клеточность к.м. значительно снижена	10
Миелокариоциты в 1 мм <sup>3</sup>		к.м. мало	10000
Бласты, %		3	2
Промиелоциты нейтрофильные, %		1	2,0
Миелоциты нейтрофильные, %		6	8,0
Метамиелоциты нейтрофильные, %		3	5,0
Палочкоядерные нейтрофильные, %		13	15,0
Сегментоядерные нейтрофильные, %		25	25,0
Эозинофильные, %		2	3,0
базофильные, %		1	1
Моноциты, %		7	4
Лимфоциты		23	11
Нормоциты			
базофильные, %		1	2
полихроматофильные, %		2	7
оксифильные, %		13	15
Лейко-эритроидное отношение		5,2:1	3,2:1
К/м индекс нейтрофилов		0,2	0,6
Индекс созревания эритробластов		0,9	0,8

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)  
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26  
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку \_\_\_\_\_ 2002 р. Формат 60x84 1/8.  
Обсяг \_\_\_\_\_ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. \_\_\_\_\_

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.  
(044) 268-25-22