

Винахід належить до медицини, зокрема до неврології і може бути використаний для лікування хвороби Паркінсона.

Відомий спосіб лікування хвороби Паркінсона за допомогою дофамінвміщуючих препаратів, при якому індивідуальну ефективну дозу препарату добирають повільно протягом 1-1,5 міс., доводячи до оптимальної, яка забезпечує достатній ступінь покращення рухових функцій та прийнятну для хворого якість життя. Однак при безумовній ефективності цього способу, в нього є суттєві недоліки.

Ні один з препаратів, які застосовують зараз для лікування хвороби Паркінсона, не можуть стимулювати відновлення нейронів та припинити прогресування захворювання. Довгострокове застосування дофамінвміщуючих препаратів у більшості пацієнтів, в середньому через 5 років, приводить до розвитку побічних ефектів у вигляді моторних флюктуацій та/або лікарських дискінезій (Н.В. Федорова, И.П. Ким. Журнал неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2002; 2: 68-72).

Відомий також спосіб лікування нейродегенеративних захворювань з переважним ураженням екстрапірамідної системи, який полягає у тому, що внутрішньом'язово вводять кріоконсервований екстракт церебральної тканини плоду дозою 1,5 мл на ін'єкцію з інтервалом у 2-3 доби, 3-4 ін'єкції на курс (Пат. №51024А (UA) / Яворская В.А., Фломин Ю.В., Гребенюк А.В., Строна В.И., Прокопюк О.С).

Недоліком цього способу є можливість виникнення імунологічної несумісності й відсутність позитивного ефекту при важкому перебігу захворювання. Крім того, використання церебральної тканини плода викликає обґрунтовані протидії суспільства, що приводить до виникнення етичних проблем.

Найбільш близьким і обраним за прототип є спосіб лікування хвороби Паркінсона, який здійснюють шляхом паратоїчної пункційної трансплантації суспензії клітин ембріональної нервової тканини (Пат. №3454А (UA) / Черненко В.Г., Задорожний ВВ., 1997).

Спосіб здійснюють наступним чином. В положенні пацієнта лежачи на боці або в положенні сидячи з головою у стані максимального згибання уперед в зоні краніовертебрального переходу спеціальною голкою з мандреном виконують субокципітальну пункцію з проведенням кінця голки до великої цистерни мозку. Потім виконують трансплантацію ембріональних нервових тканин шляхом введення суспензії у велику цистерну мозку. Трансплантат розміщують паратоїчно - на хоріоїдальному сплетенні та епендими шлуночків мозку, субарахноїдально.

Недоліками цього методу є етичні проблеми, пов'язані з використанням ембріонів людини, а також проблема імунологічної несумісності, яка приводить до відторгнення організмом чужерідних речовин. Незважаючи на ретельний бактеріальний контроль біологічного матеріалу, зберігається можливість зараження інфекційними захворюваннями. Крім того, існують технічні складнощі виділення життєздатних ембріональних нервових клітин.

В основу винаходу поставлено задачу удосконалення способу лікування хвороби Паркінсона, в якому за рахунок зміни трансплантаційного матеріалу, досягається заміщення в організмі реципієнта загублених нервових клітин та відновлення нервової тканини у випадку її пошкодження, внаслідок чого підвищується ефективність лікування, вирішуються імунологічні та етичні проблеми.

Поставлена задача вирішується у способі лікування хвороби Паркінсона шляхом введення у велику цистерну мозку трансплантата нейрональних клітин, згідно з винаходом, проводять аутоотрансплантацію клітин строми кісткового мозку пацієнта, які індуковані в нейрональні клітини, трансплантат вводять в кількості від $0,75$ до $1,5 \times 10^6$ індукованих клітин строми кісткового мозку у 2-3 мл індукованого середовища.

Хвора людина є сама для себе донором стовбурових клітин, необхідних для клітинної терапії. Використання клітин строми кісткового мозку як джерела плюрипотентних стовбурових клітин дозволяє перетнути бар'єр імунологічної несумісності тканин і вирішити етичні проблеми, які пов'язані з застосуванням людських ембріонів.

Трансплантовані клітини мігрують у зону пошкодження, утворюють велику мережу контактів з нейронами мозку, виділяють нейромедіатори, синтезують нейро- та астроцитоспецифічні білки, трофічні фактори, що приводить до зменшення процесів апоптозу в мозку й покращення функціонального стану пацієнтів. В той же час, аутоотрансплантат не має токсичної дії, індуkcії пухлинного зросту, імунних реакцій.

За останні два роки в науковій літературі з'явилася ціла низка робіт, які виконані на щурах, в яких доведено успішне використання трансплантації клітин строми кісткового мозку (КСКМ) для лікування експериментальних пошкоджень головного та спинного мозку. Трансплантовані КСКМ щурів диференціюються у зоні пошкодження в нервові клітини та клітини глії, беруть участь у відновленні мієлінових оболонок аксонів, репарують пошкоджені ділянки, що приводить до відновлення втрачених рухових функцій (Chop et al., 2000; Machmood et al., 2001; Lu et al., 2001; Sasaki et al., 2001; Hofstetter et al., 2002). Спроможність отримання *in vitro* нервових клітин із КСКМ людини під впливом різних нейроіндукторів доведена у наступних роботах:

1. Jiang Y., Jahagirdar B.N., Reinhardt R.L., Schwartz R.E., Keene C.D., Ortiz-Gonzalez X.R., Reyes M., Lenvik T., Lund T., Blackstad M., Du J., Aldrich S., Lisberg A., Low W.C., Largaespada D.A., Verfaillie C.M. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. // *Nature*, 2002, V.418, P.41-49.

2. Deng W., Obrocka M., Fisher I., Prockop D.J. In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001. V.282. N.1. P. 148-152.

3. Woodbury D., Schwarz E.J., Prockop D.J., Black I.B. Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. // *Journal Neuroscience Research*. - 2000. - V.61, n.4. - P.364-370.

У вищезгаданих роботах показано також, що в нервових клітинах, які диференціюються з КСКМ людини, експресуються нейронспецифічні білки.

Дані про те, що КСКМ неіндуковані та індуковані за межами організму в нервові клітини можуть заміщувати в організмі реципієнта загублені нервові клітини і репарувати нервову тканину у випадку її пошкодження, представлені у серії робіт, які виконані на щурах з експериментальними травмами головного та спинного мозку:

1. Chop M Hofstetter C.P., Schwarz E.J., Hess D., Widenfalk J., Manira A.EL, Prokop D.J., Olson L. Marrow stromal cells form guiding strands in the injured spinal cord and promote recovery. // *PNAS*, 2002, V. 99, n 4, P.2199-2204.

2. Chopp M, Zhang XH, Li Y, Wang L, Chen J, Lu D, Lu M, Rosenblum M. Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. //Neuroreport., 2000 V.I 1, n 13, P. 3001-3005..

3. Machmood A., Lu D., Wang L.,Chop M. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells // Neurosurgery. - 2001 - n.49(5) - p. 1196-1203

4. Lu D., Wang L., Chen J., Machmood A., Chop M. Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury // Neurotrauma. - 2001 - V.18, n 8. - P.813-819.

5. Sasaki M., Honmou O., Akiyama Y., Uede T., Hashi K., Kocsis J.D. Transplantation of an acutely isolated bone marrow fraction repairs demyelinated adult rat spinal cord axons. //Glia, 2001, V.35, n. 1, P.26-34.

Спосіб, який заявляється, здійснюють наступним чином. Кістковий мозок виділяють з кістково-губчастої речовини (1 см³) підздошних кісток пацієнта, видавлюючи його у розчин Хенкса (Sigma) за допомогою стерильних щипців та пінцету. Речовину ресуспендують і двічі відмивають у розчині Хенкса центрифугуванням протягом 10 хв. при 16 с⁻¹.

Відмиті клітини ресуспендують у культуральному середовищі DMEM/F 12(1/1) (Sigma) з 10% фетальною сироваткою бика (Sigma) та розсіюють по 100млн. клітин на культуральну судину (80см², Nunc). Через 24 години культивування середовище з неприкріпленими до субстрату клітинами кісткового мозку видаляють, тричі промивають клітини розчином Хенкса, додають свіже середовище і продовжують культивувати прикріплені фібробластоподібні клітини ще два тижня для отримання первинної культури КСКМ. До прикріпленим до дна судину клітин додають свіже культуральне середовище й культивують клітини строми при 37°C та 5% CO₂. у повітрі. Через 5 дб міняють середовище і потім продовжують культивувати клітини ще 8-10 дб до утворення клітинного моношару, міняючи середовище кожні 3 доби.

Для індукції диференціровки КСКМ у клітини нервової тканини використовують як первинну культуру КСКМ, так і клітини другого й третього пасажів, які знімають з культуральної судини після короткочасної інкубації 0,25% розчином трипсину у 1mM ЕДТА (Sigma) і розсіюють у 4- та 24-лункові планшети (Nunc) в концентрації 3-5 тис. клітин/см².

Для диференціації КСКМ в нейробласти (попередники нервових клітин) використовують 10⁻⁶M ретиноєвої кислоти, відомого нейроіндуктора, який застосовується для нейродиференціації ембріональних та нервових стовбурових клітин людини. Морфологію клітин оцінюють у живій культурі.

Культури з нервовими клітинами, які диференціюються, промивають розчином Хенкса та фіксують у 4% розчині параформальдегіду протягом не менш 30 хвилин безпосередньо у культуральних судинах. Зафіксовані клітини тричі промивають розчином Хенкса і послідовно інкубують у 0,3% розчині перекису водня (30 хвилин) та 5% розчині БСА (1 година) на розчині Хенкса для того, щоб уникнути неспецифічного зв'язування антитіл.

Для однозначної ідентифікації нейробластів та нейронів, які диференціюються в індукційному середовищі, використовують антитіла до нейроноспецифічних білків: нестину, бета-тубуліну, нейрофіламента М.

Особливостями КСКМ є те, що вони є фібробластоподібними клітинами з крупним ядром, 1-2 ядерцями, мають низьку проліферативну активність, утворюють колонії на дні культуральної судини. На відміну від кровоутворюючих клітин, КСКМ мають виражену адгезію до пластику культуральних чашок.

Індуковані у нервові клітини КСКМ вводять через 1,5-2 години після додавання до них індукційного середовища у момент активного росту нейритів. Диференційовані нервові клітини вводити небажано, тому що вони досить швидко гинуть і не зможуть встановити необхідні контакти з власними нервовими клітинами пацієнта. Індуковані нервові клітини повинні бути певною мірою нестин-позитивними, мати веретеноподібну або зірчасту форму і нейрити, які швидко зростають, з конусами або колбами зросту у їх дистальній частині.

Використана нами методика розмноження КСКМ людини дозволяє отримати до 8 мл. стовбурових КСКМ від одного донора через 14 дб культивування поза межами організму. Клітини строми мають виразні адгезивні властивості, утворюють фібробластоподібні колонії на дні культуральної судини. Під дією ретиноєвої кислоти у середовищі DMEM/F12 (1/1) з 2% ФБС понад 30% цих клітин диференціюється у нейроноподібні клітини.

Введення здійснюють наступним чином. В положенні пацієнта лежачи на боці або сидячи з головою у стані максимального згибання уперед в зоні краніовертебрального переходу спеціальною голкою з мандреном виконують субокципітальну пункцію з проведенням кінця голки до великої цистерни мозку. Потім виконують аутоотрансплантацію шляхом введення у велику цистерну мозку клітин строми кісткового мозку пацієнта, які індуковані в нейрональні клітини.

Пацієнту вводять від 0,75 до 1,5x10⁶ індукованих клітин строми кісткового мозку об'ємом 2-3мл індукційного середовища (розчин Хенкса + 2% розчин сироватки пацієнта + 80мкг/мл Гентаміцину +10⁻⁶M ретиноєвої кислоти) - клітинний препарат. Життєздатність клітин повинна складати не менш 92%.

Клінічні приклади.

Приклад І. Хворий Д., 55 років, поступив із скаргами на тремтіння рук та ніг, слабкість у кінцівках, скутість рухів, зміну почерку, хиткість при ходінні, загальну слабкість, загальне уповільнення.

Вважає себе хворим з травня 2001 р., коли вперше з'явилися короткочасні вимушені рухи в лівій руці. Через 4 місяці приєдналося тремтіння в лівій нозі. В листопаді 2001 р. проведено МРТ головного мозку, виявлені ознаки гідроцефалії. В травні 2002 р. був встановлений діагноз хвороба Паркінсона. Рекомендовано приймати мідокалм, юмекс, однак ефект від прийому препаратів був незначним. Хворий був визнаний інвалідом III групи. В наступному стан погіршувався, зростало тремтіння у кінцівках, скутість рухів.

В неврологічному стані: гіпомімія, сальність шкіряних покривів лица, підвищення м'язового тону за пластичним типом, феномен "зубчастого колеса", дрібно-розмахливе тремтіння рук у спокої за типом "рахування монет", дрібно-розмахливе тремтіння ніг.

Діагноз: Хвороба Паркінсона, акінетико-ригідно-тремтяча форма. У зв'язку з відсутністю позитивної динаміки від медикаментозної терапії хворому запропонований метод аутоотрансплантації.

3.12.02 р. проведено взяття фрагменту губчастої речовини кісткового мозку підздошної кістки.

19.12.02 р. проведено операцію аутоотрансплантації клітин строми кісткового мозку пацієнта, які індуковані в нейрональні клітини, у велику потиличну цистерну. Хворому введено від 0,75 до 1,5x10⁶

індукованих клітин строми кісткового мозку об'ємом 2-3мл індукційного середовища (розчин Хенкса + 2% розчин сироватки пацієнта + 80мкг/мл Гентаміцину + 10^{-6} М ретиноєвої кислоти) - клітинний препарат.

В післяопераційному періоді через 3 доби хворий помітив зменшення тремтіння кінцівок. Через місяць після операції тремтіння регресувало, значно зменшилася скутість рухів. Динаміка балів по Уніфікованій шкалі для оцінки хвороби Паркінсона: до лікування - 41, після лікування - 12.

Приклад II. Хворий К., 65 років, поступив із скаргами на скутість рухів, утруднення виконання перших рухів, при письмі, зміну почерку, сонливість удень, напади, які виникали через 2-3 години після прийому накома, які починалися з неприємних відчуттів у епігастральній ділянці, почуття нестачі повітря, відчуття "коливання" ("трясе", "лихоманить"), слюзотечею, набряканням ніг, потім приєдналися нерухомість або вкрай утруднена рухомість ніг. Через 20-30 хвилин загальний стан поліпшується, однак зберігаються утруднені рухи у ногах, якщо хворий був на вулиці або на роботі, він приймав додаткову дозу накома (1/4 табл.). Вранці перед лікувальною фізкультурою приймав таблетку юмекса, потім таблетку вінпоцетину, перед сніданком 1/2 табл. накома, після сніданку при необхідності активної діяльності - 1/4 табл. накома. Безпосередньо після прийому накома періодично відмічалася відчуття "ломоти у ногах", порушувалося мовлення, воно ставало поривчастим, уповільненим.

Вважає себе хворим з 1996 року, коли з'явилися загальна слабкість, скутість рухів, тремтіння рук. Лікувався спочатку за місцем проживання (вітаміни, загальнозміцнююча терапія) без значного ефекту. Потім приймав циклодол по 1 табл. на добу. З 1997 року приймає наком (1 таблетка на добу у 2-3 прийоми). Стан прогредієнтно погіршувався. Неодноразово проходив курси лікування у стаціонарі, після яких на деякий час відмічав покращення стану. Злітку 2000 року стали непокоїти наведені вище напади, зростає скутість рухів. У зв'язку з прогредієнтним погіршенням стану, появою моторних та вегетативних флюктуацій на тлі прийому дофамінвміщуючих препаратів було прийняте рішення про проведення аутоотрасплантації клітин строми кісткового мозку пацієнта, які індуковані в нейрональні клітини.

23.11.02 р. проведено взяття фрагменту губчастої речовини кісткового мозку.

13.12.02г. проведено операцію аутоотрасплантації клітин строми кісткового мозку пацієнта, які індуковані в нейрональні клітини, у велику потиличну цистерну. Хворому введено від 0,75 до 1,5х⁶ індукованих клітин строми кісткового мозку об'ємом 2-3мл індукційного середовища (розчин Хенкса + 2% розчин сироватки пацієнта + 80мкг/мл Гентаміцину + 10^{-6} М ретиноєвої кислоти) - клітинний препарат.

Після операції відмічалася поява тривожності, особливо у нічні часи, котра протягом наступного тижня регресувала. Через 2 тижні хворий помітив зменшення виразності моторних та вегетативних флюктуацій на тлі терапії накомом.

Таким чином, запропонований спосіб лікування хвороби Паркінсона із застосуванням власного кісткового мозку хворої людини, який став джерелом стовбурових клітин, з яких за короткий період культивування поза межами організму отримали достатню кількість клітин для репарації тканини ушкоджених клітин головного мозку не має проблеми подолання імунологічної несумісності тканин і вирішує етичну проблему, пов'язану з застосуванням людських ембріонів.