



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **106449** (13) **U**  
(51) МПК (2016.01)  
**A61F 9/00**  
**A61K 35/50** (2015.01)  
**A61P 27/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

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

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2015 10711</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Дьоміна Марія Юріївна (UA),</b> <b>Дьомін Юрій Альбертович (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>03.11.2015</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>25.04.2016</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ</b> <b>ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ,</b> вул. Корчагінців, 58, м. Харків, 61176 (UA)
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>25.04.2016, Бюл.№ 8</b>	

**(54) СПОСІБ КОРЕКЦІЇ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ДІАБЕТИЧНОЇ РЕТИНОПАТІЇ**

**(57) Реферат:**

Спосіб корекції експериментальної діабетичної ретинопатії, який здійснюють шляхом введення в організм клітин, який відрізняється тим, що інтравітреально вводять кріоконсервовані мезенхімальні стовбурові клітини плаценти (кМСКП) в концентрації  $0,1 \times 10^6$  та внутрішньовенно в концентрації  $1,1 \times 10^6$ .

UA 106449 U



Корисна модель належить до експериментальної медицини, офтальмології і може бути використана для розробки терапевтичного лікування діабетичної ретинопатії (ДР).

Діабетична ретинопатія (ДРП) - один з найпоширеніших проявів ЦД, розвивається практично у 90 % хворих. За останні роки відмічено зростання частоти ДРП, котра в теперішній час переросла в основну причину безповоротної сліпоти, особливо осіб працездатного віку, що складає суттєву медично-соціальну проблему в багатьох країнах світу, в тому числі в Україні.

Для консервативного лікування ДР використовують судинні препарати, ліки для покращення трофіки нервових тканин - ноотропи та вітаміни. Показано, що застосування фенофібрату або його похідних приводить до попередження та/або лікування діабетичної ретинопатії (Патент UA № 99093).

На сьогоднішній день не існує медикаментозних препаратів, ефективність яких у лікуванні діабетичної ретинопатії, повністю доведено, все ще триває активний пошук нових лікувальних засобів.

Відомий спосіб лікування діабетичної ретинопатії шляхом ретробульбарного введення культури острівкових клітин підшлункової залози новонароджених кроликів (Патент № 932157А).

Недоліком способу є те, що терапевтичний ефект пов'язаний, в основному, з інсулін-продукуючою функцією клітин, що трансплантуються, і передбачає корекцію місцевих метаболічних порушень тільки за рахунок нормоглікемії.

У зв'язку з цим поліпшення зорових функцій спостерігається тільки в період продукування інсуліну трансплантатом (до 0,5 року), а подальший терапевтичний ефект є недостатньо вираженим або відсутній. Окрім того, після введення трансплантату можливий розвиток реакції відторгнення клітин.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу корекції експериментальної діабетичної ретинопатії, в якому за рахунок зміни препарату, досягається зниження набряку і зменшення деструктивних та апоптичних проявів у сітківці.

Поставлена задача вирішується в способі корекції експериментальної діабетичної ретинопатії, який здійснюють шляхом введення в організм клітин, згідно з корисною моделлю, інтравітреально вводять кріоконсервовані мезенхімальні стовбурові клітини плаценти (кМСКП) в концентрації  $0,1 \times 10^6$  т а внутрішньовенно в концентрації  $1,1 \times 10^6$ .

Використання кріоконсервованих клітин і тканин ембріофетоплацентарного комплексу здійснюють для активації компенсаторних ресурсів пошкоджених тканин в організмі реципієнта, а також стимуляції механізмів регенерації, заміщення клітинних і тканинних структур при подальшому відновленні функції організму. Відбувається зниження набряку і зменшення деструктивних та апоптичних проявів у сітківці.

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) є мультипотентними самовідновлюваними клітинами, які виявляються практично у всіх постнатальних органах і тканинах і можуть диференціюватися в різні типи клітин, включаючи судинні ендотеліальні клітини, епітеліальні клітини, нейрони, гепатоцити і кардіоміоцити. Такі мультипотентні характеристики диференціації МСК в поєднанні зі здатністю регулювати імунну відповідь обґрунтовують перспективність їх застосування для лікування діабетичних судинних ускладнень.

Встановлено, що внутрішньовенне і інтравітреальне введення мезенхімальних стовбурових клітин плаценти діабетичним щурам гальмує розвиток інсулінорезистентності, що підтверджується зниженням базальної гіперглікемії щодо групи, що одержувала плацебо.

Суть корисної моделі пояснює кресленням, де на фіг. 1-3 зображені сітківки очей самців щурів груп Н+кМСКП, Д+кМСКП, Д+плацебо.

Спосіб, що заявляється був здійснений таким чином.

Дослідження проводили на моделі ЦД 2 типу на статевозрілих самцях лабораторних щурів лінії Вістар вихідною масою 130-160 г. Щурів утримували в стандартних умовах віварію при 12-годинному денному освітленні, температурі повітря 20-25 °С, вологості повітря - 50-55 %.

Інсулінорезистентність моделювали у щурів протягом десяти тижнів за допомогою висококалорійної (високожирової і високовуглеводної) дієти, яка складалася з 15 % жиру, 25 % сахарози, 1 % жовчних кислот та 59,0 % стандартного харчування, рекомендованого для даного виду тварин. Інтактні тварини протягом десяти тижнів отримували стандартну дієту віварію.

Через чотири тижні після початку експерименту щурам, які отримували висококалорійну дієту, внутрішньочеревно вводили цитратний розчин стрептозотоцину в дозі 25 мг/кг маси тіла один раз на тиждень протягом двох тижнів. Контрольні тварини за аналогічною схемою отримували внутрішньочеревно цитратний буфер.

Таким чином, дана модель дозволяє відтворити два ключових патогенетичних механізми, що спостерігаються у хворих на цукровий діабет 2 типу, а саме - порушення секреції та дії інсуліну.

Через сім днів після останньої ін'єкції стрептозотоцину всіх експериментальних тварин розподілили на групи: інтактний контроль (Н+кМСКП), щури з діабетом, що одержували кМСКП (Д+кМСКП) та щури з діабетом, що отримували плацебо (Д+плацебо). кМСКП вводили внутрішньовенно в концентрації  $1,1 \times 10^6$  і інтравітреально (для подальшого вивчення ретинопатії) у концентрації  $0,1 \times 10^6$  контрольних тварин та щурів з ЦД 2 типу, індукованих висококалорійною дієтою і стрептозотоцином.

Щури групи Д+плацебо отримували плацебо відповідного обсягу за аналогічною схемою.

Фоторегістрацію проводили цифровою камерою Sigeta Ucmos 3100. Морфометрію проводили за допомогою програми Tour Tek View 3.7.939.

Статистичну обробку отриманих даних виконували за допомогою програми SPSS 21 для Windows XP, використовуючи методи первинної описувальної статистики, t-критерій Стюдента. Перевірку на нормальність проводили за критерієм Колмогорова-Смирнова.

В експерименті на моделі стрептозотоцин індукованого цукрового діабету 2 типу вивчена морфологія сітківки після використання кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин плаценти. Доведена терапевтична ефективність препарату кріоконсервованих мезенхімальних стовбурових клітин плаценти, яка проявлялась зниженням набряку і зменшенням деструктивних і апоптичних проявів в сітківці.

Сітківка щурів в нормі представлена десятьма чітко вираженими шарами, які мають різну товщину в центральній і периферичній її ділянках. Слід зазначити нерівномірність товщини її зовнішнього ядерного шару у контрольних та у хворих на діабет щурів, що надає йому деяку хвилястість саме з зовнішнього боку, тобто зверненої до фоторецепторам. В шарі гангліозних нервових клітин звертає на себе увагу наявність клітин різного розміру, так і неоднакова щільність їх розташування в різних ділянках сітківки. Ці ознаки характерні для нормальної сітчастої оболонки щури повністю зберігаються і при ЦД 2 типу.

В контрольній групі щурів і групи Н+кМСКП сітківка очей не змінена, звичайної будови і товщини.

У гангліозному шарі містить гангліозні нервові клітини ядра з помірною кількістю гетерохроматину. Біполярні клітини і клітини Мюллера внутрішнього ядерного шару з ядрами помірної оптичної щільності (фіг. 1).

У групі Д+кМСКП в сітківках щурів спостерігається набряк внутрішнього сплетенієвидного шару (рис., про що може свідчити незначне збільшення його товщини (фіг. 2).

Однією з причин набряку сплетенієвидного шару може бути зменшення насиченості клітин сітківки киснем. Підтвердженням порушення постачання сітківки киснем є дані морфометрії, що показують значну меншу кількість капілярів заповнених еритроцитами в групі Д+кМСКП.

Незначне потовщення зовнішнього (зовнішнього) ядерного шару з сегментами фоторецепторів може бути пов'язане із проліферацією рецепторних клітин, можливо викликаной стовбуровими клітинами, введеними в порожнину ока.

Товщина сітківки в цій групі менше, ніж у групі Н+кМСКП. Однією з причин незначного зменшення товщини сітківки в групі Д+кМСКП можливо пов'язана з атрофією внутрішнього ядерного шару, що може бути викликаною недовідомою трофікою сітківки. Також, при стрептозотоциновому діабеті у гангліозних нервових клітинах, у клітинах внутрішнього (біполярні клітини і клітини Мюллера) і зовнішнього ядерного (палички і колбочки) шарів посилюється гетерохроматизація ядер, що свідчить про конденсації хроматину, що є передвісником і раннім проявом апоптозу.

Таким чином, у групі Д+кМСКП розвивається набряк внутрішнього сплетенієвидного шару, атрофія внутрішнього ядерного шару, що викликано стрептозотоцин-індукованим цукровим діабетом. При введенні кМСКП спостерігається потовщення зовнішнього ядерного шару з сегментами фоторецепторів можливо обумовлено стимулюючим проліферацію впливом стовбурових клітин.

Для уточнення впливу трансплантації клітин на відновлення пошкоджень сітківки, викликаних стрептозотоцин індукованим діабетом, необхідно провести додаткове гістологічне дослідження тварин, яким не проводилося лікування (Д+плацебо).

У групі Д+ плацебо гістологічна оцінка показує явища набряку у внутрішньому сплетенієвидному шарі, хоча його товщина менше ніж у перших двох групах (фіг. 3), а також збільшення товщини зовнішнього ядерного шару з сегментами фоторецепторів. При цьому товщина сітківки даного зразка значно менше. Також відзначена помірна гетерохромність ядер гангліозних нервових клітин, клітин внутрішнього (біполярні клітини і клітини Мюллера) і зовнішнього ядерного (паличок і колбочок) шарів. Крім того, дані морфометрії свідчать про меншу кількості капілярів, що містять еритроцити в порівнянні з групою Д+кМСКП.

Міжклітинний простір внутрішнього і зовнішнього ядерних шарів іноді трохи розширено, спостерігається плазморагія і геморагія в капілярах внутрішнього ядерного і внутрішнього сплетенієвидного шарів.

У групі щурів з цукровим діабетом спостерігається витончення сітківки.

5 Після лікування ЦД 2 типу за допомогою кМСКП спостерігається потовщення сітківки.

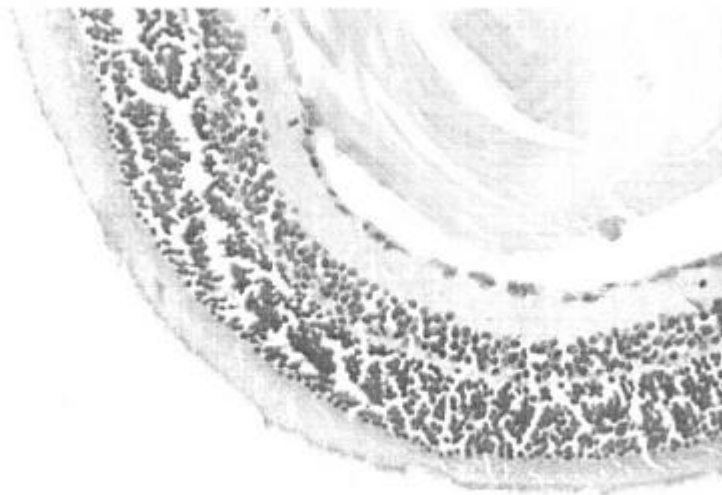
У групі щурів, які страждають на ЦД, спостерігається різке зниження кількості гангліозних клітин, а після інтравітриального введення кМСКП спостерігається збільшення кількості гангліозних клітин у порівнянні з групою щурів, хворих на ЦД, що свідчить про нейропротекторну дію на сітківку. Морфологічними ознаками ранньої нейродегенерації сітківки при ДР є: зниження  
10 кількості і апоптозування гангліозних клітин, витончення внутрішнього сітчастого шару, апоптоз нейронів внутрішнього ядерного шару, витончення сітківки в цілому, посилення гетерохроматизації ядер, конденсація хроматину.

Внутрішньовенне і інтравітреальне введення кМСКП дозволяє нормалізувати морфологічну структуру сітчастої оболонки щурів зі стрептозотоциновим ЦД 2 типу.

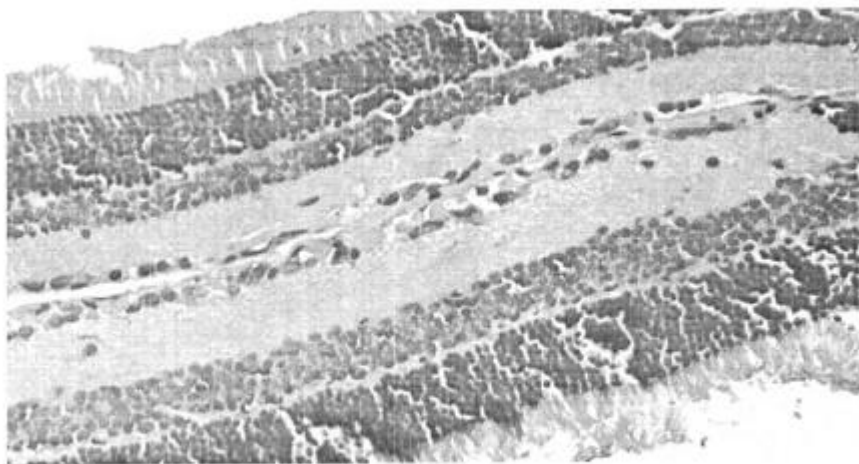
15 Таким чином, при вивченні морфологічної будови сітківки щурів після введення кМСКП відмічалось зменшення набряку, збільшення кількості гангліозних клітин, зменшення апоптотичної дії, що свідчить про терапевтичну ефективність цього препарату у лікуванні експериментальної діабетичної ретинопатії та відкриває нові перспективи у клінічному застосуванні кМСКП у хворих на ДР.

#### 20 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

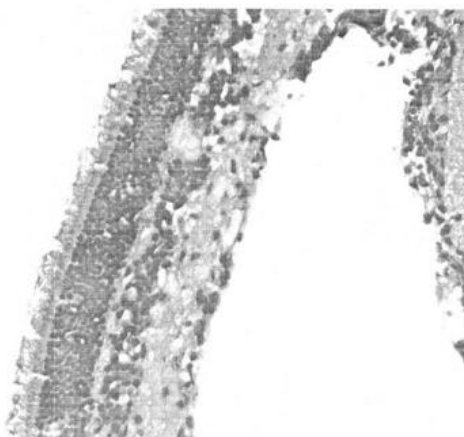
Спосіб корекції експериментальної діабетичної ретинопатії, який здійснюють шляхом введення в організм клітин, який **відрізняється** тим, що інтравітреально вводять кріоконсервовані  
25 мезенхімальні стовбурові клітини плаценти (кМСКП) в концентрації  $0,1 \times 10^6$  та внутрішньовенно в концентрації  $1,1 \times 10^6$ .



фіг. 1



фiг.2



фiг.3

---

Комп'ютерна верстка І. Скворцова

---

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