(12) МЕЖДУНАРОДНАЯ ЗАЯВКА, ОПУБЛИКОВАННАЯ В СООТВЕТСТВИИ С ДОГОВОРОМ О ПАТЕНТНОЙ КООПЕРАЦИИ (PCT)

(19) Всемирная Организация Интеллектуальной Собственности
Международное бюро

(43) Дата международной публикации
11 октября 2007 (11.10.2007)

PCT

(10) Номер международной публикации
WO 2007/114740 A2

(51) Международная патентная классификация:
Неклассифицировано

(21) Номер международной заявки: PCT/RU2007/000178

(22) Дата международной подачи:
4 апреля 2007 (04.04.2007)

(25) Язык подачи: Русский

(26) Язык публикации: Русский

(30) Данные о приоритете:

2006110590	4 апреля 2006 (04.04.2006)	RU
2006117602	23 мая 2006 (23.05.2006)	RU
2006117609	23 мая 2006 (23.05.2006)	RU

(71) Заявитель *(для всех указанных государств, кроме US)*: **ОБЩЕСТВО С ОГРАНИЧЕННОЙ ОТВЕТСТВЕННОСТЬЮ"ТРАНС-ТЕХНОЛОГИИ" (TRANS-TECHNOLOGIES LTD)** [RU/RU]; ул. Ленинградская, д. 70/4, литер "В", пос. Песочный, Санкт-Петербург, 189650, St.Petersburg (RU).

(72) Изобретатели; и

(75) Изобретатели/Заявители *(только для US)*: **БУХАРЦЕВ, Николай Николаевич (BUHARTSEV, Nikolay Nikolaevich)** [RU/RU]; ул. Есенина, д. 3, кв. 22, Санкт-Петербург, 191002, St.Petersburg (RU). **ВИЙДЕ, Светлана Константиновна (VIJDE, Svetlana Nikolaevna)** [RU/RU]; Петергофское шоссе, д. 84, к. 10, кв. 25, Санкт-Петербург, 198206, St.Petersburg (RU). **ГАЛАНИН, Игорь Вениаминович (GALANIN, Igor Veniaminovich)** [RU/RU]; пр. Елизарова, д. 14, кв. 32, Санкт-Петербург, 193029, St.Petersburg (RU). **КИСЛЯКОВА, Татьяна Виатальевна (KISLJAKOVA, Tatyana Vitaljevna)** [RU/RU]; ул. Разъезжая, д. 3, кв. 21, Санкт-Петербург, 191002, St.Petersburg (RU). **КРУГЛЯКОВ, Петр Владимирович (KRUGLAKOV, Peter Vladimirovich)** [RU/RU]; ул. Советская, д. 23, кв. 73, Отрадное, Кировский район, Ленинградская область, 188694, Otradnoe (RU). **ПОЛЫНЦЕВ, Дмитрий Гёнрихович (POLYNTSEV, Dmitry Genrihovich)** [RU/RU]; ул. Королева, д. 31, к. 1, кв. 381, Санкт-Петербург, 197349, St.Petersburg (RU). **СОКОЛОВА, Ирина Борисовна (SOKOLOVA, Irina Borisovna)** [RU/RU]; ул. Быкова, д. 17, кв. 15, Всеволожский район, Павлово, Ленинградская область, 188680, Pavlovo

[продолжение на следующей странице]

(54) **Title:** BIOTRANSPLANT FOR CELLULAR THERAPY BASED ON MESENCHYMAL BONE MARROW STEM CELLS

(54) **Название изобретения:** БИОТРАНСПЛАНТАТ ДЛЯ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ НА ОСНОВЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК

(57) **Abstract:** The invention relates to bioengineering and biopharmacology, in particular to obtaining a culture of human mesenchymal bone marrow stem cells used for producing a biotransplant. Said invention can be used in a cellular therapy, in particular for treating patients exhibiting the expressed mental retardation and significant cerebral morphological changes. A homogeneous population of mesenchymal stem cells (MSC) characterised according to cell markers CD 44+, CD 90+, CD105+, CD106+, CD45- AND CD 34- is separated. The homogeneous cells are obtainable at a media interface by centrifuging a heparanized bone marrow and are passed, not more than three times, on mattresses for producing a cell biomass. The thus obtained cell population is used for producing a biotransplant. The biotransplant based on the patient's own MSC in the 10% autoserum of the blood thereof is used for treating intellectually-mnestic diseases of different aetiology and for treating the pathological changes of cerebral tissue relating to a head and brain injury or to acute changes of cerebral circulation. The treatment is carried out by the parenchymatous or intravascular injection of a therapeutically effective amount of the biotransplant. Said invention makes it possible to obtain the biotransplant based on the homogeneous according to genetic markers cells without additional costs and as soon as possible.

(57) **Реферат:** Изобретение относится к области биотехнологии и биофармакологии, в частности касается получения из костного мозга человека культуры мезенхимальных стволовых клеток для изготовления биотрансплантата. Изобретение может быть использовано в клеточной терапии, в частности при лечении больных с выраженным психическим недоразвитием и достоверными морфологическими изменениями в головном мозге. Выделяют однородную популяцию мезенхимальных стволовых клеток (МСК), охарактеризованную по клеточным маркерам CD 44+, CD 90+, CD105+, CD106+, CD 45-, CD 34 -. Однородные клетки получают на границе сред при центрифугировании гепаринизированного костного мозга и пассируют на матрасах для наработки биомассы клеток не более трех раз. Полученную клеточную популяцию используют при изготовлении биотрансплантата. Биотрансплантат на основе собственных МСК больного в 10% аутологичной сыворотке его крови используют при лечении поражения интеллектуально- мнестических функций различной этиологии, а также при лечении паталогически измененных тканей головного мозга, связанных с черепно-мозговой травмой или острыми изменениями мозгового кровообращения. Лечение осуществляют путем паренхиматозного или внутрисосудистого введения терапевтически эффективного количества биотрансплантата. Изобретение позволяет получить биотрансплантат на основе однородных по генетическим маркерам клеток без дополнительных затрат и в кратчайшие сроки.

WO 2007/114740 A2

(RU). **СКОРОМЕЦ, Тарас Александрович (SKOROMETS, Taras Aleksandrovich)** [RU/RU]; ул. Котовского, д. 3/12, кв. 32, Санкт-Петербург, 198206, St.Petersburg (RU).

(74) Агент: АГЕНТСТВО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ "ЕГИДА" (AGENCY OF INTELLECTUAL PROPERTY "EGIDA"); Борохович Людмила Никифоровна, 17 линия В. О., д. 4-6, Санкт-Петербург, 199034 St.Petersburg (RU).

(81) Указанные государства *(если не указано иначе, для каждого вида национальной охраны)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Указанные государства *(если не указано иначе, для каждого вида региональной охраны)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), евразийский (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), европейский патент (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Опубликована:

— *без отчёта о международном поиске и с повторной публикацией по получении отчёта*

В отношении двубуквенных кодов, кодов языков и других сокращений см. "Пояснения к кодам и сокращениям", публикуемые в начале каждого очередного выпуска Бюллетеня PCT.

Биотрансплантат для клеточной терапии на основе мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга

Изобретение относится к области биотехнологии и биофармакологии и касается получения из костного мозга человека биотрансплантата на основе мезенхимальных стволовых клеток однородной клеточной популяции. Изобретение может найти применение в медицине для лечения различных заболеваний. При использовании по изобретению костного мозга животных (млекопитающих) оно может применяться в ветеринарии.

Изобретение может быть использовано в клинической психиатрии при лечении поражения интеллектуально-мнестических функций различной этиологии, а также при лечении паталогически измененных тканей головного мозга, связанных с черепно-мозговой травмой или острыми изменениями мозгового кровообращения.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

В настоящее время клеточная терапия приобрела большое значение. Одним из современных и активно разрабатываемых способов лечения различных, терапевтически резистентных, поражений центральной нервной системы (ЦНС), является интракраниальная трансплантация мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Это многообещающий способ восстановления нарушенных функций центральной нервной системы, в основе которого, помимо возможности целенаправленного влияния на определённые функциональные структуры головного мозга, лежит нормализующий эффект на дисбаланс нейротрансмиттерных систем мозга, что фактически является принципиально новым подходом к лечению большой группы заболеваний, связанных с поражением ЦНС.

Стволовые клетки подразделяются на мезенхимальные (они способны дифференцироваться в клетки тканей мезодермального происхождения), гематопоэтические (предшественники клеток крови), нейрональные (предшественники клеток нервной системы) и другие. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) используют в роли биотрансплантата, т. к. они активизируют собственные резервы организма, способствуют образованию цитокинов и факторов роста; МСК являются предшественниками остеобластов и способствуют формированию ремоделирующих единиц.

МСК выделяют из фетальных органов гемопоэза, из скелетных мышц, из подкожной жировой ткани или из костного мозга. В работе с МСК используют традиционные методики работы с клетками (Культура животных клеток. Методы. Под ред. Р. Фрешни. Москва. Мир. 1989 г.), в каждом случае подбирая индивидуальную последовательность действий, условия выделения и наработки клеточной массы.

МСК для трансплантации получают из донорского, аутологичного или фетального материала. Клеточная культура может быть заготовлена заранее, после наработки клеточной массы ее хранят путем криоконсервации.

Наилучшим материалом для наработки трансплантантных МСК является фетальный материал, т. к. клетки обладают выраженной способностью к дифференцировке, более активны функционально, обладают большим потенциалом пролиферации и роста, продуцируют факторы регенерации и роста; при пересадке они стимулируют ангиогенез. Фетальные клетки лучше переносят гипоксию. Однако использование фетальных клеток связано с этическими проблемами и с труднодоступностью исходного материала.

Известен способ получения МСК для имплантации с целью направленной остеорегенерации (Патент РФ № 2210352 от 20.08.2003). Была выращена гомогенная (не менее 80%) популяция плюрипотентных МСК, полученных путем дезагрегации ткани-источника МСК с последующим ресуспендированием суспензии и культивированием на ростовой среде.

Недостатком метода является получение в результате гетерогенной популяции недифференцированных МСК.

Известен способ получения биотрансплантанта для лечения остеопороза (Патент РФ № 2265442 от 10.12.2005), состоящего из клеток МСК. В процессе получения МСК осуществляют ферментативную дезагрегацию, фильтрацию через мелкоячеистое сито, центрифугирование в солевом растворе Хенкса, ресуспендирование в ростовой среде ДМЕМ/F12, содержащий 15% эмбриональной телячьей сыворотки и глутамин. Посев осуществляют на пластиковые чашки Петри при удалении через 1 сутки неприкрепившихся клеток. Инкубирование проводят при 37^0 С в атмосфере 5% CO_2 с последующей трипсинизацией и пересевом культуры. В результате нескольких пересевов получают культуру клеток МСК с преимущественной способностью к остеогенной дифференцировке, но эта культура является гетерогенной клеточной популяцией, не охарактеризованной фенотипированием.

Различные источники получения МСК подразумевают и разную обработку исходного биоматериала: жировая ткань, пуповинная кровь, фетальный материал, костный мозг. Условия выделения МСК для дальнейшего культивирования и условия наработки нужной клеточной массы зависят от состава культуральной среды, условий посева и культивирования, посуды и т. д.

Известен способ получения МСК, основанный на способности клеток прикрепляться к поверхности посуды, в которой выращивают культуру клеток (Bone, 1995, vol. 13, p.81-95). В процессе используют бычью эмбриональную сыворотку (ее отобранные лоты). Были получены клетки с высокой адгезивной способностью, скоростью пролиферации и временем сохранения мультипотентности. К недостаткам этого способа относится трудоемкость анализа бычьей сыворотки, применяемой для выращивания клеток, и плохая воспроизводимость метода, из-за чего наблюдается большой разброс результатов получения МСК.

Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток относительно несложно, но существует проблема получения однородной

клеточной популяции МСК в достаточном количестве для трансплантации и консервации впрок.

Известен способ выделения мезенхимальных стволовых клеток по международной заявке WO2005121317 (приоритет по патенту РФ № 2252252 от 20.05.2005 г.) Ткани человека по этому способу измельчают, обрабатывают раствором коллагеназы в среде Игла в модификации Дюльбекко, центрифугируют, после чего полученную суспензию очищают от эритроцитов с помощью лизирующего раствора с последующей последовательной фильтрацией через фильтры с разным размером пор. Выращивают клетки посевом во флаконы. Клетки получают однородными, с высоким выходом, клетки жизнеспособны. Выход 10^6/1 г ткани. Недостатком метода является многоступенчатость очистки, связанная с исходным материалом для выделения МСК, это – жировая ткань или плацента. Только на 4-ом пассаже авторы получают однородные клетки, соответствующие иммунофенотипу МСК: CD 13+, CD 44+, CD 90+, CD105-, CD 31-, CD 45-, CD 117-.

По известным методикам выращивания МСК из костного мозга обычно получают гетерогенные популяции клеток стромы с незначительным содержанием в них стволовых клеток.

Известна работа Majumdar M. K. et al. (J. Cell. Physiol., 2000, Oct., 185(1), p. 98-106). Она посвящена выделению, характеристике и хондрогенному потенциалу мультипотентных стромальных клеток, полученных из костного мозга человека. Клетки выделяли, используя экспрессию эндоглина. Их выращивали in vitro в среде без сыворотки, в присутствии трансформирующего фактора роста-бета (TGF-beta), применяя для роста трехмерные матриксы альгинатных шариков. Клетки охарактеризованы только маркером CD 34+.

Известен способ получения МСК из костного мозга человека, по которому выделяли мононуклеарные клетки путем центрифугирования в градиенте фиколла с последующей селекцией на антитела к поверхностному антигену CD 105^+, экспрессирующемуся на поверхности МСК. Клетки отбирали по адгезии МСК на пластике, затем осуществляли их

культивирование (J. Cell. Physiol. 2000. vol. 185. p. 98-106). В результате была выделена фракция клеток CD 105^{+}, обогащенная МСК. Выход клеток не был высоким, а способ оказался достаточно затратным.

Клеточная масса, полученная из костного мозга реципиента, содержит (в пунктате) не более 1-3% стволовых клеток, т. е. клеток с полипотентными свойствами, а основную часть пунктата при заборе составляет периферическая кровь. Для получе6ния биотрансплантa требуются методики наработки однородной по фенотипу массы МСК, пригодной для использования в медицинских целях, выращенной в необходимых для лечения количествах (80-100 млн. клеток на процедуру), полученной с минимумом затрат времени и финансов, при минимальном травмировании реципиента.

Источник, из которого получены МСК, играет существенную роль в последующем использовании клеток при лечении больных («Трансплантация гемопоэтических стволовых клеток», А. Г. Румянцев, А. А. Масчан. – Медицинское информационное агентство. М. – 2003г. – 912 с.)

Лечение поражения интеллектуально-мнестических функций связано с воздействием на центральную нервную систему (ЦНС), на кору головного мозга.

Известен метод нейротрансплантации эмбриональных стволовых клеток (НЭСК), который применяется при различных, терапевтически резистентных поражениях ЦНС (А. С. Брюховецкий, Трансплантация нервных клеток и тканевая инженерия мозга при нервных болезнях, М. 2003, с. 398., В. В. Семченко и др. Нейротрансплантация, Омск, 2004, с. 306.) (2, 3).

Известен также способ лечения задержки психоречевого и интеллектуального развития различного происхождения, путём нейротрансплантации эмбриональной нервной ткани в кору головного мозга (RU, патент № 2219937, 2003).

Известен способ лечения нейродегенеративных заболеваний с помощью эндолюмбального одномоментного введения 50-500 млн нейрональных стволовых клеток (НСК) в 2мл физиологического

раствора (Патент РФ№2259836 от 10.09.2005). Культура генетически немодифицированных НСК получена из эмбриональной мозговой ткани. Клеточный биотрансплантат восстанавливает и улучшает функцию пораженного мозга. Вводимые клетки неоднородны, разные по фенотипу, доставляются в места поражения лимфой.

Известен способ лечения ишемического инсульта, заключающийся в введении пациенту от 50 до 500 млн нейрональных стволовых клеток (НСК), полученных из ткани мозга эмбрионов, введение производят в 2мл физиологического раствора эндолюмбально. Известный биотрансплантат состоит из клеток НСК в физиологическом растворе. Недостаток данного способа – использование недифференцированных клеток. Существует этическая проблема в отношении происхождения НСК. \\Патент РФ №2258521, от 20.08.2005г.\\

Известен способ лечения поврежденного головного мозга с помощью введения интрацеребрально гемопоэтических стволовых клеток /Патент РФ №2216336, от 20.11.2003\\. Результат лечения по известному методу основан на том, что после трансплантации в поврежденный участок мозга гемопоэтические стволовые клетки отвечают на сигналы этого участка мозга, проявляя фенотип, который способен заменить или компенсировать функциональную недостаточность, которая вызвана указанным повреждением или заболеванием. По методу используют недифференцированные клетки, не обязательно в выделенной форме, т.к. клеточный материал не является однородным по фенотипу.

В отличие от применения при нейротрансплантации в качестве донорского материала эмбриональных тканей – в частности, эмбриональных нейробластов человека, - МСК, полученные из костного мозга самого больного (аутотрансплантация), позволяют избавиться от целого ряда проблем.

Прежде всего, полностью снимается проблема гематоэнцефалических и иммунных реакций, т.к. больному трансплантируются его собственные клетки. При этом аутоиммунные клетки

не только не вызывают реакций отторжения, но и обладают иммуносупрессорными свойствами.

При применении аутотрансплантации МСК исчезают религиозные, этические и правовые проблемы, сопутствующие применению аллогенных нейробластов, которые в значительной степени затрудняют применение эмбриональных тканей или клеточных культур, полученных из них.

Помимо этого, в значительной степени упрощаются организационные проблемы, связанные с необходимостью обследования донорских тканей на многочисленные вирусные инфекции или наследственные заболевания.

МСК являются клетками-предшественниками, из которых в процессе дальнейшей специализации формируются либо нервные клетки, либо клетки различных тканей. «Специализация» МСК зависит от непосредственного клеточного окружения, в которое попадает МСК. Таким образом, МСК, трансплантированные непосредственно в мозговую ткань или введённые в мозг через сосудистую систему, приобретают все функциональные особенности окружающих их нейронов. В дальнейшем часть из них приживается, дифференцируется и устанавливает связи с окружающими нервными клетками. Оказываемый ими на дисбаланс нейротрансмиттерных систем больного мозга нормализующий эффект является принципиально новым подходом в лечении целого ряда заболеваний, связанных с поражением ЦНС.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Задачей, на решение которой направлено настоящее изобретение, является получение биотрансплантата для лечебного применения на основе мезенхимальных стволовых клеток однородной клеточной популяции, при этом биотрансплантат получают с минимальными затратами времени, энергии, материалов.

Другой задачей изобретения является применение биотрансплантата на основе мезенхимальных стволовых клеток однородной клеточной популяции, выделенных из костного мозга человека

различного возраста, для повышения эффективности лечения выраженного снижения интеллектуально-мнестических функций, связанных с психическим недоразвитием, либо для коррекции чувствительной, двигательной и\или когнитивной недостаточности, возникшей у больного в результате черепно-мозговой травмы или острого нарушения мозгового кровообращения.

Для решения поставленных задач предложена группа изобретений, объединенных общим изобретательским замыслом.

Предложен биотрасплантат для лечебного применения, представляющий собой суспензию, которая в качестве активного компонента содержит жизнеспособную, однородную на 87-99,9% по клеточным маркерам CD 44+, CD 90+, CD105+, CD106+, CD 45-, CD 34- популяцию мезенхимальных стволовых клеток, полученную из костного мозга млекопитающего, и фармацевтически приемлемый носитель.

Для получения биотрансплантата может быть использован костный мозг млекопитающего, полученный из грудины и/или крыла подвздошной кости таза, при этом костный мозг может быть аутологичным или донорским.

Биотрасплант содержит свежеприготовленную популяцию мезенхимальных стволовых клеток.

Биотрасплантат может содержать популяцию мезенхимальных стволовых клеток, криоконсервировнную, в частности, с использованием в качестве криопротектора диметилсульфоксида.

Предложен способ получения упомянутой популяции мезенхимальных стволовых клеток (МСК) с однородностью по фенотипу на 87-99,9% по клеточным маркерам CD 44+, CD 90+, CD105+, CD106+, CD 45-, CD 34- из костного мозга млекопитающих, включающий выделение МСК с помощью центрифугирования и выращивание в культуральной среде. Жизнеспособные клетки выделяют на границе сред ДМЕМ – фиколл на второй стадии обработки исходного материала после центрифугирования в течение 25-60 минут наслоенной на фиколл суспензии клеток гепаринизированного пунктата костного мозга в ДМЕМ при

скорости 1000-2000 об/мин., выращивание клеточной массы осуществляют из полученных МСК в стандартной посуде с использованием среды ДМЕМ с добавлением 15-22% FBS путем высева клеток с плотностью 75-200 клеток на 1 $см^2$ и с продолжительностью инкубирования 18-52 часов.

Центрифугирование осуществляют в фиколле плотностью 1,077 г/л или 1,115 г/л при температуре 18-23^{0}С.

Клеточную массу в количестве 1,5-3·10^6 до 1,5-3·10^7 клеток на 1 мл исходного костного мозга получают в результате трех пассажей.

Предложен также биотрасплантат для лечения мозговых нарушений, в котором жизнеспособная популяция однородных на 87-99,9% по клеточным маркерам CD 44+, CD 90+, CD 105+, CD 106+, CD 45-, CD 34- мезенхимальных стволовых клеток (МСК) является полученными из костного мозга аутологичными МСК, содержащимися в 10% аутологичной сыворотке крови на физиологическом растворе или в фармацевтически приемлемом растворителе.

Биотрасплантат содержит свежеприготовленную популяцию мезенхимальных стволовых клеток.

Биотрасплантат содержит популяцию мезенхимальных стволовых клеток, криоконсервировнную, в частности, с использованием в качестве криопротектора диметилсульфоксида.

Концентрация мезенхимальных стволовых клеток составляет 0,7 – 1,2 х 10^6 МСК в 1 мл биотрасплантата.

Биотрасплантат для интрацеребрального введения содержит фармацевтически приемлемый носитель, в частности, гемостатическую губку.

Предложен способ лечения больных с выраженным психическим недоразвитием, заключающийся в том, что биотрасплантат для лечения мозговых нарушений в терапевтически эффективном количестве вводят паренхиматозно на фармацевтически приемлемом носителе в одну или несколько зон Бродмана 44, 43, 46, 24, 25, 22,41 и 42.

Количество вводимых аутологичных мезенхимальных стволовых клеток составляет 7-12 млн на одну зону Бродмана.

Биотрасплантат для лечения мозговых нарушений дополнительно вводят внутрисосудисто с дозировкой 0,5- 0,7 х 10^6 аутологичных мезенхимальных стволовых клеток на 1 кг веса больного.

Способ лечения больных с выраженным психическим недоразвитием, заключающийся в том, что биотрасплантат для лечения мозговых нарушений вводят внутрисосудисто путем внутриартериального и/или внутривенного введения в терапевтически эффективном количестве.

Предложен способ лечения последствий черепно-мозговой травмы и острых нарушений мозгового кровообращения заключающийся в том, биотрасплантат для лечения мозговых нарушений вводят паренхиматозно на фармацевтически приемлемом носителе и/или вводят внутрисосудисто в терапевтически эффективном количестве.

Внутриартериальное введение биотрансплантата осуществляют со скоростью 2 мл\мин.

Внутривенное введение биотрансплантата осуществляют со скоростью 6 мл в\мин.

Терапевтически эффективное количество МСК вводят интрацеребрально в выбранные для лечения зоны коры головного мозга, причем количество аутологичных мезенхимальных стволовых клеток составляет 7-12 млн на одну зону.

Указанное лечение можно осуществлять любому млекопитающему, но преимущественно настоящее изобретение касается лечения человека.

Техническим результатом изобретения является оптимизация процесса выделения клеток МСК высокой однородности из костного мозга реципиента для изготовления биотрансплантата и ускорение этого процесса. Упрощение и удешевление получения культуры МСК в необходимых для получения биотрансплантата количествах связано с низкой плотностью высева клеток, что отличает данный способ от известных, а также то, что не используется специальная посуда и специальная среда.

Условия получения культуры МСК подобраны так, чтобы минимизировать воздействие на клетки химических веществ, т. е. не

подвергать клетки отрицательному влиянию реактивов. Клетки МСК получены по заявляемому способу жизнеспособными, они охарактеризованы 6 маркерами по фенотипу CD 44+, CD 90+, CD105+, CD106+, CD 45-, CD 34-, выход однородных клеток до 99,9 %.

Выход клеток составляет от 1,5-3·10^6 до 1,5-3·10^7 на 1 мл исходного материала, т. е. костного мозга. Таким образом, первичный материал использован максимально полно, потери минимизированы.

Подобраны оптимальные условия культивирования МСК in vitro, в результате чего процесс накопления клеточной массы занимает от 7 до 9 суток и количество проводимых операций сведено к минимуму.

Сущностью данного изобретения является выделение однородной на 80-99,9% клеточной фракции на второй стадии (стадии селекции) после получения обогащенной культуры МСК из дезагрегированного костного мозга. Выделение МСК осуществляют с помощью центрифугирования в течение 25-60 минут при скорости 1000-2000 об/мин в фиколле. Дальнейшее культивирование собранной на границе сред популяции клеток производят путем пассирования на матрасах при контроле посевного материала по ошариванию клеток и при контроле полноты снятия клеточной массы, охарактеризованной методами иммунофенотипирования как МСК. Культуральная среда состоит из питательной среды ДМЕМ с 15-22% FBS.

Изменение параметров проведения заявляемых процедур в сторону увеличения или уменьшения не может привести к указанному техническому результату изобретения, т. к. при этом наступает резкое снижение выхода МСК, нарушается однородность суспензии клеток.

Для лечебного применения аутологичные клетки имеют преимущество, т. к. представляют собой фракцию высокоочищенных собственных стволовых клеток. Выращенные в культуральной среде аутологичные мезенхимальные стволовые клетки (АМСК) при введении больному безопасны, т. к. это собственные клетки, благодаря чему исключается возможность аллергических реакций. Большое количество вводимых клеток дает выраженный лечебный эффект.

При лечении мозговых нарушений трансплантация МСК в кору головного мозга связана с их способностью улучшить функцию недоразвитого (пораженного) мозга, образовывать связи в определенных отделах ЦНС за счет синтеза нейромедиаторов, что может способствовать развитию умственных и поведенческих способностей. Аутологичные МСК имеют преимущества перед донорскими МСК, в результате трансплантация проходит без осложнений, без иммунных реакций. В качестве носителя МСК используют фармацевтически приемлимые гемостатические губки, которые со временем рассасываются, выполнив свою функцию.

Развитию мозга способствует также введение аутологичных МСК внутрисосудисто (внутривенно или внутриартериально). Такая трансплантация МСК в мозг протекает за счет кровеносной системы мозга: током крови МСК переносятся в очаг поражения. Опробовано также комплексное введение аутологичных МСК: путем внутрисосудистого введения и интракортикальной трансплантации в мозг. В этом случае идет более полное насыщение клетками МСК коры головного мозга, обеспечивая ими очаг поражения.

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ получения биотрансплантата по изобретению осуществляют следующим образом. Костный мозг человека получают путем пунктирования из грудины (5-10 мл) или из крыла подвздошной кости таза (15-30 мл) в условиях малой операционной под местной анестезией. Пунктат смешивают с гепарином (500 ЕД) и помещают в стерильный контейнер с герметической крышкой (объем 25 мл или 50 мл). 10 мл костного мозга разводят до 30 мл стерильной питательной средой ДМЕМ (минимальная среда Игла в модификации Дюльбекко). Этот образец помещают, не допуская перемешивания, в пробирку с 20 мл подогретого до комнатной температуры (18-23^{0}С) фиколла (плотность 1,077 или 1,115 г/л). Пунктат, наслоенный на фиколл, центрифугируют в течение от 25 до 60 минут при 1000 - 2000 об/мин, после чего отбирают клеточную фракцию на

границе фиколла и верхний слой супернатанта. Объясняется это тем, что на границе сред образуется белое кольцо, представляющее собой моноцитарную фракцию костного мозга, а на поверхности супернатанта находятся оставшиеся кусочки костного мозга.

Клеточную суспензию разбавляют эквивалентным или двукратным объемом среды ДМЕМ, содержащей антибиотики (пенициллин 100 ед/мл, стрептомицин 100 мкг/мл) и осаждают центрифугированием в течение 10 минут при 1000 об/мин. Клетки суспендируют в среде ДМЕМ, дополненной 20% фетальной бычьей сыворотки (FBS, fetal bovine serum), антибиотиками (пенициллин 100 ед/мл, стрептомицин 100 мкг/мл) и снова осаждают центрифугированием в том же режиме. Клеточный осадок и верхний слой пренатанта переносят в посуду для культивирования и покрывают средой культивирования, содержащей ДМЕМ с добавлением 15-22 % FBS и антибиотиков. Высев клеток производят с начальной плотностью 75-200 клеток на $см^2$ и помещают в CO_2 инкубатор на 18-52 часа. Затем тщательно отбирают среду культивирования, а клеточную культуру дважды промывают раствором Хенкса и покрывают свежей средой культивирования, подогретой до $+37^0$ С. Культуру помещают в CO_2 инкубатор на 56-72 часа, ежедневно наблюдая за ростом культуры; при необходимости, осуществляют замену половину объема кондиционированной среды культивирования на равный объем свежеприготовленной среды. Культуру пересевают с применением раствора трипсина на новую посуду с плотностью $1\text{-}2\cdot10^3$ клеток на 1 $см^2$. Культуру помещают в CO_2 инкубатор на 56-72 часа. Осуществив от 2 до 4 пассажей, получают популяцию клеток, характеризующуюся высокой однородностью по положительным маркерам (CD 90, CD 105, CD 106 и CD 44) – маркерам МСК. Выход составляет до 99,9% окрашенных клеток.

В процессе пересева и выращивания культуры количество снятых с матраса клеток подсчитывают с помощью камеры Горяева. Для этого суспендируют клеточный смыв, заполняют полученной суспензией камеру Горяева, подсчитывают количество клеток в 25 больших квадратах.

Подсчет клеток производят по формуле

$$\Sigma к \times 400 \times 1000 = \Sigma кл/мл,$$

где Σк – сумма клеток в 25 больших квадратах, Σкл/мл – количество клеток в 1 мл клеточной взвеси. До подсчета культивируемые клетки промывают раствором Хенкса, затем раствором трипсина, после чего помещают матрас на 1-3 минуты в CO_2 инкубатор с визуальным контролем за ошариванием клеток. При ошаривании не менее 80 % клеток клетки смывают с матраса теплой ($t^0 = +37^0C$) средой культивирования. При площади матраса 175 $см^2$ объем используемой среды равен 10 мл. После подсчета количества клеток, снятых с матраса, осуществляют следующий пассаж. Оценку качества МСК осуществляют с помощью антител FITC, PE, biotin, Cy, со стрептовидином ECD и с иодидом пропидия (PI). Определили клетки с фенотипом CD 45- CD 34-, CD 90+, CD 106+, CD 44+, CD 105+, которые являются мезенхимными. Клетки, непрокрашенные иодидом пропидия, являются жизнеспособными.

Изменение параметров проведения заявляемых процедур в сторону увеличения или уменьшения не может привести к указанному техническому результату изобретения, т. к. при этом наступает резкое снижение выхода МСК, нарушается однородность суспензии клеток.

Уменьшение времени и скорости центрифугирования приводит к потере кольца мононуклеарной фракции костного мозга, и тем самым снижает суммарный выход продукта на 25-30%. Это видно из диаграммы на рис. 1: по оси ординат – количество МСК на 7-ой день культивирования клеток. Показатель 1 – клетки, полученные из мононуклеарного кольца, образованного при центрифугировании в течение 30 минут при 1000 об/мин. Показатель 2 - клетки, полученные из массы, не являющейся четким мононуклеарным кольцом,т.е. при потере кольца, когда посевной материал выделен центрифугированием в течение 20 минут при 500 об/мин.

Изменение среды культивирования МСК в сторону уменьшения составляющей сыворотки или изменению питательной среды, например, на RPMI, приводит к увеличению сроков нарастания клеточного материала до 3-х месяцев. Данные представлены на рис. 2. По оси ординат – количество клеток, по оси абсцисс – дни роста. чМСК – МСК человека.

На данной диаграмме представлены результаты анализа роста клеточных культур МСК в различных условиях.

1. чМСК – стандарт, – усреднённые данные, полученные при использовании методики патента.

2. чМСК - 10 % сыворотки, усреднённые данные, полученные при использовании 10 % фетальной сыворотки.

3. чМСК - 5 % сыворотки, усреднённые данные, полученные при использовании 5% фетальной сыворотки.

4. чМСК – RPMI, усреднённые данные, полученные при использовании среды RPMI.

Из диаграммы видно, что методика оптимальна и отличия достоверны.

Снижение температуры фиколла до $+10^0$C приводит к потере градиента, а увеличение температуры повышает токсические свойства фиколла.

При сравнении заявляемого способа с известными, где выделение клеток также осуществляли центрифугированием следует отметить, что однородную по фенотипу популяцию клеток МСК по настоящему изобретению получали практически сразу, центрифугируя в фиколле суспензию гепаринизированного пунктата костного мозга в ДМЕМ. Уже на стадии выделения клеток на границе сред ДМЕМ – фиколл «пенка» содержит однородные клетки МСК, охарактеризованные шестью маркерами: CD 45-, CD 34-, CD 90+, CD106+, CD 44+, CD105+. Таким образом, популяция клеток МСК по заявляемому изобретению отличается от прототипа более полной, более четкой дифференцировкой: наличие маркера CD106+ – дополнительная характеристика однородности МСК.

Также в изобретении обработка посуды не являлась необходимой, используемая среда доступна, стандартна, широко применяется, не является специальной, плотность высева МСК 75-200 клеток на $см^2$, срок инкубации 56-72 часа. Таким образом, конечный продукт получается по изобретению ощутимо дешевле, с высоким выходом и однородностью.

Работая с клетками МСК реципиента-человека, выделенными из костного мозга, авторы изобретения не обрабатывали клетки химическими реагентами, чтобы минимизировать отрицательное воздействие на клетки.

В результате использования клеток, взятых из костного мозга пациента, в качестве посевного материала были получены необходимые для биотрансплантации клетки, количество которых в десятки раз превышает их содержание в костном мозге. После пассирования и снятия с матрасов был получен концентрат с содержанием: 8-10х 10^6 МСК в 1 мл.

Биотрасплантат для лечебного применения получают в виде суспензию клеток в 10% аутологичной сыворотке крови на физиологическом растворе, содержащую жизнеспособные аутологичные мезенхимальные стволовые клетки (МСК), однородные по клеточным маркерам CD 44+, CD 90+, CD 105+, CD 106+, CD 45-, CD 34-.

Вместо 10% аутологичной сыворотки крови на физиологическом растворе (растворителя в суспензии) можно использовать иные растворители, выбранные из фармацевтически приемлемых: аутоплазма в физрастворе, аутоплазма, аутосыворотка в любом % составе от 5 до 100, а также раствор глюкозы 10%, 5%, 7% на физрастворе. В 1 мл биотрасплантата содержится 0,7-1,2 х 10^6 МСК.

Предпочтительный вариант композиции для нейротрансплантации: аутосыворотка с физраствором.

Аутологичные клетки в мозге реципиента не вызывают осложнений в плане гистосовместимости. Они физиологичны, дают положительный эффект при лечении.

Первичный неспецифический эффект (длительностью до 6 месяцев) вызван тем, что трансплантированные МСК в процессе бурного роста активно выделяют весь набор нейротрофических факторов, различных аминокислот и цитокинов. Вторичный эффект связан с тем, что прижившиеся клетки, в силу своей природы, встраиваются в нейрональную и функциональную системы мозга реципиента, образуя с ними синаптические связи, и оказывая нормализующий эффект не

только на патологически функционирующие структуры, но и на деятельность всего мозга. Положительный эффект от этих операций может прослеживаться в течение длительного (многолетнего) периода.

Биотрансплантат по настоящему изобретению может быть использован при лечении поражения интеллектуально-мнестических функций различной этиологии. К этой большой группе расстройств относятся выраженные формы умственной отсталости.

Умственная отсталость детей регистрируется во всех странах, статистика говорит о 0,25-0,50% населения, имеющих интеллектуальный коэффициент (IQ) меньше 50, что характеризует тяжелую и выраженную умственную отсталость. Прогноз для них неблагоприятен. Врожденное слабоумие людей характеризуется двумя обязательными признаками: 1) общим психическим недоразвитием с преобладанием интеллектуальной недостаточности; 2) отсутствием прогредиентности, указывающей на патологический процесс (Сухарева Г. Е., Лекции по психиатрии детского возраста. М. Медицина. 1974 г. – 320 с.).

Одной из особенностей патогенеза олигофрении является то, что порок развития (дизонтогения) возникает в результате поражения организма, еще не закончившего развития. Этим он принципиально отличается от дефекта вследствие повреждения уже сформированного организма.

Клиническая картина дизонтогений, в том числе врожденных аномалий психического развития, существенно отличается от клиники поражений сформированных органов и систем. В первом случае имеется нарушение развития, а во втором – приобретенный дефект нормальных до того функций. Основной особенностью диффузного «тотального» недоразвития является нарушение психики в целом.

Отмечено, что у больных наблюдаются признаки недоразвитости интеллекта, мышления, других психических функций (восприятие, память, внимание, речь, моторика, эмоционально-волевая сфера и т. д.).

Картина поражения зависит не столько от природы и интенсивности повреждающего воздействия, сколько от особенностей того периода

онтогенеза, в котором пострадал развивающийся орган и организм в целом, т. е. от хроногенного фактора. В зависимости от глубины психического недоразвития выделяют 3 степени умственной отсталости: идиотию (IQ<20), имбецильность (IQ=20-50), дебильность (IQ=50-70).

Для нейротрансплантации используют собственные мезенхимальные стволовые клетки, полученные из костного мозга больного и в дальнейшем культивируемые in vitro. Клетки вводят в зоны поражения, т.е. паренхиматозно, в виде указанного выше биотрансплатата. Так же для лечения клетки вводят внутрисосудисто: в/а – внутриартериально, в/в – внутривенно, причем общее количество вводимых МСК составляет от 7 до 25 млн.

Для проведения нейротрансплантации используют биотрасплантат, содержащий 40-45 млн. юных МСК с концентрацией 0,7-1,2х 10^6 в 1 мл биотрасплантата, вводят в модифицированный стент, являющийся их носителем, В качестве носителя предпочтительно используют гемостатические губки. На стандартную гемостатическую губку 9х9 используют обычно 20 мл клеточной суспензии. Фрагменты насыщенного МСК стента с количеством МСК 7-12х 10^6 на одну зону имплантируют в один или несколько из заранее определённых участков коры головного мозга. Это, в первую очередь, область функциональных полей Бродмана 44, 43, 46, 24, 25, 22,41 и 42. В дальнейшем стент подвергается постепенному рассасыванию, а находившиеся в нём МСК вымываются током крови и интегрируют в паренхиму мозга. В некоторых случаях, для достижения большего эффекта, применяются одновременно интрапаренхиматозный и внутрисосудистый способы введения МСК, т.е. при операции совмещают оба способа введения клеток, причем дополнительное введение осуществляют дозировкой 0,5- 0,7 х 10^6 аутологичных мезенхимальных стволовых клеток на 1 кг веса больного.

Так как наработка аутологичных МСК для использования их в качестве биотрансплантата протекает во времени, могут возникнуть ситуации, когда наработка (накопление) клеток произведена, а пациент по самочувствию не готов для лечения. В таких случаях клеточный материал

подвергают криоконсервации, которая сохраняет МСК в неизменном виде. После разморозки клетки обладают всеми своими свойствами, имеют те же характеристики по фенотипу и остаются живыми. Криоконсервирование проводили с использованием в качестве криопротектора диметилсульфоксида, так как он фармацевтически приемлем и совместим с применяемыми растворителями в суспензии вводимых при лечении аутологичных клеток.

Биотрасплантаты после криоконсервирования были использованы в лечении пациентов так же, как юные клетки, описанные выше. Результаты лечения сопоставимы с применением свежеприготовленных биотрансплантатов.

При выраженных анатомических изменениях (или отсутствии) функционально значимых зон мозга, МСК вводят только внутрисосудисто (в\а - со скоростью 2 мл\мин, или в\в - со скоростью 6 мл. в\мин), причем общее количество вводимых МСК составляет от 7 до 25 млн. Количество МСК рассчитывают, исходя из 0,5- 0,7 х 10^6 клеток на 1 кг веса больного. Для трансплантации применяли свежеприготовленные клетки, если лечение производили с их помощью, или криоскопированные МСК, если в лечении участвовали они.

Одним из важных условий является сокращение временного интервала, между извлечением МСК из культивируемой среды и их трансплантацией непосредственно в мозг больного. Это связано с тем, что в каждую минуту этого периода определённое количество клеток становится нежизнеспособны, а это, в конечном счёте, влияет на конечный эффект.

Способ по изобретению был апробирован в НИПНИ им. В.М.Бехтерева, на отделении хирургии нервных и психических заболеваний.

Биотрансплантат по настоящему изобретению также может быть использован при лечении паталогически измененных тканей головного мозга, связанных с последствиями черепно-мозговой травмы (ЧМТ) или острого нарушения мозгового кровообращения (ОНМТ).

Последствия ЧМТ – эволюционно предопределенный и генетически закрепленный комплекс процессов в ответ на повреждение головного мозга и его покровов. К последствиям также относят и стойкие нарушения анатомической целостности головного мозга, оболочек и костей черепа, возникающие вследствие острой ЧМТ и сохраняющиеся в промежуточном и отдаленном периодах.

У 70% пострадавших с легкой и средней степени тяжести ЧМТ в определеннотдаленном периоде обнаруживаются различные проявления церебральной патологии,а у 30% - значительное снижение трудоспособности вплоть до инвалидизации.

После ЧМТ развивается комплекс репаративных и дистрофических реакций организма, поэтому последствия практически неизбежны после любой ЧМТ. Но в клиническом смысле о последствиях говорят, когда в результате повреждений, особенности реактивности мозга и всего организма, возрастных факторов и т.д., развивается стойкое патологическое состояние, требующее лечения.

В настоящее время выделяют следующие группы последствий ЧМТ:

- тканевые (мозговые и черепные) – атрофия мозга, арахноидит, оболочечно-мозговые рубцы, поражения черепных нервов, дефекты черепа, инородные тела и т.д.;
- ликвородинамические – гидроцефалия, порэнцефалия, ликворные фистулы, ликворные кисты и т.д.
- сосудистые – ишемические поражения, хронические гематомы, аневризмы, артериосинусные соустья, тромбоз синусов и т.д.
- сочетанные последствия.

Нарушения мозгового кровообращения (инсульты) возникают в результате ОНМК и приводят к инвалидизации. В РФ ежегодно происходит более 4ОО тыс.инсультов.

Необходимо в процессе лечения восстановить функции организма, ликвидировать дефект, приобретенный уже сформированным организмом, вимевшим до ЧМТ или ОНМК нормальные функции и развитие, навыки и интеллект.

Изменения происходят в интеллекте, мышлении, памяти, речи, моторике, эмоционально-волевой сфере, восприятии и т.д., развиваются посттравматические психозы. От глубины и локализации поражения головного мозга, нервной ткани зависят нарушения в организме.

У пациента проводят забор костного мозга для наработки пассированием клеточной массы аутологичных МСК и производят забор аутокрови для получения биотрансплантата. Доставленный в операционную биотрансплантат представляет собой аутологичные МСК, которые находятся в аутосыворотке крови. Клеточный материал заготовлен из расчета 5 млн в 1,0 мл аутосыворотки. При вскрытии контейнеров с клетками для исключения возможности инфицирования клетки дополнительно обрабатывают антисептиком. Их согревают до 34-36^0 С перед внесением в головной мозг, затем переносят на носитель(гемостатическую губку).

Интрацеребралбьное введение аутологичных МСК проводят следующим образом: по стандартным методикам осуществляют доступ и хирургическую обработку патологически измененных тканей. Производится тщательный гемостаз.

Перед операцией заранее определяли участок коры головного мозга для проведения нейротрансплантации (с наибольшими морфологическими и функциональными нарушениями), избегая введения МСК непосредственно в соединительно-тканные рубцовые образования и кистозные полости, трансплантацию производят в перифокальные зоны мозга с достаточным кровоснабжением. В первую очередь это область функциональных полей Бродмана 44,43, 46,24,25,22,41.42. При наличии изменений в функционально значимых зонах (зоны Брока, Вернике, область центральных извилин, кора затылочных долей) доступ к ним осуществляют внепроекционно для предотвращения нарастания неврологического дефицита в послеоперационный период.

В перифокальную зону субкортикально имплантируют носитель с клеточным материалом, после чего избегают каких- либо манипуляций в мозговой ране. Общий объем клеточного материала составляет 20-25

млн клеток. Твердую мозговую оболочку ушивают наглухо без дренирования субдурального пространства. Рану послойно ушивают с оставлением подкожного дренажа.

В дальнейшем носитель (модифицированный стент) подвергается постепенному рассасыванию. Находящиеся в нем МСК вымываются током крови и внедряются в паренхиму мозга.

При введении стента в толщу подкорки МСК вводят в 5 мл растворителя (объем клеточной суспензии).

Перед введением МСК производят хирургическую обработку патологических образований по стандартным методикам. Это необходимо, т.к. приживаемость и функциональная активность пересаженных клеток в значительной степени зависят от снабжения кислородом и питательными веществами. При соблюдении необходимых условий возможен неоангиогенез в ткани для проявления ее функциональных особенностей.

При наличии после ЧМТ гематомы гематому удаляют хирургическим путем, после чего в область травмы помещают гемостатическую губку, которую затем смачивают (на нее наносят) суспензией аутологичных МСК с концентрацией клеток 2 млн на 1 куб.см губки. Клетки используют при лечении однократно.

Введение МСК интрацеребрально осуществляют на носителе, в предлагаемом варианте, - на гемостатической губке. Количество вносимых в 1 зону коры головного мозга МСК составляет от 7 до 12 млн. Количество зон варьируется.

Введение аутологичных, однородных по фенотипу МСК осуществляют внутрисосудисто: внутривенно или внутриартериально. Скорость введения для внутривенного введения составляет 2 мл/мин., для внутриартериального - 6 мл/мин. Количество МСК рассчитывают, исходя из 0,5-0,7 млн клеток на 1 кг веса больного.

Был опробован метод с введением МСК путем внутрисосудистого и интрацеребрального введения одновременно или последовательно. Результат лечения положительный. Введение внутрисосудисто осуществляли биотрансплантатом, состоящим из МСК в 10% аутологичной

сыворотке крови на физиологическом растворе при концентрации клеток 0,7 – 1,2 x10^6 в 1 мл трансплантата. Внутрисосудистое введение производили из расчета до 1,2 млн МСК на 1 кг веса больного.

Введение МСК в мозг интрапаренхиматозно проводили, исходя из 7-12 млн клеток на 1 зону.

Клинический эффект подтвержден данными параклинических исследований (ЭЭГ, УЗДГ, ПЭТ, психологическими исследованиями и др.). Лечение провели на 20 больных. У всех отмечен положительный эффект.

ПРИМЕРЫ ВЫПОЛНЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Пример 1. МСК человека

Из грудины, под местной анестезией, пунктировали 10 мл костного мозга в шприц, стерильный, содержащий 500 ЕД гепарина.

Пунктат для дальнейшей работы перенесли в стерильный контейнер, представляющий собой пробирку объемом 50 мл с герметической крышкой. Процедуру фракционирования костного мозга (фенотипировали костный мозг) осуществляли в стерильных помещениях, в ламинарном шкафу 2-ого класса защиты, Kajar.

К полученному пунктату прибавили стерильную питательную среду ДМЕМ, доведя объем образца до 30 мл.

В стерильную пробирку на 50 мл поместили 20 мл фиколла (плотность 1,077 г/л) и, не допуская перемешивания сред, на фиколл наслоили 30 мл пунктата. Эту пробирку поместили в центрифугу с бакет ротором. Пунктат центрифугировали 40 минут на скорости 1500 об/мин при температуре t^0=20-22^{0}C (комнатная температура). Отобрали клетки, находящиеся на границе сред (образовалось специфическое белое кольцо, представляющее собой моноцитарную фракцию костного мозга), и собрали оставшиеся на поверхности супернатанта кусочки костного мозга.

Собранный материал поместили в стерильную пробирку и к нему добавили питательную среду ДМЕМ, объем которой в 2 раза больше объема отобранного материала.

Центрифугировали полученную суспензию в течение 5 минут на скорости 1500 об/мин при комнатной температуре.

Супернатант удалили, к осадку прибавили 12 мл среды культивирования, состоящей из ДМЕМ, 80%, и из сыворотки плодов коровы, 20%.

Суспензию клеток перенесли на матрас для культивирования площадью 75 $см^2$. Его поместили в CO_2 инкубатор на 48 часов. После эксплантации из матраса тщательно отобрали среду культивирования с оставшимися в суспензии клетками. Промыли матрас раствором Хенкса, 10 мл. Под инвертированным микроскопом оценили эффективность отмывки по количеству оставшихся в суспензии клеток (гемопоэтических клеток). В матрас для культивирования добавили подогретую до $+37^0C$ среду культивирования (80%, ДМЕМ, 20% сыворотки плодов коровы), объем 12 мл, после чего матрас поместили в CO_2 инкубатор на 3 дня. За ростом культуры наблюдали ежедневно, осуществляя кормление культуры путем замены 6 мл кондиционированной среды на 6 мл свежеприготовленной.

На 3-ий день культивирования с помощью инвертированного микроскопа оценили проективное покрытие матраса клетками первичной культуры костного мозга. Оно составило более 80%, поэтому произвели пересев культуры на матрас большей площади, площадь его 175 $см^2$. Пассаж 1 (P1).

Для пересева произвели следующие процедуры:

1. удалили кондиционированную среду культивирования;
2. промыли культивируемые клетки 10 мл раствора Хенкса;
3. промыли культивируемые клетки 4 мл раствора трипсина;
4. повторили промывку трипсином, 4 мл;
5. поместили матрас в CO_2 инкубатор на 2 минуты (время ошаривания клеток, за процессом наблюдали каждую минуту), за которые произошло ошаривание более 80% клеток;

6. смыли клетки с матраса 10 мл нагретой до $+37^0$ С средой культивирования;
7. поместили суспензию клеток в стерильную пробирку на 15 мл;
8. проверили качество снятия клеток с матраса с помощью инвертированного микроскопа: остаются на матрасе единичные клетки;
9. произвели подсчет клеток с помощью камеры Горяева. Они составили 8,4 млн.
10. перенесли клеточную суспензию в стерильный матрас для культивирования площадью 175 $см^2$;
11. добавили в матрас 15 мл среды культивирования и перемешали вращательным движением суспензию клеток;
12. поместили матрас в CO_2 инкубатор.

На второй день культивирования после Р1 проективное покрытие матраса составило более, чем 80 % площади 175 $см^2$ (по оценке с помощью инвертированного микроскопа). Произвели пересев культуры на три матраса, площадью каждый 175 $см^2$, пассаж 2 (Р2).

Повторили процедуру культивирования клеток на каждом матрасе, как описано для пассажа 1 в п.п.1-9.

Подсчет клеток с помощью камеры Горяева на стадии 9 дал 15,6 млн. клеток.

На стадии 10 объем клеточной суспензии довели с помощью среды культивирования до 15 мл, после чего по 5 мл ее перенесли на три стерильных матраса, каждый площадью 175 $см^2$. В каждый матрас прибавили 20 мл среды культивирования и поместили их в CO_2 инкубатор. Клетки культивировали 4 дня до проективного покрытия матраса более, чем на 80 %. Кормление клеточной культуры провели на 3-ий день путем замены 12 мл кондиционированной среды культивирования на 12 мл свежеприготовленной.

После пассажа 2 (Р2) выход клеток составил 58,3 млн. клеток.

Пассаж 3 (Р3) осуществили по аналогии с Р2, произведя пересев культуры с каждого матраса на 3 новых, каждый площадью 175 $см^2$.

Клеточную культуру после Р3 иммунофенотипировали окраской антителами к поверхностным антигенам с помощью проточного цитофлуориметра (Beckman Coulter), используя непрямую флуоресценцию. Клетки соответствуют иммунофенотипу МСК, т. к. положительны по CD 45- CD 34-, CD 90+, CD106+, CD 44+, CD 105+. Клетки являются жизнеспособными, т. к. не прокрашены иодидом пропидия. Результаты анализа в таблице №1.

Таблица №1 Характеристика полученных после пассажей мезенхимальных стволовых клеток

№ пробирки	Антитела FITC	Антитела PE	Антитела biotin	Антитела Cy	Стрептавидин ECD	PI
1	--				+	--
2	CD 44	CD 105	CD 106	CD 90	+	--
3	CD 71				--	--
4	CD45	CD 34			--	+
5		CD 106			--	--

Выход клеток после пассажа 3 составил 159 млн. клеток. Они характеризуются высокой однородностью: 99%. Все клетки жизнеспособны.

Пример 2. Методика оценка качества МСК.

В стерильных условиях отбирают 1-1,2 млн. клеток в объеме 250 мкл. Перемешав суспензию в пробирке с помощью автоматизированной пипетки, переносят по 50 мкл ее в микропробирки, маркированные цифрами от 1 до 5. Используя автоматическую пипетку, в пробирки вносят антитела в соответствии с таблицей №2:

Таблица №2 **Фенотипирование МСК**

№ пробирки	Антитела FITC	Антитела PE
1	Изотип контроль и CD 45	
2	CD 45	CD 34
3	CD 71	CD 34
4	CD 45	CD 90
5	CD 45	CD 106

Антитела вносят по 10 мкл, в соответствии с инструкцией по их применению. Содержимое пробирок перемешивают пипетированием и инкубирует 25 минут при t^0=20-22^{0}C (комнатная t^0) в темном месте, без света. Добавляют в каждую пробирку по 1 мл раствора Хенкса и центрифугируют при ускорении 400 об/мин в течение 5 минут. Удаляют из пробирок супернатант. В пробирки №1 и №2 вносят 2,5 мл стрептавидина ECD, перемешивают и инкубируют, как выше, 15 минут, затем вносят туда 1 мл раствора Хенкса, снова центрифугируют 5 минут при ускорении 400 об/мин, удаляют супернатант. Ресуспендируют клеточную суспензию в 400 мкл раствора Хенкса. Полученную клеточную взвесь перемешивают пипетированием.

В пробирку №4 вносят 0,5 мкл иодида пропидия, перемешивают на вортексе, затем пробирку инкубируют 5 минут в темноте при комнатной температуре. Прокрашенную клеточную суспензию анализируют в проточном цитофлуориметре EPICS XL (Beckman, Coulter, USA) или аналогичном.

Процедуры, применяемые для выделения МСК из костного мозга человека, могут использоваться для выделения МСК из костного мозга млекопитающих, если они являются необходимыми в ветеринарии или исследовательской работе для каких-либо целей.

Пример 3: МСК животных.

Забор костного мозга произведен у белых крыс. Суспензию выделяли из бедренных костей крыс сразу после декапитации.

Мозг подвергли следующим операциям, как в примере 1: дезагрегирование гепарином; приготовление его суспензии в среде ДМЕМ; после чего полученную суспензию аккуратно, без перемешивания наслоили на фиколл; центрифугирование суспензии осуществляли в фиколле с плотностью 1 115 г/л. Время центрифугирования – 40 минут, число оборотов – 1500 об/мин, температура фиколла +20^{0}С. На границе сред образовалось кольцо – «пенка», состоящая из клеток костного мозга. Клеточную суспензию разбавили равным ей по объему количеством среды ДМЕМ и повторно провели центрифугирование. Полученные клетки МСК были на 98% однородны по фенотипу CD 45-, CD 90+ (проверяли по 2-м маркерам).

Клетки поместили в стандартную посуду для культивирования, среда – ДМЕМ с добавлением 20% FBS. Проведено 3 пассирования. Получено $1{,}55 \cdot 10^6$ клеток с 1 мл костного мозга. По реакции с иодидом пропидия (окрашиваемость) клетки жизнеспособны, однородность клеток по фенотипу составляет 90,5% (маркеры CD 45-, CD 90+, CD 44+, CD 34-, CD105+, CD106+).

Пример 4:

Больная К., 1981 года рождения. Беременность у матери протекала с токсикозом, роды с выраженной асфиксией. Первые 7 суток жизни больная находилась в реанимации. Раннее развитие с задержкой, села в 1,5 года, самостоятельно пошла в 5 лет. Выражена задержка психоречевого развития с раннего детства. Больная постоянно лечилась различными медикаментами амбулаторно и более 12 раз в различных стационарах. Необучаема, положительной динамики в состоянии больной не отмечалось.

При поступлении в отделение (возраст 24 года) больная продуктивному контакту недоступна, практически себя не обслуживает. Обращённую речь понимает частично. Количество правильно употребляемых слов не превышает 3-8, правильно выполняемых команд – не превышает 5-7. Речь нечленораздельная. Уровень IQ соответствует умственной отсталости в степени идиотии (< 20). Выражен синдром двигательной гиперактивности с разрушительными тенденциями, внимание удерживается не более 2-3 секунд. Больная нуждается в постоянном уходе и наблюдении.

В связи с неэффективностью и бесперспективностью медикаментозного лечения, рассматривался вопрос о проведении нейротрансплантации. После положительного заключения этической комиссии и получения письменного согласия родственников, было принято решение о проведении интрапаренхиматозной аутотрансплантации мезенхимальными стволовыми клетками, культивированного из костного мозга самой больной.

В процессе операции, билатерально в лобную область (проекция точки Кохера) было интрапаренхиматозно введено по 7,5 млн. клеток и внутрисосудисто 7 млн. клеток. Операция прошла без осложнений, швы сняты на 8-ой день.

Уже в первые дни после операции заметно уменьшились явления моторной расторможенности, практически полностью исчезла агрессивность. Отмечалась положительная динамика в рече-двигательной и эмоциональной сферах. Через 0,5 года, после аутотрансплантации МСК, запас правильно употребляемых слов более 30, количество правильно выполняемых команд около 80. Больная полностью себя обслуживает, одевается, раздевается, убирает и стелит постель, самостоятельно пользуется туалетом. Может самостоятельно сварить себе кофе, убрать со стола и т.п. У больной появилась способность к обучаемости. Она с удовольствием, часами рассматривает (и правильно называет) картинки в книжках, смотрит телевизор, играет в куклы. Однако правильные, целенаправленные поступки совершаются больной только в отношении

«интересных» для неё действий. Заставить что-либо сделать помимо её желания, крайне проблематично. При дальнейшем наблюдении состояние больной продолжает прогрессивно улучшаться.

Пример 5:

Больной С. 1995 года рождения. Наследственность не отягощена. Беременность у матери протекала с токсикозом и отслойкой плаценты. Роды преждевременные (34 недели), кесаревым сечением. Через час после родов у ребёнка развилась асфиксия, и он был переведён в реанимационное отделение, где находился на ИВЛ в течение месяца. В дальнейшем развитие с задержкой. Головку держал с 6 месяцев, сел в 11 месяцев, самостоятельно встал в 13. Лепетная речь с 1,5 лет, отдельные слова и короткие словосочетания с 3 лет. В дальнейшем полностью перестал разговаривать, обращённую речь понимал частично. С рождения наблюдался неврологом, ставился диагноз: перинатальная энцефалопатия, синдром двигательных нарушений. Постоянно принимает медикаментозную терапию. С возраста 6 мес. Регулярно лечится в различных стационарах (17 госпитализаций), с различными диагнозами: от ДЦП (спастико-астеническая форма), до синдрома раннего детского аутизма (церебро-органического генеза). Последний год посещал «Центр реабилитации ребёнка» где отмечались реакции негативизма с агрессией в отношении педагогов и детей. Больной пытался обучаться по программе 1-го класса, однако программу не усваивал.

При поступлении: контакт формальный, продуктивному контакту не доступен, речь отсутствует. В поведении неадекватен, непоследователен, внимание крайне неустойчивое. Правильно выполняет 8-10 простых команд. Себя обслуживает частично, неопрятен. IQ снижен до уровня идиотии, способность к обучаемости отсутствует. В связи с отсутствием эффекта от лечения и продолжающимся ухудшением состояния больного было принято решение о проведении нейротрансплантации. После положительного решения этической комиссии и получения письменного согласия родственников была проведена аутотрансплантация

мезенхимальных стволовых клеток. В ходе аутотрансплантации, билатерально, в область префронтальной коры, больному было введено по 8млн. клеток и одновременно внутрисосудисто введено 53 млн. мезенхимальных стволовых клеток со скоростью 6 млн. клеток в минуту, введение внутривенное.

Уже в первые недели, после трансплантации у больного значительно уменьшилась агрессивность по отношению к окружающим. В дальнейшем больной начал правильно произносить и использовать короткие слова и словосочетания. Значительно расширилась сфера самообслуживания, больной начал самостоятельно пользовать туалетом, одеваться-раздеваться, убирать постель и т.п. Последующий катамнез, показал заметное улучшение вербальных и когнитивных функций, у больного появилась способность к обучаемости.

Пример 6:

Больной А. 1992 года рождения. Беременность у матери протекала с токсикозом, роды с выраженной асфиксией. Развитие с задержкой. Отмечены прогрессирующая задержка психоречевого развития, агрессивность в общении, неустойчивость внимания и отсутствие памяти при обучении.

Уровень IQ<50. После заключения комиссии о бесперспективности медикаментозного лечения и получения письменного согласия родственников была проведена операция по трансплантации аутологичных мезенхимальных стволовых клеток (МСК). МСК выделены из костного мозга пациента путем обработки ткани до получения однородных по фенотипу клеток, культивированных затем in vitro. Трансплантат представлял собой модифицированный стент, являющийся носителем, насыщенный МСК, количество клеток, внесенных в зоны головного мозга, в сумме составило 42 млн.

В процессе операции интрапаренхиматозно билатерально в лобную область ввели биотрансплантат. Через 7 дней сняли швы. Отмечено

улучшение состояния больного через 2 недели. Агрессивность не наблюдается. Наблюдение в течение года подтвердило правильность решения о проведении операции: больной стал обучаем, увеличился запас слов, отмечена положительная динамика в рече-двигательной и эмоциональной сферах.

Пример 7:

Больная В. 1996 года рождения. Беременность у матери протекала с токсикозом. Роды без особенностей. С 2-х лет поставлен диагноз «задержка психоречевого развития», затем – «стереотипии у больной с задержкой развития». В возрасте 8 лет интеллектуальное развитие соответствовало возрасту 2-х лет (эмбецильность). После получения разрешения родителей больной были внутрисосудисто введены МСК. Введение осуществляли внутривенно со скоростью 6 млн. клеток в минуту и внутриартериально со скоростью 2млн/мин. МСК являлись аутологичными, они были получены из костного мозга пациентки и культивированы in vitro. Общее количество внесенных клеток составило 54 млн. Клетки были однородны по фенотипу и жизнеспособны.

Наблюдение за больной в течение первого месяца после введения МСК показало значительное улучшение состояния пациентки, что проявлялось как в поведении, так и в проявлении интереса при показе картинок в книжках, в устойчивости внимания. Наблюдение за ребенком продолжается, отмечен прогресс в психоречевом развитии.

Пример 8:

Больная П. 1989г.р. Находилась в отделении с Диагнозом: ДЦП, спастическая форма с выраженной задержкой развития (имбецильность). 24.02.05. был произведён забор костного мозга с последующим культивированием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток и хранением полученной культуры в условиях специального, глубокого

замораживания. При повторной госпитализации (11.04.05) готовая культура МСК была размножена и трансплантирована больной путем внутрисосудистого введения, причем общее количество вводимых МСК составило 25 млн. клеток, введение осуществляли внутриартериально со скоростью 2 млн. клеток в минуту.

До трансплантации состояние характеризовалось, полным отсутствием речи, частичным самообслуживанием, тотальной расторможенностью, раздражительностью, отсутствием способности к обучаемости и необходимостью в постоянном уходе и наблюдении. Через год, при контрольной госпитализации, было зафиксировано значительное клиническое улучшение. Уровень невербального интеллекта значительно увеличился ($p < 0,03$). Хотя речь и не сформировалась, больная начала произносить отдельные слоги и короткие слова. Запас слов достигает 50, количество правильно выполняемых команд > 100. Может часами самостоятельно играть или смотреть телевизор. У больной появилась способность к обучаемости, она полностью себя обслуживает. Стала полностью себя обслуживать. Значительные, положительные изменения были получены по результатам социально-бытового тестирования ($p < 0,01$).

Пример 9.

Больная С. 1995 г. рождения поступила через 2 месяца после тяжелой сочетанной черепно-мозговой травмы с преимущественным поражением базально-стволовых структур и признаками ДАП. Состояние тяжелое. Проведено несколько оперативных вмешательств. Затем лечение проводили с помощью внутрисосудистого и интрацеребрального введения жизнеспособных аутологичных МСК, полученных из костного мозга больной. Внутрисосудистое введение аутологичных МСК осуществляли внутриартериально. Было введено 20 млн. МСК, т.е. 0,7 млн МСК на 1 кг веса больного. Введение МСК осуществляли со скоростью 2 млн/мин. Через 20 дней проведена операция по удалению гемотомы мозга и введен

интрацеребрально биотрансплантат: носитель с аутологичными МСК. После этого повторили системное внутрисосудистое введение МСК, осуществляя его внутривенно при скорости введения 6 млн/мин.

Через 2,5 месяца лечения с помощью МСК достигнуто удовлетворительное состояние больной. По витальным функциям стабильна. Положительный эффект лечения сохраняется, что подтвердил контроль через 8 месяцев.

Пример 10.

Больная П. , 1947 г. рождения. В анамнезе – ОНМК. Поступила через 3,5 года после травмы. Лечение осуществляли с помощью внутрисосудистого и интрацеребрального введения жизнеспособных аутологичных МСК, полученных из костного мозга больной. Аутологичные клетки для трансплантации были взяты после их выращивания (накопления) in vitro. ЭЭГ до операции: межполушарная ассиметрия; в правом полушарии отмечаются легкие общемозговые изменения резидуально-органического характера, слева-значительные. Очаг органической активности в левой височной области. Операция КПТЧ проведена в левой лобно-теменно-височной области. Осуществили дренирование кист левой гемисферы головного мозга, после чего произвели интрацеребральное введение биотрансплантата, состоящего из аутологичных МСК и аутологичной сыворотки крови. МСК взяты из расчета 7-12 млн. на одну зону Бродмана. Через 8 дней начали осуществлять системное внутрисосудистое введение аутологичных МСК путем внутривенного введения при скорости введения 6 млн/мин. Разовое введение МСК 12 млн.

Повторная госпитализация проведена через 6 месяцев. По сравнению с ЭЭГ после первого введения МСК отмечено небольшое уменьшение общемозговых и очаговых нарушений. Провели курс лечения, включающий системное внутрисосудистое введение МСК (внутривенное). Общее количество клеток составило 36 млн. МСК.

В результате лечения достигнуто стойкое удовлетворительное состояние больной.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биотрасплантат для лечебного применения, характеризующийся тем, что в качестве активного компонента содержит жизнеспособную, однородную на 87-99,9% по клеточным маркерам CD 44+, CD 90+, CD105+, CD106+, CD 45-, CD 34- популяцию мезенхимальных стволовых клеток, полученную из костного мозга млекопитающего, и фармацевтически приемлемый носитель.

2. Биотрасплантат по п.1, отличающийся тем, что костный мозг млекопитающего получают из грудины и/или крыла подвздошной кости таза.

3. Биотрасплантат по п.2, отличающийся тем, что костный мозг является донорским.

4. Биотрасплантат по п.2, отличающийся тем, что костный мозг является аутологичным.

5. Биотрасплантат по любому из п.1-4, отличающийся тем, что содержит свежеприготовленную популяцию мезенхимальных стволовых клеток.

6. Биотрасплантат по любому из п.1-4, отличающийся тем, что содержит популяцию мезенхимальных стволовых клеток, криоконсервировнную, в частности, с использованием в качестве криопротектора диметилсульфоксида.

7. Способ получения упомянутой популяции мезенхимальных стволовых клеток (МСК) с однородностью по фенотипу на 87-99,9% по клеточным маркерам CD 44+, CD 90+, CD105+, CD106+, CD 45-, CD 34- из костного мозга млекопитающих, включающий выделение МСК с помощью центрифугирования и выращивание в культуральной среде, отличающийся тем, что жизнеспособные клетки выделяют на границе сред ДМЕМ – фиколл на второй стадии обработки исходного материала после центрифугирования в течение 25-60 минут наслоенной на фиколл суспензии клеток гепаринизированного пунктата костного мозга в ДМЕМ при скорости 1000-2000 об/мин., выращивание клеточной массы осуществляют из полученных МСК в стандартной посуде с использованием среды ДМЕМ с

добавлением 15-22% FBS путем высева клеток с плотностью 75-200 клеток на 1 $см^2$ и с продолжительностью инкубирования 18-52 часов.

8. Способ по п.7, отличающийся тем, что клеточную массу в количестве $1,5\text{-}3\cdot10^6$ до $1,5\text{-}3\cdot10^7$ клеток на 1 мл исходного костного мозга получают в результате трех пассажей.

9. Способ по п.7, отличающийся тем, что центрифугирование осуществляют в фиколле плотностью 1,077 г/л или 1,115 г/л при температуре 18-23^{0}С.

10. Биотрасплантат для лечебного применения, характеризующийся тем, что жизнеспособная популяция однородных на 87-99,9% по клеточным маркерам CD 44+, CD 90+, CD 105+, CD 106+, CD 45-, CD 34- мезенхимальных стволовых клеток (МСК) является полученными из костного мозга аутологичными МСК, содержащимися в 10% аутологичной сыворотке крови на физиологическом растворе или в фармацевтически приемлемом растворителе.

11. Биотрасплантат по п.10, отличающийся тем, что содержит свежеприготовленную популяцию мезенхимальных стволовых клеток.

12. Биотрасплантат по п.10, отличающийся тем, что содержит популяцию мезенхимальных стволовых клеток, криоконсервировнную, в частности, с использованием в качестве криопротектора диметилсульфоксида.

13. Биотрасплантат по п.11 или п.12, отличающийся тем, что концентрация МСК составляет $0,7 – 1,2 \times 10^6$ в 1 мл биотрасплантата.

14. Биотрасплантат по п.13 отличающийся тем, что для интрацеребрального введения содержит фармацевтически приемлемый носитель.

15. Биотрасплантат по п.14, отличающийся тем, что носителем МСК является гемостатическая губка.

16. Применение биотрансплантата по п.13 или п.14 для лечения больных с выраженным психическим недоразвитием.

17. Способ лечения больных с выраженным психическим недоразвитием путем использования лечебных средств, отличающийся тем, что в качестве лечебного средства используют биотрансплантат по п.14 или п.15, который вводят паренхиматозно в одну или несколько зон Бродмана 44, 43, 46, 24, 25, 22,41 и 42 в терапевтически эффективном количестве.

18. Способ лечения по п.17, отличающийся тем, что количество аутологичных мезенхимальных стволовых клеток составляет 7-12 млн на одну зону Бродмана.

19. Способ лечения по п.17, отличающийся тем, что дополнительно вводят биотрасплантат по п.13 внутрисосудисто с дозировкой 0,5- 0,7 х 10^6 аутологичных мезенхимальных стволовых клеток на 1 кг веса больного.

20. Способ лечения больных с выраженным психическим недоразвитием с применением лечебных средств, отличающийся тем, что в качестве лечебного средства используют биотрасплантат по п.13, который вводят внутрисосудисто путем внутриартериального и/или внутривенного введения в терапевтически эффективном количестве.

21. Способ лечения по п.19 или п.20, отличающийся тем, что внутриартериальное введение биотрансплантата осуществляют со скоростью 2 мл\мин.

22. Способ лечения по п.19 или п.20, отличающийся тем, что внутривенное введение биотрансплантата осуществляют со скоростью 6 мл в\мин.

23. Применение биотрансплантата по п.13 или п.14 для лечения больных с последствиями черепно-мозговой травмы и острыми нарушениями мозгового кровообращения.

24. Способ лечения последствий черепно-мозговой травмы и острых нарушений мозгового кровообращения путем использования лечебных средств, отличающийся тем, что в качестве лечебного средства используют биотрансплантат по п.14 или п.15, который вводят паренхиматозно и/или биотрасплантат по п.13, который вводят внутрисосудисто.

25. Способ лечения по п.24, отличающийся тем, что биотрасплантат по п.13 вводят внутрисосудисто с дозировкой 0,5- 0,7 x 10^6 аутологичных мезенхимальных стволовых клеток на 1 кг веса больного.

26. Способ лечения по п.24, отличающийся тем, что терапевтически эффективное количество МСК вводят интрацеребрально в выбранные для лечения зоны коры головного мозга.

27. Способ лечения по п.24, отличающийся тем, что количество аутологичных мезенхимальных стволовых клеток составляет 7-12 млн на одну зону.

28. Способ лечения по п.26 или п.27, отличающийся тем, что внутриартериальное введение биотрансплантата осуществляют со скоростью 2 мл\мин.

29. Способ лечения по п.26 или п.27, отличающийся тем, что внутривенное введение биотрансплантата осуществляют со скоростью 6 мл. в\мин.

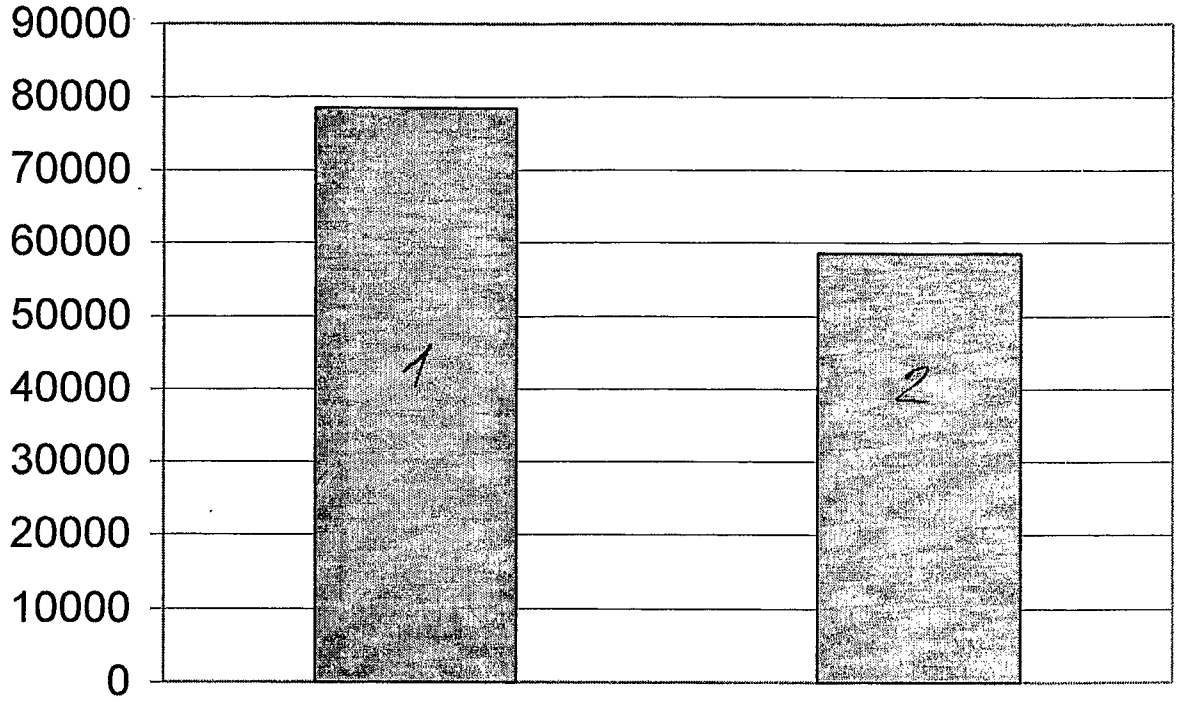


рис.1

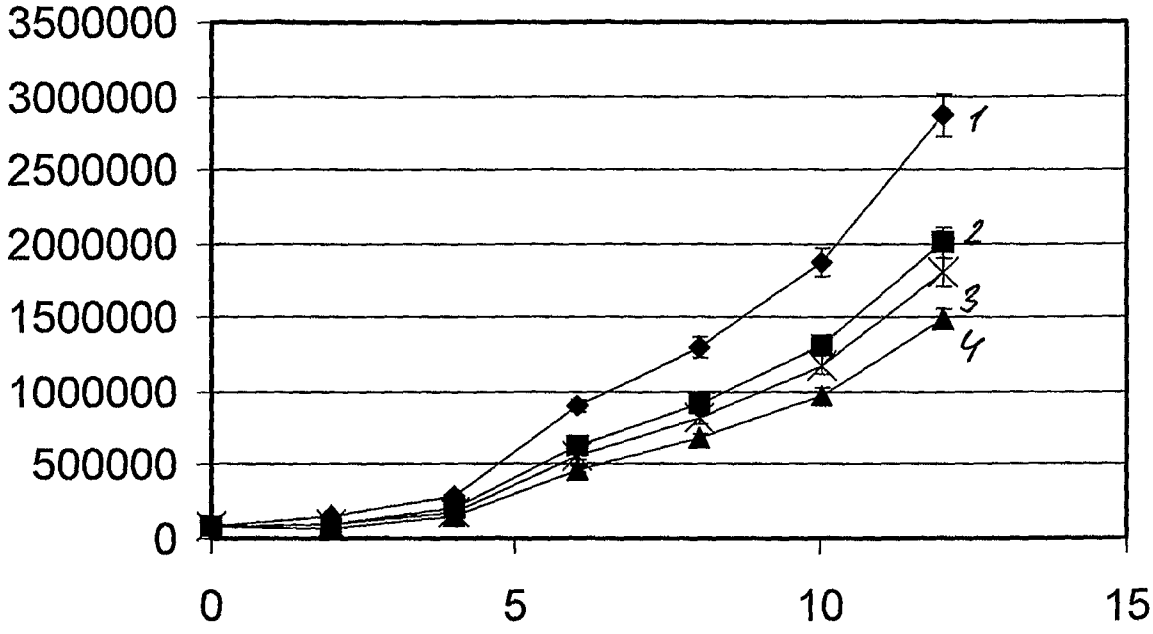

3500000
3000000
2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
0
5
10
15
1
2
3
4

рис.2