



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **106470**

(13) **U**

(51) МПК

**G09B 23/28** (2006.01)

**C12N 5/074** (2010.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

**(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ**

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2015 10826</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Дерябіна Олена Григорівна (UA),</b> <b>Мінін Юрій Вікторович (UA),</b> <b>Шувалова Надія Сергіївна (UA),</b> <b>Кордюм Віталій Арнольдович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>06.11.2015</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.04.2016</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.04.2016, Бюл.№ 8</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ДЕРЖАВНА УСТАНОВА "ІНСТИТУТ</b> <b>ГЕНЕТИЧНОЇ ТА РЕГЕНЕРАТИВНОЇ</b> <b>МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ</b> <b>МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ",</b> вул. Вишгородська, 67, м. Київ, 03150 (UA)

**(54) СПОСІБ МОДЕЛЮВАННЯ ПРОЦЕСІВ РЕГЕНЕРАЦІЇ СЛИЗОВОЇ ОБОЛОНКИ ВЕРХНІХ ДИХАЛЬНИХ ШЛЯХІВ**

**(57) Реферат:**

Спосіб моделювання процесів регенерації слизової оболонки верхніх дихальних шляхів, що включає введення в кровотік суспензії МСК пуповини з розчинником. Як розчинник МСК використовують фосфатний буферний розчин, а клітини у кількості 250000-300000, які ресуспендовані в 50 мкл цього розчинника, вводять в ретробульбарний венозний синус тварин.

**UA 106470 U**



Корисна модель належить до біотехнології та експериментальної медицини, зокрема, клітинної терапії, отоларингології і може бути використана в моделюванні процесів регенерації слизової оболонки при захворюваннях верхніх дихальних шляхів.

Значна кількість порушень, станів та хвороб людини не піддаються лікуванню із застосуванням існуючих засобів медикаментозної терапії або викликають тимчасовий ефект. Хронічні захворювання верхніх дихальних шляхів (ВДШ), що супроводжуються атрофічними змінами їх слизової оболонки, є одним з них. Дана патологія є розповсюдженою і потребує постійної уваги та запровадження відповідних профілактичних і лікувальних заходів. Однак, лікувальна тактика при таких станах та зумовлених ними клінічних проявах залишається виключно консервативною, симптоматично орієнтованою і потребує подальших науково-практичних удосконалень. Слід зауважити, що існуючий загальноприйнятий системний вплив на метаболізм слизової оболонки ВДШ за клінічними результатами є малоефективним та потребує подальших напрацювань.

Відомий спосіб лікування людей ембріональними клітинними суспензіями, що передбачає внутрішньовенне застосування комбінації щонайменше двох основних суспензій, одна з яких містить гемопоетичні клітини печінки (МІ), друга - гемопоетичні клітини селезінки (№2) або їх суміші і фармацевтично прийнятне рідке середовище та шість додаткових, а саме: №3 - суспензія стовбурових клітин гемопоеза печінки; №4 - суспензія стовбурових клітин гемопоеза селезінки; №5 - суспензія гепатоцитів; №6 - суспензія тимоцитів; №7 - суспензія епітеліоцитів первісного харчового каналу; №8 - суспензія нервових клітин мозку, які вибирають в залежності від характеру захворювання пацієнта. Так, при хворобі Крона товстої кишки (ураження слизової) пацієнтові внутрішньовенно вводять суспензію №1, яка містить гемопоетичні клітини печінки, 1,9 мл з кількістю клітин  $110 \times 10^6$ /мл і суспензію №7-1,0мл з кількістю клітин  $81 \times 10^6$ /мл. [Пат.№64826 С2 Україна, МПК А61К35/54; А61К35/407; А61К35/28; Опубл. 15.03.2004, бюл.№3].

Недоліком даного способу є використання клітин ембріону, тобто фетальних клітин людини. Дане джерело є неетичним, крім того, використання гемопоетичних клітин, навіть фетальних, без спеціальної перевірки може призвести до тяжких ускладнень.

Відомий і спосіб, описаний в патенті США [US2015196602 (A1)], в якому наведено лікування запальних хвороб кишечника за допомогою аутологічних (жирових) мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) людини. МСК отримують з жирової тканини пацієнта і ресуспендують в попередньо отриманій з його крові збагаченій ростовими факторами плазмі. Введення клітин проводять внутрішньовенно або за допомогою клізми.

Проте, в даному патенті описано фактично використання стромальної васкулярної фракції, а не МСК з жирової тканини, які не були попередньо очищені і охарактеризовані. Таким чином, в суміші клітин, які трансплантуються хворому, можуть бути не тільки МСК, а і клітини інших типів, що може негативно вплинути на стан хворого, особливо при внутрішньовенному введенні.

За прототип взятий спосіб лікування атрофічного риніту (атрофії слизової оболонки носа) у мишей, описаний у патенті України на корисну модель №100881. Експериментальним тваринам у хвостову вену вводять МСК в кількості 1млн., які ресуспендовані в 100 мкл фізіологічного розчину. Через два місяці після введення даного способу експериментальним тваринам, морфологічними дослідженнями доведено позитивний ефект лікування -спостерігалось відновлення структури слизової оболонки [Пат. № 100881 U Україна, МПК А61К35/28; А61К35/51; 12N5/074; С12N5/077; Опубл. 10.08.2015, бюл.№15].

Проте і даний спосіб має недоліки, а саме: використання фізіологічного розчину для розведення клітин, який не має достатньої буферної ємності для збереження потрібного рН для підтримання життєздатності клітин, що призводить до інактивації значної кількості МСК у випадку їх транспортування або зберігання протягом навіть нетривалого часу. Використання МСК в кількості 1млн. в 100мкл фізіологічного розчину є занадто великою дозою, враховуючи малий розмір і вагу експериментальних тварин (мишей), що може викликати ускладнення.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити спосіб моделювання процесів регенерації атрофії слизової оболонки верхніх дихальних шляхів, який дозволить шляхом зміни умов введення МСК підвищити ефективність регенерації атрофії слизової оболонки -пришвидшити регенеративну дію клітин, зменшити вірогідність появи ускладнень, зберегти життєздатність клітин.

Поставлена задача вирішується тим, що спосіб моделювання процесів регенерації слизової оболонки верхніх дихальних шляхів, що включає введення в кровотік суспензії МСК пуповини з розчинником. Як розчинник МСК використовують фосфатний буферний розчин, а клітини у кількості 250000-300000, які ресуспендовані в 50 мкл цього розчинника, вводять в ретробульбарний венозний синус тварин.

Дані удосконалення стали можливими завдяки проведеними авторами дослідженнями з визначення мінімальної кількості МСК пуповини, необхідної для досягнення позитивного терапевтичного ефекту. Доведено, що при зміні способу введення клітин з внутрішньовенного у хвостову вену на ретробульбарний венозний синус тварин, менша кількість МСК пуповини 5 250000-300000 клітин, виявилась достатньою для ефективного лікування даної патології. Замість фізіологічного розчину, який не має достатньої буферної ємності для підтримання потрібного рН, що забезпечує підтримання життєздатності клітин, використовують інший розчинник - ФБР, у якого відсутні перелічені недоліки. Введення МСК в ретробульбарний венозний синус забезпечує їх меншу втрату в процесі потрапляння в зону ураження та високу 10 життєздатність, сприяє більш швидкій регенеративній дії клітин завдяки високій їх концентрації на початковій стадії лікувального процесу. При цьому скорочується час відновлення ушкодженої слизової оболонки з 2 місяців до одного. Авторами пропонується застосування 50 мкл ФБР, що є достатнім для ресуспендування 250000-300000 МСК пуповини. Крім того, зменшення кількості клітин і об'єму, в якому проводять їх введення, зменшує вірогідність появи ускладнень, 15 викликаних самою процедурою.

Спосіб здійснюють наступним чином.

Безпородним білим мишам зі змодельованою атрофією слизової оболонки носу, як прикладу ураження слизових ВДШ, яка була підтверджена клінічними спостереженнями та морфологічними дослідженнями, вводять МСК, які отриманні культивуванням клітин МСК 20 пуповини згідно зі способом, описаним у патенті України на корисну модель №100881. Клітини характеризують за морфологією та експресією специфічних поверхневих маркерів. Перед введенням, МСК в кількості 250000-300000 ретельно ресуспендують в 50 мкл ФБР рН 7,2 та повільно вводять в ретробульбарний венозний синус тварин.

За клінічним станом експериментальних тварин спостерігають протягом місяця. Вже через 25 тиждень після введення МСК частина піддослідних тварин виглядали більш активними, рухливими, зі звичайним апетитом та адекватним носовим диханням. У третини мишей спостерігалася незначна кількість прозорого слизу біля присінку носа. У контрольних нелікованих тварин відмічались ознаки слабкості та утруднення носового дихання внаслідок накопичення густого гнійного слизу на рівні верхніх дихальних шляхів. Через місяць після 30 введення МСК пуповини людини середня вага експериментальних мишей складала  $(14,5 \pm 0,6)$  г, що наближалась до ваги здорових тварин відповідної вікової групи. Тварини зберігали звичайну активність, добре їли, їх дихальні шляхи були вільними. Слизова оболонка глотки мала рожевий колір та була вологою. Не ліковані миші виглядали більш млявими, малорухливими, погано харчувалися, їх середня вага складала  $(12,6 \pm 0,5)$  г. Біля присінку носа у всіх тварин 35 констатувалося накопичення густого слизу та кірок, що помітно заважали вільному диханню. Слизова оболонка ротоглотки була блідо-рожевою, погано зволоженою.

Проведені постмортальні морфологічні дослідження слизової оболонки носа через 1 місяць після введення МСК виявили збільшення товщини слизової оболонки за рахунок розширення 40 кровоносних судин власної пластинки слизової оболонки та наявності явищ клітинної проліферації як в епітеліальному, так і у сполучнотканинному шарі. Тобто, уже через місяць, мало місце активне відновлення структури слизової оболонки носа, при цьому особливу увагу привертало превалювання продуктивних процесів з розростанням судин у власній пластинці слизової оболонки та відновлення структури епітеліального покрову.

Таким чином, даний спосіб є доступним, дозволяє використовувати безпечно і етично 45 джерело стовбурових клітин людини, не потребує високовартісного обладнання, забезпечує прискорення і ефективність регенерації слизової оболонки ВДШ.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

50 Спосіб моделювання процесів регенерації слизової оболонки верхніх дихальних шляхів, що включає введення в кровотік суспензії МСК пуповини з розчинником, який **відрізняється** тим, що як розчинник МСК використовують фосфатний буферний розчин, а клітини у кількості 250000-300000, які ресуспендовані в 50 мкл цього розчинника, вводять в ретробульбарний венозний синус тварин.

---

Комп'ютерна верстка В. Мацело

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601