



(19) **KG** (51) **A61B 17/00** (2011.01) (11) **1413** (13) **C1** (46) **31.01.2012**  
**A61K 35/407** (2011.01)

ГОСУДАРСТВЕННАЯ СЛУЖБА ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ  
 И ИННОВАЦИЙ ПРИ ПРАВИТЕЛЬСТВЕ КЫРГЫЗСКОЙ РЕСПУБЛИКИ

## (12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

к патенту Кыргызской Республики под ответственность заявителя

(21) 20100118.1

(22) 26.11.2010

(46) 31.01.2012, Бюл. №1

(71)(73) Кыргызская государственная медицинская академия им. И. К. Ахунбаева (KG)

(72) Тухватшин Р.Р., Мамедов Р.У. (KG)

(56) В.Г. Бруслик, А.С. Логинов и др. // Способы применения изолированных гепатоцитов для лечения острой печеночной недостаточности. Вестник РАМН. – 1994. – №5. – С. 8-13

**(54) Способ модифицированной интрапортальной трансплантации неонатальных изолированных гепатоцитов для лечения цирроза печени в эксперименте**

(57) Изобретение относится к медицине, в частности к гастроэнтерологии, и может быть использовано для лечения хронических заболеваний печени.

Задачей изобретения является разработка способа позволяющего снизить иммунологический конфликт между трансплантатом и реципиентом и повысить эффективность лечения заболевания печени.

Техническим результатом является создание для трансплантированных изолированных неонатальных гепатоцитов благоприятных условий для выживания и способствовать тем самым лечению заболевания.

Поставленная задача решается тем, что в способе интрапортальной трансплантации неонатальных изолированных гепатоцитов для лечения цирроза печени в эксперименте, в портальную вену вводят изолированные гепатоциты, причем кровь в долевой ветви портальной вены заменяют культуральной питательной средой с последующей трансплантацией изолированных гепатоцитов, а питательную среду вводят в течение 5 суток. 1 н. п. ф., 5 фиг.

(21) 20100118.1

(22) 26.11.2010

(46) 31.01.2012, Bul. №1

(71)(73) Kyrgyz State Medical Academy, named after I.K. Ahunbaev (KG)

(72) Tuhvatshin R.R., Mamedov R.U. (KG)

(56) V.G. Bruslik, A.S. Loginov and others // Methods of isolated hepatocytes application for treatment of acute hepatic failure. bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences. – 1994. – №5. – P. 8-13

**(54) Method of modified intraportal transplantation of neonatal isolated hepatocytes for treatment of liver cirrhosis in the experiment**

(57) The invention relates to medicine, namely to gastroenterology and may be used for treatment of chronic liver diseases.

Problem of invention consists in development of method permitting to reduce the immunological conflict between transplant and recipient and to raise the effectiveness of liver diseases treatment.

(19) **KG** (11) **1413** (13) **C1** (46) **31.01.2012**

Technical result is creation of favorable conditions for transplanted isolated neonatal hepatocytes for their survival and successful treatment of the disease facilitation.

The stated problem is solved by the fact that in the method of modified intraportal transplantation of neonatal isolated hepatocytes for treatment of liver cirrhosis in the experiment, the isolated hepatocytes is introduced into the portal vein; blood, at that, is replaced by a cultural nutrient medium with the following transplantation of isolated hepatocytes in the lobar part of portal vein; and the nutrient medium is introduced during 5 days. 1 independ. claim. 5 figures.

Изобретение относится к медицине, в частности к гастроэнтерологии, и может быть использовано для лечения хронических заболеваний печени.

Известен способ интрапортальной трансплантации изолированных гепатоцитов (ИГ) в лечении цирроза печени, заключающийся в том, что в портальную вену трансплантируют фетальные гепатоциты. В.Г. Бруслик, А.С. Логинов и др. // Способы применения изолированных гепатоцитов для лечения острой печеночной недостаточности. Вестник РАМН. – 1994. – №5. – С. 8-13. Однако недостатком способа является то, что сложно найти в достаточном количестве фетальные гепатоциты и обеспечить их стерильность.

Поэтому представляет интерес использовать неонатальные гепатоциты.

Однако при интрапортальной трансплантации неонатальных ИГ развивается иммунологическая агрессия со стороны организма реципиента и синдром отторжения трансплантата, т.к. пересаженные неонатальные изолированные гепатоциты, как дифференцированные клетки, обладают антигенными свойствами.

Задачей изобретения является разработка способа, позволяющего снизить иммунологический конфликт между трансплантатом и реципиентом и повысить эффективность лечения заболеваний печени.

Техническим результатом является создание для трансплантированных неонатальных гепатоцитов благоприятных условий для выживания и способствование тем самым лечению заболевания.

Поставленная задача решается тем, что в способе интрапортальной трансплантации неонатальных изолированных гепатоцитов для лечения цирроза печени в эксперименте, в портальную вену вводят изолированные гепатоциты, причем кровь в доленой ветви портальной вены замещают культуральной питательной средой с последующей трансплантацией изолированных неонатальных гепатоцитов, а питательную среду вводят в течение 5 суток.

Сущность способа заключается в следующем.

Трансплантацию неонатальных гепатоцитов производят кроликам породы «шиншилла» с моделью цирроза печени (ЦП) на фоне парентерального наркоза 5 % кетамин (0,3 мл/кг в/м). Верхне-срединным разрезом вскрывают брюшную полость, выделяют печеночно-12 перстную связку и ее элементы (печеночная артерия, портальная вена, общий желчный проток). Печеночную артерию и портальную вену берут на турникет 1 на фиг. 1, промывают физиологическим раствором от крови левую долю печени, (обескровленная доля печени становилась бледной). Таким образом, вызывают искусственную гипотермию, снижают обменные процессы, повышают резистентность тканей печени и пересаженных гепатоцитов к гипоксии. Далее, через левую доленую ветвь портальной вены 2 на фиг. 1 перед трансплантацией с помощью катетера вводят охлажденный раствор культуральной питательной среды: физ. раствор 0,9 % 20 мл/кг, раствор 5 % глюкозы 15 мл/кг, антигипоксанта – рибоксин 2 мл/кг, глюкокортикоиды – преднизолон 0,5 мл/кг и в левую доленую портальную вену вводят неонатальные гепатоциты с физиологическим раствором 0,9 %. Катетер фиксируют на малый сальник, выводят через контраптертуру. В течение 5 суток через катетер вводят вышеназванные растворы для предупреждения расстройств кровообращения и дистрофии в ткани печени.

После трансплантации неонатальных ИГ на 5 сутки и на 30 сутки проводят исследование показателей клеточного и гуморального иммунитета; на 15 и на 30 сутки проводят исследование функционального состояния и морфологическое исследование печени.

Как известно основной иммунный механизм отторжения трансплантата клеточный, в котором эффекторными клетками являются цитотоксические Т-лимфоциты, активность которых регулируют Т-хелперы (CD4+), и Т-супрессоры. Т-хелперы (CD4+) распознают антигенную детерминанту на поверхности антигенпредставляющей клетки (АПК). ИЛ-1 секретируемый АПК стимулирует в Т-хелпере секрецию ИЛ-2, который стимулирует пролиферацию CD4+ и ак-

тивацию цитотоксических Т-лимфоцитов. После активации CD8+ синтезируют цитокины, которые активируют В-лимфоциты, а последние начинают вырабатывать антитела (иммуноглобулины) против трансплантата.

На 5 сутки посттрансплантационного периода при традиционной методике трансплантации неонатальный ИГ уровень CD3+ увеличивался до 44.42, CD4+ до 27.28, CD8+ до 18.3, CD20+ до 20.71, NK-клеток до 19.57, ЦИК до 142.28, а уровни Ig A, M, G повышались до 0.87, 0.68 и 15.8 соответственно по сравнению с интактными животными. На 30-е сутки исследования указанные показатели оставались высокими по сравнению с интактными животными.

При исследовании функционального состояния печени на 15 и на 30 сутки после трансплантации неонатальных ИГ по традиционной методике уровни прямого и непрямого билирубина и АлАТ достоверно повышались по сравнению с интактными животными. Показатели глюкозы и альбумина на 15 и на 30 сутки снижались по сравнению с интактными животными.

На 5 сутки после трансплантации неонатальных ИГ по модифицированной интрапортальной методике уровень Т-лимфоцитов был меньше на 29 %, CD4+ на 19 %, CD8+ на 35 %, NK-клеток – на 38 %, по сравнению с животными с традиционной методикой трансплантации неонатальных ИГ.

На 30 сутки уровень CD3+ снизился на 32 %, CD4+ – на 27 %, а цитотоксические Т-лимфоциты снизились на 57 %, NK – на 56 % по сравнению с животными с традиционной методикой трансплантации неонатальных ИГ.

После трансплантации неонатальных ИГ по модифицированной интрапортальной методике со стороны гуморального иммунитета на 5 сутки отмечалось недостоверное снижение уровня В-лимфоцитов, уровень ЦИК был меньше – на 16 %, Ig M снизился в 2.2 раза, Ig G – в 3.2 раза, по сравнению с традиционной методикой трансплантации неонатальных ИГ.

Уровень В-лимфоцитов на 30 сутки уменьшился на 58 %, ЦИК уменьшился на 20 %, Ig M был меньше на 2.6 раз, Ig G на 4.9 раз ( $P > 0,05$ ) по сравнению с животными с традиционной методикой трансплантации неонатальных ИГ.

После трансплантации неонатальных ИГ по модифицированной интрапортальной методике исследование функционального состояния печени показало, что на 15 и на 30 сутки уровень прямого и непрямого билирубина крови достоверно снижался по сравнению с животными с традиционной методикой трансплантации неонатальных ИГ.

Показатель глюкозы на 15 сутки увеличился, но достоверность не наблюдалась, а на 30 сутки увеличился в 1,4 раз. Уровень АлАТ на 15 сутки уменьшился на 14 %, а на 30 сутки на 30 % по сравнению с животными с традиционной методикой трансплантации неонатальных ИГ.

Уровень альбумина на 15 сутки повысился на 2,5 %, а на 30 сутки – на 25 % по сравнению с животными с традиционной методикой трансплантации неонатальных ИГ.

Гистологическое исследование аутопсийного материала, взятого на 15 и на 30 сутки после трансплантации неонатальных ИГ по традиционному и модифицированному способу показал следующие результаты (Фиг. 2-5).

В периферической зоне трансплантата на 15 сутки после трансплантации по традиционному способу отмечались дистрофия и некроз группы гепатоцитов, лимфо-гистиоцитарная инфильтрация (Фиг.2).

На 30 сутки отмечались дистрофия и некроз отдельных гепатоцитов, разрастание соединительной ткани вовнутрь трансплантата (Фиг. 3.)

Гистологическое исследование аутопсийного материала взятого на 15 сутки после трансплантации неонатальных ИГ по модифицированному способу, показал полностью сохраненную структуру трансплантата. Реакция по периферии отсутствует (Фиг. 4).

На 30 сутки после пересадки ИГ по модифицированному способу трансплантат выделяется правильной структурной организацией гепатоцитов, отчетливо выраженным балочно-дольковым строением и наличием всех структур, свойственных печеночной дольке и печени в целом (Фиг. 4).

При обескровливании ветви портальной вены клетки иммунной системы не поступают в участок с трансплантированными неонатальными ИГ. При трансплантации по данной методике замедляется развитие иммунологической реакции против трансплантата, снижается острота иммунного конфликта и синдрома отторжения трансплантата, что способствует эффективности трансплантации неонатальных ИГ.

### Формула изобретения

Способ модифицированной интрапортальной трансплантации неонатальных изолированных гепатоцитов для лечения цирроза печени в эксперименте, заключающийся в ведении в вену изолированных гепатоцитов, отличающийся тем, что кровь в долевой ветви портальной вены замещают культуральной питательной средой с последующей трансплантацией изолированных неонатальных гепатоцитов, причем питательную среду вводят в течение 5 суток.

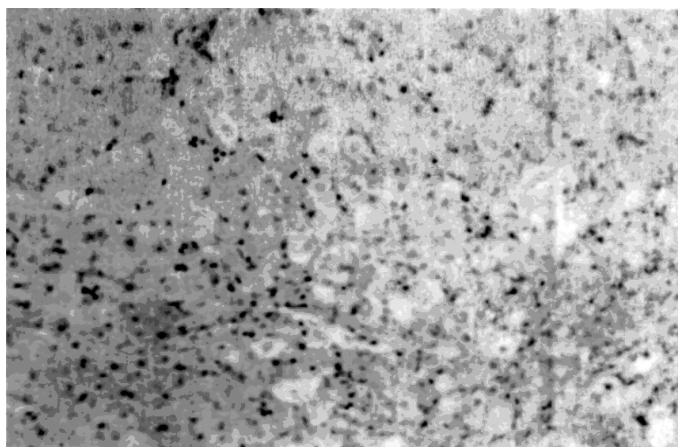


Фиг. 1. Схема способа введения гепатоцитов

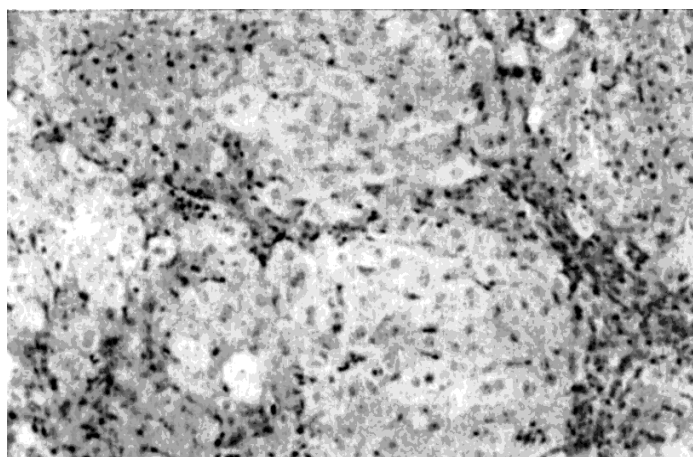
Ворота печени с сосудистыми ножками.

1 – место взятия на турникет печеночной артерии и портальной вены;

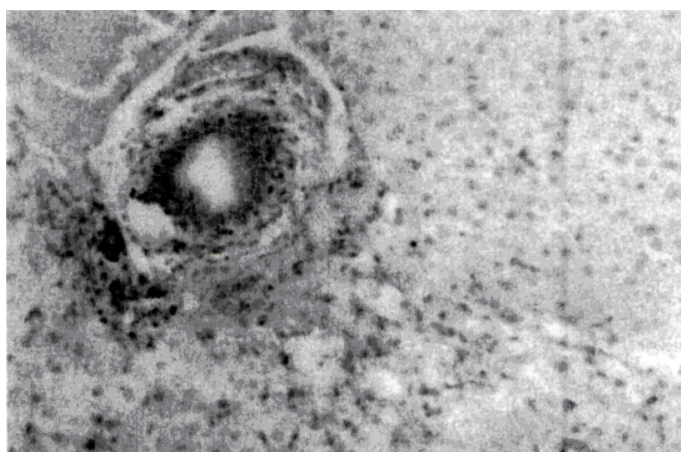
2 – место введения катетера в ветвь портальной вены



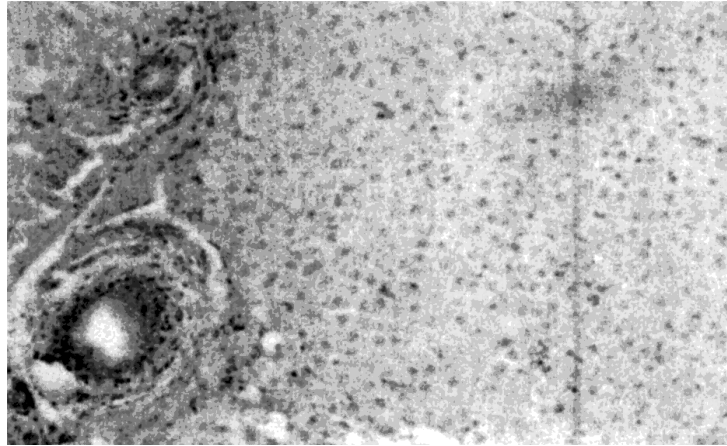
Фиг. 2. Печень кролика через 15 дней со дня трансплантации по традиционному способу.  
Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 210.



Фиг. 3. Печень кролика через 30 дней со дня трансплантации по традиционному способу.  
Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 210.



Фиг. 4. Печень кролика через 15 дней после трансплантации по традиционному способу.  
Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 210.



Фиг. 5. Печень кролика через 30 дней со дня трансплантации по традиционному способу.  
Окраска гематоксилин-эозин. Ув. 210.

Выпущено отделом подготовки материалов

---

Государственная служба интеллектуальной собственности и инноваций при Правительстве Кыргызской Республики,  
720021, г. Бишкек, ул. Московская, 62, тел.: (312) 68 08 19, 68 16 41; факс: (312) 68 17 03