

(19)



Евразийское  
патентное  
ведомство

(21) 202490035 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки  
2024.09.30

(51) Int. Cl. *A61K 35/407* (2015.01)  
*A61P 43/00* (2006.01)

(22) Дата подачи заявки  
2023.08.15

(54) СПОСОБ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ПАРЕНХИМЫ СЕЛЕЗЕНКИ В ТКАНЬ,  
ФУНКЦИОНИРУЮЩЮЮ В КАЧЕСТВЕ ПАРЕНХИМЫ ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

(31) 2023/0158.1

(32) 2023.03.06

(33) KZ

(96) KZ2023/057 (KZ) 2023.08.15

(71) Заявитель:

ТАНАБАЕВА ШЫНАР  
БАЙМАХАНОВНА (KZ)

(72) Изобретатель:

Алмабаев Ыдырыс Алмабаевич,  
Фахрадиев Ильдар Рафисович,  
Фазылов Тимур Ринатович (KZ)

(57) Изобретение относится к медицине, а именно к биотехнологической промышленности, где выполняется введение общей анестезии, подготовка операционного поля, доступ через верхнесрединную лапаротомию, резекцию доли печени или части печени и канюлирование резецированной доли печени или промывка теплым физиологическим раствором. Затем проводится удаление стромы от паренхимы механическим путем и/или скарификацией в физиологическом растворе температурой 38°C с добавлением гепарина в дозе 1000 Ед/л с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 500 об/мин и введением в паренхиму селезенки шприцем с диаметром иглы 1,2 мм. Задачей предполагаемого изобретения является разработка способа преобразования паренхимы селезенки в ткань, функционирующую в качестве паренхимы печени в эксперименте. Техническим результатом является получение ткани, функционирующей в качестве паренхимы печени в эксперименте.

A1

202490035

202490035

A1

# СПОСОБ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ ПАРЕНХИМЫ СЕЛЕЗЕНКИ В ТКАНЬ, ФУНКЦИОНИРУЮЩУЮ В КАЧЕСТВЕ ПАРЕНХИМЫ ПЕЧЕНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

МПК 611.08

Изобретение относится к медицине, а именно к биотехнологической промышленности, где выполняется введение общей анестезии, подготовка операционного поля, доступ через верхнесрединную лапаротомию, резекцию доли печени или части печени и канюлирование резецированной доли печени или промывка теплым физиологическим раствором. Затем проводится удаление стромы от паренхимы механическим путем и/или скарификацией в физиологическом растворе температурой 38°C с добавлением гепарина в дозе 1000Ед /л. с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 500 оборотах/мин, и введением в паренхиму селезенки шприцем с диаметром иглы 1.2 мм.

На сегодняшний день является актуальным вопросом портальная гипертензия, которая является серьезным осложнением цирроза, и ее последствия, включая асцит, варикозное расширение вен пищевода, печеночную энцефалопатию и гепаторенальный синдром, приводят к значительной заболеваемости и смертности [Turco L, Garcia-Tsao G. Portal Hypertension: Pathogenesis and Diagnosis. Clin Liver Dis. 2019 Nov;23(4):573-587. doi: 10.1016/j.cld.2019.07.007]. Портальная гипертензия определяется как устойчивое повышение внутрипросветного давления в воротной вене и ее коллатералях со средним давлением более 12 мм рт. ст.

В целях лечения портальной гипертензии было разработано большое количество хирургических методик (шунты и процедуры деваскуляризации), и многие публикации поддерживают или отвергают их применение [Mercado MA. Surgical treatment for portal hypertension. Br J Surg. 2015 Jun;102(7):717-8.].

Одним из хирургических направлений является создание тотальных хирургических шунтов. Тотальные шунты направляют весь портальный

поток в системный кровоток. Тотальные шунты останавливают кровотечение примерно в 95% случаев, но ценой 40-50% случаев печеночной энцефалопатии. В экстренных ситуациях, когда кровотечение невозможно контролировать менее инвазивными средствами, тотальные шунты могут спасти жизнь, и энцефалопатия становится вторичным фактором [Collins JC, Sarfeh IJ. Surgical management of portal hypertension. West J Med. 1995 Jun;162(6):527-35.]. К ним относится любой шунт диаметром более 10 мм между воротной веней или одним из ее основных притоков и нижней полой веней или одним из ее основных притоков (портокавальные шунты конец в бок или конец в конец, мезокавальный шунт) [Stipa S, Balducci G, Ziparo V et al. Total shunting and elective management of variceal bleeding. World Journal of Surgery 1994; 18: 200±204].

На основании некоторых исследований, результаты проведенного ранее систематического обзора показывают значимость хирургических шунтов у пациентов с портальной гипертензией [Huang L, Yu QS, Zhang Q, Liu JD, Wang Z. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt versus surgical shunting in the management of portal hypertension. Chin Med J (Engl). 2015 Mar 20;128(6):826-34.]. С точки зрения заболеваемости, смертности, 2- и 5-летней выживаемости хирургическое шунтирование превосходило TIPS, как и вероятность функционирования шунта [Huang L, Yu QS, Zhang Q, Liu JD, Wang Z. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt versus surgical shunting in the management of portal hypertension. Chin Med J (Engl). 2015 Mar 20;128(6):826-34.].

Процедуры шунтирования, хотя и не являются лечебными, обеспечивают более длительное и эффективное лечение, чем медикаментозная или эндоскопическая терапия, в предотвращении повторного варикозного кровотечения [Rosemurgy AS, Zervos EE: Management of variceal hemorrhage. Curr Probl Surg 40:263-343, 2003].

Однако у шунтов есть недостатки, связанные с пропуском портальной крови в обход печени, которая выполняет метаболические функции. Это

приводит к предрасположенности пациента к развитию печеночной энцефалопатии, а также острой печеночной недостаточности [Crossan K, Jones MW. Portacaval Shunt. 2022 Oct 24. In: StatPearls Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. PMID: 33085359.]. Печеночная энцефалопатия - это особый вид дисфункции головного мозга, вызванный печеночной недостаточностью и/или портально-системным шунтированием [Amodio P. Hepatic encephalopathy: Diagnosis and management. Liver Int. 2018 Jun;38(6):966-975.]. Энцефалопатия после наложения шунтов может возникать из-за уменьшения гепатопетального кровотока, что приводит к функциональному нарушению органа и к увеличению поступления токсических веществ в системный кровоток через печень [Sachdev A, Duseja A. Decompressive shunts and hepatic encephalopathy. Indian J Gastroenterol. 2003 Dec;22 Suppl 2:S21-4.].

Среди методов предотвращения существует консенсус в отношении лечения осложнений печеночной энцефалопатии, что все мероприятия направляются на очистку кишечника, чтобы содержание аммиака кишечника и, возможно, других токсичных веществ, производимых кишечником/ микробиотой, в крови снижается. Аммиак остается ключевым нейротоксином кишечного происхождения, участвующим в патогенезе печеночной энцефалопатии [Butterworth RE, Giguere JF, Michaud J, Lavoie J, Layrargues GP. Ammonia: key factor in the pathogenesis of hepatic encephalopathy. Neurochem Pathol 1987; 6:1±12]. Очистка кишечника обычно проводится с использованием нерассасывающихся дисахаридов, которые обладают как катарсическим, так и пребиотическим действием, вызывая подкисление толстой кишки (что уменьшает обратную- диффузию аммиака из просвета кишечника в кровь) и способствующий использованию азота для роста бактерий, что увеличивает выведение азота из кишечника [Amodio P. Hepatic encephalopathy: Diagnosis and management. Liver Int. 2018 Jun;38(6):966-975.]. Наиболее широко принятым препаратом в качестве первой линии лечения является лактулоза. Также используются другие препараты, такие как рифаксимин и неомицин.

[Gluud LL, Dam G, Borre M, et al. Oral branched-chain amino acids have a beneficial effect on manifestations of hepatic encephalopathy in a systematic review with meta-analyses of randomized controlled trials. *The Journal of nutrition*. 2013; 143: 1263-8]. Однако, несмотря на достаточно широкий спектр медикаментозных средств для снижения признаков печеночной энцефалопатии, данные средства не показывают длительной эффективности [Fallahzadeh MA, Rahimi RS. Hepatic Encephalopathy: Current and Emerging Treatment Modalities. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2022 Aug;20(8S):S9-S19.].

Таким образом, возникло предположение, что преобразование либо переброс функции печени на селезенку могло быть оптимальным решением для предотвращения развития осложнений связанных с метаболическими нарушениями возникающих вследствие наложения шунтов при портальной гипертензии.

Мы предложили здесь подход «преобразования» для решения данной проблемы. Он направлен на реконструкцию существующего органа в организме для развития функции другого, дисфункционального. Как известно, печень имеет обширную, взаимосвязанную сосудистую сеть, которую трудно имитировать в искусственных тканях, и обеспечивает клеточно-адгезивное микроокружение (B. E. Uygun, A. Soto-Gutierrez, H. Yagi, M. L. Izamis, M. A. Guzzardi, C. Shulman, J. Milwid, N. Kobayashi, A. Tilles, F. Berthiaume, M. Hertl, Y. Nahmias, M. L. Yarmush, K. Uygun, Organ reengineering through development of a transplantable recellularized liver graft using decellularized liver matrix. *Nat. Med*. 16, 814–820 (2010)). В то время как, трансформируемый орган должен быть функционально необязательным и достаточно большим, чтобы он мог адекватно выполнять функцию жизненно важного заменяемого органа. В виду крупных размеров, обильного кровоснабжения [Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure and function of the immune system in the spleen. *Sci Immunol*. 2019 Mar 1;4(33):eaau6085.], сравнительного сохранения качества жизни после спленэктомии [Lewis SM, Williams A, Eisenbarth SC. Structure and function of the immune system in the

spleen. *Sci Immunol.* 2019 Mar 1;4(33):eaau6085.], селезенка может быть таким подходящим органом для трансформации [C. N. Inra, B. O. Zhou, M. Acar, M. M. Murphy, J. Richardson, Z. Zhao, S. J. Morrison, A perisinusoidal niche for extramedullary haematopoiesis in the spleen. *Nature* 527, 466–471 (2015)].

Известен способ имплантации аутологичных, аллогенных или ксеногенных клеток печени (первичные или иммортализованные), которые выживали и размножались в реконструированной селезенке, не вызывая побочных реакций в эксперименте на мышах [Chunyan Liu, Lintao Wang, Mengzhen Xu, Yajie Sun, Zhen Xing, Junfeng Zhang, Chunming Wang, Lei Dong, Reprogramming the spleen into a functioning ‘liver’ in vivo, *Gut*, 71, 11, (2325-2336), (2022)]. Результаты данного исследования показывают, что исследователи в эксперименте превратили селезенку в орган, который функционирует как печень. Трансформация селезенки в функционирующую печень проходила в два этапа: ремоделирование ткани селезенки и пересадка клеток печени в реконструированную селезенку. Пересаженные клетки печени — аутотрансплантат, аллотрансплантат или ксенотрансплантат — должны выживать, расти и выполнять физиологические функции печени в организме мыши (“гепатизация”).

Недостатком данного способа является то, что хирургическая операция по перемещению селезенки для облегчения последующих повторных внутриселезеночных инъекций в техническом плане была трудоемкой, также в данный процесс не был задействован кровоток. В частности, это заключалось в перемещении мышинной селезенки с ее первоначального места в брюшной полости в подкожное место, что и показывает сравнительную сложность воспроизведения данной манипуляции в эксперименте.

Известен способ применения биоискусственной печени для обеспечения детоксикационной активности и предотвращения системных проявлений острого повреждения печени (US10792410B2). В данной работе применялось устройство - биоискусственная печень в виде сфероидного резервуара (SRBALs). Система кровообращения пациента может быть подключена к

устройству с помощью двухпросветного венозного катетера, который способен обеспечивать скорость перфузии крови порядка 100-200 мл/мин. Устройство может работать аналогично непрерывному веновенозному гемодиализу. Устройство SRBAL может обеспечить множество аспектов экстракорпоральной поддержки печени, включая детоксикацию отходов жизнедеятельности пациента и доставку водных метаболитов, факторов роста и других, пока еще не идентифицированных продуктов первичных клеток печени обратно пациенту. Эти процессы могут включать перенос массы через мембрану из полых волокон как путем диффузии, так и конвекции. Диффузия может быть в первую очередь определена площадью поверхности мембраны из полых волокон и градиентом концентрации через мембрану, в то время как конвекция может быть определена потоком жидкости через мембрану, заданным условиями перекачки. SRBAL терапия может принести двойную пользу, поскольку обеспечивает важные функции печени, такие как детоксикация аммиака до мочевины, а также снижает реакцию синдрома системной воспалительной реакции на острое повреждение печени.

Недостаток данного способа заключается в сложности воспроизведении всех этапов.

Известно изобретение, которое включает применение клеток, культивируемых в трехмерной гелевой матрице внутри биореактора, такого как система с полым волокном или плоским слоем. В частности, в этом биореакторе сохраняются клетки печени, что позволяет использовать это устройство в качестве биоискусственной печени для пациентов с печеночной недостаточностью.

Прототипом нашего изобретения является способ прививки клеток печени субъекту с заболеванием или дисфункцией печени. Для этого непосредственно в или на печень субъекта вводят смесь, содержащую клетки печени и один или несколько биоматериалов, полученных из модифицированной тиолом карбоксиметил НА (СМНА-S), причем клетки

печени содержат одну или несколько комбинаций одной или нескольких эпителиальных клеток и одного или нескольких из мезенхимальных линейных клеточных партнеров. Также предложен способ введения в или на печень субъекта смеси, содержащей клетки печени и один или несколько биоматериалов, причем клетки печени содержат один или несколько предшественников клеток печени, и по меньшей мере один или несколько биоматериалов произведены из модифицированной тиолом карбоксиметил НА (СМНА-S), при этом смесь получают как гидрогель, содержащий клетки, смешивая СМНА-S, полиэтиленгликольдиакрилат (PEG-DA) и клетки с последующим сшиванием посредством PEG-DA. Данное изобретение позволяет обеспечить необходимую пролиферацию и трансплантацию поврежденной ткани за счет доставки трансплантируемых клеток в виде агрегатов, прикрепленных внутри или к поверхности подложек, которые могут быть помещены в поврежденную ткань (RU2736955C2).

Исходя из этого задачей предполагаемого изобретения является разработка способа преобразования паренхимы селезенки в ткань, функционирующую в качестве паренхимы печени в эксперименте.

Техническим результатом является получение ткани, функционирующей в качестве паренхимы печени в эксперименте.

Данный способ иллюстрируется следующим образом.

Эксперименты на лабораторных животных проводились в операционной лаборатории Лаборатории экспериментальной медицины НИИ фундаментальной и прикладной медицины им. Б. Атчабарова (г. Алматы, Казахстан). Для экспериментов были выбраны кролики, в связи с удобством работы (размеры органов, отсутствие необходимости специального инструментария).

Место операции тщательно выбривали и выполняли введение тотальной внутривенной комбинированной анестезии (кетамин 80 мг/кг + ксилазин 10 мг/кг). Доза и время введения анестетиков заносились в журнал эксперимента. Лабораторных животных фиксировали на доске в положении

на спине. Все операции выполняли с использованием бинокулярных очков (увеличение 1,2–3,5×, Китай). Доступ был произведен путем верхнесрединной лапаротомии, с последующей резекцией доли печени.

Резецированную печень канюлировали, а в последующем промывали физиологическим раствором (раствор теплый 38 градусов по Цельсию). Промывали до тех пор, пока все элементы крови не удалились. Далее удаляли строму от паренхимы с помощью скарификации. Таким образом была получена паренхима печени.

Затем полученную субстанцию или клеточную суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 500 оборотах/мин, для отделения гепатоцитов от перфузионной среды.

Проверяли полученный субстрат на количество живых клеток путем подсчета числа клеток и определение доли жизнеспособных клеток посредством камеры Горяева. Полученный гомогенат, содержащий полный клеточный спектр аутокани печени, вводили в паренхиму селезенки.

В результате наблюдения за экспериментальными животными в течении 1 месяца после применения метода не было обнаружено осложнений. Контроль приживаемости клеток проводился путем изъятия селезенки и выполнения гистологического исследования.

Таким образом, способ преобразования ткани селезенки в ткань, функционирующую в качестве печени в эксперименте, показывает эффективность для работ, направленных на изучение гепатоцитов.

## ФОРМУЛА

Способ преобразования паренхимы селезенки в ткань, функционирующую в качестве паренхимы печени в эксперименте, включающий введение общей анестезии, подготовку операционного поля, доступ через верхнесрединную лапаротомию, резекцию доли печени или части печени и канюлирование резецированной доли печени или промывку теплым физиологическим раствором **отличающийся тем, что** удаляют строму от паренхимы механическим путем и/или скарификацией в физиологическом растворе температурой 38°C с добавлением гепарина в дозе 1000Ед /л. с последующим центрифугированием в течение 5 мин при 500 оборотах/мин, и введением в паренхиму селезенки шприцем с диаметром иглы 1.2 мм.

**ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ**

(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

**202490035****А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:**

МПК:

**A61K 35/407** (2015.01)  
**A61P 43/00** (2006.01)

СПК:

**A61K35/407**  
**A61P 43/00****Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:**

A61K 35/407

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если возможно, используемые поисковые термины)  
EAPATIS, Embase, elibrary.ru, PubMed, Google, Яндекс**В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ**

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	MICHIО MITO et al. Morphology and function of isolated hepatocytes transplanted into rat spleen. TRANSPLANTATION, 1979, Vol. 28, No. 6, p. 499-505 разделы «Summary», «Results», «Isolation of hepatocytes»	1
Y	WO 2011140428 A1 (UNIVERSITY OF NORTH CAROLINA AT CHAPEL HILL И ДР.) 2011-11-10 параграфы [0005], [0006], [0093]	1
Y	EA 026585 B1 (ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ "КУРСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ" МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (RU)) 2017-04-28 пример № 1	1
Y	RU 2153344 C1 (ТИМЕРБУЛАТОВ ВИЛЬ МАМИЛОВИЧ) 2000-07-27 реферат	1
A	KZ 15656 A (ДОСКАЛИЕВ ЖАКСЫЛЫК АКМУРЗАЕВИЧ И ДР.) 2005-05-16 реферат	1

 последующие документы указаны в продолжении графы

\* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники

«D» - документ, приведенный в евразийской заявке

«E» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее

«O» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.

"P" - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения

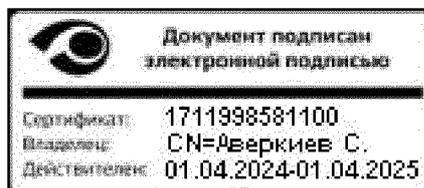
«X» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности

«Y» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории

«&amp;» - документ, являющийся патентом-аналогом

«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: 05 июня 2024 (05.06.2024)

Уполномоченное лицо:  
Начальник Управления экспертизы

С.Е. Аверкиев