

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **036374**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента  
**2020.10.30**

(21) Номер заявки  
**201700014**

(22) Дата подачи заявки  
**2016.11.17**

(51) Int. Cl. *A61K 35/12* (2015.01)  
*C12N 5/0775* (2010.01)  
*A61P 1/00* (2006.01)

---

(54) **СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ АНАЛЬНОЙ ИНКОНТИНЕНЦИИ**

---

(43) **2018.05.31**

(96) **2016/EA/0090 (BY) 2016.11.17**

(71)(72)(73) Заявитель, изобретатель и патентовладелец:

**ШАХРАЙ СЕРГЕЙ  
ВЛАДИМИРОВИЧ; ГАИН ЮРИЙ  
МИХАЙЛОВИЧ; КУЛИНИЧ  
СВЕТЛАНА СТЕПАНОВНА;  
ЗАФРАНСКАЯ МАРИНА  
МИХАЙЛОВНА; ГАИН МИХАИЛ  
ЮРЬЕВИЧ (BY)**

(56) PARK Eun Jung et al. Treatment of faecal incontinence using allogenic-adipose-derived mesenchym stem cells: a study protocol for a pilot randomised controlled trial. *BMJ Open*, 2016; 6:e01045

EP-A2-2009096  
RU-C1-2539188  
WO-A2-2007114740

---

(57) Изобретение относится к медицине, в частности к проктологии, клеточной трансплантологии, и может быть использовано при лечении анальной инконтиненции. Задачей заявляемого способа является обеспечение возможности восстановительного лечения анальной инконтиненции в амбулаторных условиях. Поставленную задачу решает способ лечения анальной инконтиненции, включающий инъекционное введение клеточного трансплантата в виде аутологичной культуры мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани путем монослойного культивирования, который вводят однократно интрасфинктерно на 3, 6, 9 и 12 ч по условному лимбу прямой кишки в объеме до 2 мл в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в виде суспензии в физиологическом растворе хлорида натрия и однократно ретроректально в объеме до 2 мл в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в виде суспензии в физиологическом растворе хлорида натрия, содержащем 10% аутологичной сыворотки.

---

**B1**

**036374**

**036374**

**B1**

Изобретение относится к медицине, в частности к проктологии, клеточной трансплантологии, и может быть использовано при лечении анальной инконтиненции.

Анальная инконтиненция является достаточно распространенным заболеванием у людей в различных возрастных группах. Нарушение удерживающей функции замыкательного аппарата прямой кишки и связанные с ней расстройства у детей и взрослого населения встречаются в 1-8% случаев, при этом с возрастом частота встречаемости инконтиненции значимо возрастает. Применяемые методы консервативного лечения анальной инконтиненции (лекарственные препараты-регуляторы стула, диеты, упражнения по укреплению мышц таза и ануса, биофидбек-терапия, психотерапевтическое воздействие и др.) малоэффективны и трудоемки. Хирургические методы коррекции изменений "тазового дна" и сфинктерного аппарата прямой кишки, формирование искусственного ануса и использование механических "запирательных" устройств эффективны не у всех пациентов, в ряде случаев эти вмешательства нефизиологичны, достаточно травматичны, могут вызывать ряд серьезных осложнений. Это обуславливает актуальность поиска новых методов лечения анальной инконтиненции с использованием клеточной терапии для восстановления структуры и функции сфинктерного и связочного аппарата прямой кишки.

Известен способ лечения энкопреза (анальная инконтиненция) [1], заключающийся в инъекции жировой ткани, взятой у самого пациента, в область его промежности для изменения анатомии замыкательного аппарата прямой кишки. При этом введение жировой ткани осуществляют на расстоянии 1,5-2 см от заднего прохода на 6 ч в ретроанальное пространство между стенкой прямой кишки и копчиком пациента, при этом количество вводимой жировой ткани выбирают из расчета 2,0-2,5 мл на кг веса больного, но не более 100 мл. Инъекцию жировой ткани осуществляют после кожного разреза длиной до 0,3 см на промежности пациента канюлей для липофилинга или проколом на промежности пациента иглой.

Недостатком способа является рассасывание введенного жира через несколько месяцев (а иногда и в более ранние сроки), что требует повторения процедуры.

Известен способ восстановления функции запирающего аппарата прямой кишки (лечения анальной инконтиненции) [2] путем введения биологического трансплантата в параанальную область. При этом в качестве трансплантата используют клеточную массу аутологичного костномозгового пунктата, которую неоднократно вводят в виде инъекций в мягкие ткани параанальной области вокруг прямой кишки. После каждого введения воздействуют на зоны введения двуполярным симметричным флюктуирующим током (причем один электрод располагают на поясничном отделе позвоночника, а второй - в области ануса, силу тока постепенно повышают до 5-10 мА до появления видимого сокращения мышц, курс состоит из 10 ежедневных процедур).

К недостаткам способа относятся 1) высокая инвазивность процедуры взятия костного мозга для получения трансплантата (клеточной массы) с необходимостью общей анестезии, повышающей риск развития осложнений после наркоза; 2) гетерогенность трансплантируемой клеточной массы костного мозга, содержащей помимо мультипотентных стволовых клеток, обладающих регенеративным потенциалом, большую примесь "балластных" клеток (в частности, эритроцитов, которые гемолизуются в месте инъекции и способствуют образованию соединительной, а не мышечной ткани); 3) необходимость неоднократного введения клеточной массы с перерывами в несколько дней и дополнительной активации регенеративного (дифференцировочного) потенциала стволовых клеток костного мозга путем электростимуляции анальной области курсом в 10 дней, что, в свою очередь, ухудшает качество жизни пациента и значимо увеличивает сроки лечения в стационаре.

Источника информации, близкого к заявляемому, не обнаружено.

Задачей заявляемого способа является обеспечение возможности восстановительного лечения анальной инконтиненции в амбулаторных условиях.

Поставленную задачу решает способ лечения анальной инконтиненции, включающий инъекционное введение клеточного трансплантата в виде аутологичной культуры мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани путем монослойного их культивирования, который вводят однократно интрасфинктерно на 3, 6, 9 и 12 ч по условному лимбу прямой кишки в объеме до 2 мл в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в виде суспензии в физиологическом растворе хлорида натрия и однократно ректально в объеме до 2 мл в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в виде суспензии в физиологическом растворе хлорида натрия, содержащем 10% аутологичной сыворотки.

Механизм действия клеточного трансплантата связан с мультипотентным потенциалом мезенхимальных стволовых клеток, способных дифференцироваться в гладкомышечные клетки и клетки поперечно-полосатой мышечной ткани, а также с выраженной секреторной активностью клеток, паракринно стимулирующих аутологичные клетки поврежденной ткани в месте инъекции. Аутологичная сыворотка, содержащая белковые факторы, факторы роста, поддерживает высокую пролиферативную активность трансплантируемых стволовых клеток и способна стимулировать процесс укрепления соединительнотканых структур связочного аппарата прямой кишки за счет активации фиброгенеза.

Аутологичную сыворотку пациента получают из венозной периферической крови в день забора жировой ткани (40 мл) и в день трансплантации (10 мл). Венозную кровь из локтевой вены переносят в стерильную пробирку и инкубируют в термостате 30 мин. После этого с помощью пастеровской пипетки

отслаивают сгусток от стенки пробирки и помещают его в камеру холодильника на 30 мин. Отстоявшуюся сыворотку крови отбирают в стерильную пробирку для дальнейшего использования при получении клеточного трансплантата или разведении клеточной суспензии.

Мезенхимальные стволовые клетки получают из подкожной клетчатки околопупочной области, забор материала (в объеме до 5 мл) осуществляется под местной анестезией. Извлеченную жировую ткань промывают в фосфатном буферном растворе и инкубируют с 0,075%-ным раствором коллагеназы I типа в течение 45 мин при 37°C. Полученную суспензию клеток дважды центрифугируют при 1500 об/мин в фосфатном буферном растворе, содержащем 5% фетальной бычьей сыворотки. Мононуклеарные клетки культивируют в среде DMEM, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, 50 ед./мл бензилпенициллина-натрия, 50 мкг/мл стрептомицина сульфата и 100 мкг/мл неомицина сульфата и 2 мМ глутамина в культуральных чашках диаметром 60 мм в концентрации  $1-5 \times 10^5$  клеток на  $\text{см}^2$ . Замену среды производят каждые четвертые сутки до формирования монослоя клеток на поверхности чашки (7-12 дней). Пересев на 1 пассаж осуществляют в ходе 5-10-минутной обработки монослоя 0,25%-ным раствором трипсина-ЭДТА. Клетки культивируют в среде DMEM, содержащей 10% аутологичной сыворотки, 50 ед./мл бензилпенициллина-натрия, 50 мкг/мл стрептомицина сульфата и 100 мкг/мл неомицина сульфата и 2 мМ глутамина до момента получения необходимой биомассы клеток. На этапе культивирования при замене среды отбирают клеточный супернатант для оценки стерильности культуры. Микробиологический контроль проводят путем посева по 1000 мкл культурального супернатанта от клеток в пробирку со средой Сабуро, тиогликолевой средой и питательным бульоном. Посевы на тиогликолевую среду и питательный бульон инкубируют при 30-35°C, а посевы на среду Сабуро - при температуре 20-25°C в течение 14 суток. При отсутствии роста микроорганизмов культура считается прошедшей контроль стерильности.

Подготовка клеточного трансплантата включает 1) взятие 10 мл венозной периферической крови у пациента в день трансплантации и выделение аутологичной сыворотки; 2) снятие мезенхимальных стволовых клеток 1 пассажа с поверхности культурального пластика 0,25%-ным раствором трипсина-ЭДТА; 3) однократное центрифугирование при 1500 об/мин в фосфатном буферном растворе, содержащем 5% фетальной бычьей сыворотки, и двукратная отмывка клеток в физиологическом растворе хлорида натрия при 1500 об/мин; 4) разделение клеток на 2 образца с разведением одного в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в физиологическом растворе общим объемом до 8 мл и другого - в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл объемом до 2 мл физиологического раствора, содержащего 10% аутологичной сыворотки; 5) отбор клеточной взвеси ( $5 \times 10^4$ ) из образцов для оценки жизнеспособности клеток с использованием 0,2%-го раствора красителя трипанового синего и подсчетом числа жизнеспособных (неокрашенных) клеток в камере Горяева.

Внутриклеточную инъекцию клеточного трансплантата осуществляют в амбулаторных условиях под местной анестезией 1%-ным раствором лидокаина, при этом клеточный трансплантат вводят однократно интрасфинктерно на 3, 6, 9 и 12 ч по условному лимбу прямой кишки в объеме до 2 мл в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в виде суспензии в физиологическом растворе и однократно ретроректально в объеме до 2 мл в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в виде суспензии в физиологическом растворе, содержащем 10% аутологичной сыворотки.

Пример.

Пациент Н., 1952 года рождения, госпитализирован в учреждение здравоохранения "11-я городская клиническая больница" г. Минска 19.10.2015 г. с диагнозом: хронический парапроктит (свищевая форма), трансфинктерный свищ прямой кишки (состояние после хирургического лечения с использованием лигатурного метода), анальная инконтиненция II степени. После подписания информированного согласия произведен забор подкожной клетчатки околопупочной области под местной анестезией в объеме 5 мл и 40 мл венозной периферической крови для получения клеточного трансплантата и аутологичной сыворотки пациента соответственно. Необходимая биомасса мезенхимальных стволовых клеток 1 пассажа получена на 13-е сутки культивирования. В ходе культивирования проведен микробиологический контроль и оценка стерильности культуры. Рост микроорганизмов во всех средах отсутствовал.

Предтрансплантационная подготовка клеточного трансплантата включала 1) взятие 10 мл венозной периферической крови у пациента в день трансплантации и выделение аутологичной сыворотки; 2) снятие мезенхимальных стволовых клеток 1 пассажа с поверхности культурального пластика 0,25%-ным раствором трипсина-ЭДТА; 3) однократное центрифугирование при 1500 об/мин в фосфатном буферном растворе, содержащем 5% фетальной бычьей, и двукратная отмывка клеток в физиологическом растворе при 1500 об/мин; 4) разделение клеток на 2 образца с разведением одного в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в физиологическом растворе общим объемом до 8 мл и другого - в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл объемом до 2 мл физиологического раствора, содержащего 10% аутологичной сыворотки; 5) оценку жизнеспособности клеток с использованием 0,2%-го раствора красителя трипанового синего и подсчет числа жизнеспособных (неокрашенных) клеток в камере Горяева. Жизнеспособность клеток обоих образцов составляла 95%.

С целью восстановления сократительной активности мышечной ткани сфинктерного аппарата, а

также структуры и функции связочного аппарата прямой кишки у пациента со смешанной формой анальной инконтиненции сложного генеза проведено инъекционное введение клеточного трансплантата в виде аутологичной культуры мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани путем монослойного культивирования, однократно интрасфинктерно на 3, 6, 9 и 12 ч по условному лимбу прямой кишки в объеме до 2 мл в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в виде суспензии в физиологическом растворе поваренной соли и однократно ретроректально в объеме до 2 мл в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в виде суспензии в физиологическом растворе хлорида натрия, содержащем 10% аутологичной сыворотки.

Определение нарушений континентного статуса в периоды до лечения и после него проводили при помощи четырех стандартизированных методик оценки в соответствии со шкалой "Revised Faecal Incontinence Scale" (RFIS) - анонимного опросника "Wexner Constipation Score" (возможная сумма баллов 0-20), предназначенного для выявления нарушений удержания твердых, жидких каловых масс и каломазания; опросника "Colorectal Anal Distress Scale" (CRADS), предназначенного для выявления нарушения удержания газов (сумма баллов от 0 до 7); визуальных аналоговых шкал (Visual Analogue Scales) оценки анальной инконтиненции "VASFI" ("Fecal Incontinence") и качества жизни "VASQL" ("Quality of Life") (суммы баллов от 1 до 10) - перед лечением, а также в срок 4 месяца после трансплантации.

Через 4 месяца после применения способа пациент отметил заметное улучшение удерживающей функции прямой кишки (в отношении жидких и плотных каловых масс, а также газов и каломазания) с хорошей социальной адаптацией в обществе. При этом по шкале Wexner constipation score удерживающая функция прямой кишки выросла с 2,75 до 4,0 баллов (на 31%), по шкале Colorectal Anal Distress Scale - с 2 до 5 баллов (на 60%), по шкале VASFI (Faecal incontinence) - с 8 до 10 баллов (на 20%), по шкале VASQL (Quality of Life) - с 8 до 9 баллов (на 11%).

Таким образом, заявляемый способ позволил достичь хорошего результата лечения с полной заменой стационарного лечения на амбулаторное, сократить общие сроки лечения смешанной формы анальной инконтиненции.

Источники информации:

1. Патент № 2539188, RU, МПК А61В 17/00, опубликован 20.01.2015.
2. Патент № 2405573, RU, МПК А61М 5/00, А61К 35/28, А61Р 1/00, А61N 1/18, опубликован 10.12.2010.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

Способ лечения анальной инконтиненции, включающий инъекционное введение клеточного трансплантата в виде аутологичной культуры мезенхимальных стволовых клеток, полученных из жировой ткани путем монослойного культивирования, который вводят однократно интрасфинктерно на 3, 6, 9 и 12 ч по условному лимбу прямой кишки в объеме до 2 мл в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в виде суспензии в физиологическом растворе хлорида натрия и однократно ретроректально в объеме до 2 мл в концентрации  $1 \times 10^6$  клеток/мл в виде суспензии в физиологическом растворе хлорида натрия, содержащем 10% аутологичной сыворотки.



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2

---