



УКРАЇНА

(19) UA (11) 16852 (13) U
(51) МПК (2006)
A61K 35/48МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ

ОПИС

ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під
відповідальність
власника
патенту

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО АЛЕРГІЧНОГО ЕНЦЕФАЛОМІЄЛІТУ З ВИКОРИСТАННЯМ ФЕТАЛЬНИХ НЕЙРОКЛІТИН

1

2

(21) u200603685

(22) 04.04.2006

(24) 15.08.2006

(46) 15.08.2006, Бюл. № 8, 2006 р.

(72) Цимбалюк Віталій Іванович, Маркова Ольга Володимирівна, Пічкур Леонід Дмитрович, Васлович Вікторія Вікторівна, Касяненко Юрій Анатолійович

(73) НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ.О.О.БОГОМОЛЬЦЯ(57) Спосіб лікування експериментального алергічного енцефаломієліту з використанням фетальних нейроклітин, що включає ін'єкційне введення суспензії фетальних нейроклітин, який **відрізняється** тим, що як фетальні клітини застосовують алогенні фетальні нейроклітини другої половини вагітності, додатково здійснюють звільнення вказаної суспензії від мертвих клітин та їх уламків шляхом 20-хвилинної преінкубації при кімнатній температурі та вводять її субоципітально.

Корисна модель, що заявляється, стосується медицини, точніше неврології, і призначена для лікування модельного демієлінізуючого захворювання ЦНС у щурів шляхом використання ін'єкцій клітинних суспензій, що містять нейроклітини плоду.

Патогенетичні механізми демієлінізації при експериментальному алергічному енцефаломієліті (ЕАЕ) є подібними до тих, що спричиняють до розсіяного склерозу (РС) у людини. ЕАЕ - це модельне алергічне захворювання ЦНС, при якому патогенетичну роль відіграють антигенспецифічні Т-лімфоцити, які утворюються в імунній системі у відповідь на індукцію ЕАЕ і, проникаючи в ЦНС, продукують прозапальні цитокіни, ініціюють алергічне запалення та руйнують мієлін. Енцефалітогенними при ЕАЕ є різні білки ЦНС, в першу чергу, основний білок мієліну (ОБМ). Після імунізації тварин тканиною спинного мозку в імунній системі утворюються клони не тільки антигенспецифічних Т-лімфоцитів, але і В-лімфоцитів. Антигенспецифічні Т-лімфоцити руйнують тканину ЦНС, а антигенспецифічні В-лімфоцити продукують автоантитіла різних класів до ОБМ та до інших антигенів ЦНС, чим можуть сприяти посиленню алергічного запалення. Вважають, що патогенез ЕАЕ можна розглядати як гіперчутливість уповільненого типу до антигенів ЦНС. Операції субоципітальної трансплантації клітин фетального головного мозку сприяють покращенню рухливості тварин, посилюють процеси ремієлінізації аксонів периферич-

них нервів, прискорюють процеси нормалізації комплексоутворення у щурів, мають інші ознаки імунотропної дії.

У патогенезі ЕАЕ на різних етапах істотне значення має поєднання процесів запалення, демієлінізації та аксональної дегенерації. У якості енцефалітогенних субстанцій можуть виступати пептиди і глікопротеїни мієліну, білки теплового шоку, білок S100b і інші білки ЦНС.

Характерним для всіх стадій ЕАЕ є поєднання запального демієлінізуючого процесу з алергічними механізмами розвитку і нейродегенеративного процесу, причому механізми розвитку останнього на сьогодні точно не з'ясовані. Нейродегенеративні зміни можуть виявлятися не тільки безпосередньо у вогнищах (у демієлінізованих аксонах та мієлінутворюючих олігодендроцитах), але й у нервових волокнах з відносно збереженим мієліном, у нейронах і гліальних клітинах на відстані від вогнищ демієлінізації. При ЕАЕ ушкоджуються не тільки мієлін, мієлінутворючі олігодендроцити, нервові волокна, а й, можливо, нейрони з міжнейрональними контактами. Таким чином, патогенетичні зміни при ЕАЕ включають, з одного боку, наявність агресивного деструктивного автоімунітету, запальні процеси, а з другого боку - дегенеративні явища та утворення бляшок у вогнищах запалення у паренхимі ЦНС, неадекватних ступеню регенерації в умовах дефіциту трофічних факторів та мієлінутворюючих клітин.

У численних дослідженнях було показано, що

(19) UA (11) 16852 (13) U

в репаративний процес включається загальний попередник усіх клітин нервової тканини - невральні стовбурові клітини та попередники олігодендроцитів. Цей зумовило застосування клітин незрілого мозку в лікуванні ЕАЕ.

На сьогодні одним з основних підходів до лікування ЕАЕ є імуносупресивна терапія, яку в останній час доповнюють автотрансплантацією гемопоетичних стовбурових клітин, особливо при тяжких формах захворювання.

Цей підхід дозволяє перепрограмувати імунну систему хворих тварин та індукувати толерантність до аутоантигенів.

Цей підхід є ефективним з точки зору ліквідації запального процесу та затухання алергічних реакцій, проте він передбачає використання алогенних гемопоетичних стовбурових клітин кісткового мозку і недостатньо впливає на процеси відновлення вже зруйнованих мієлінових оболонок периферичних нервів.

Найближчим аналогом (прототипом) способу лікування ЕАЕ є спосіб, який передбачає введення суспензії живих фетальних клітин, що відповідають ураженим відділам головного і спинного мозку, у лімфатичний вузол. Дану маніпуляцію проводять 3-4 рази з інтервалом 5-7 днів між маніпуляціями [1]. На першому етапі лікування проводять заготівлю фетальних клітин другого триместра вагітності, потім - ін'єкційне введення фетальних клітин реципієнту у лімфатичний вузол, причому таких трансплантацій може бути 3-4 на курс лікування.

Описаний спосіб дозволяє досягти лікувального ефекту у частини пацієнтів, зменшити кількість загострень, збільшити термін ремісії, що було підтверджено даними неврологічного обстеження. Проте одним з факторів, які стримують використання цього способу і змушують більш прискіпливо розглядати результати такого лікування, є розвиток ускладнень після трансплантації фетальних нейроклітин. Так, в дослідженні Миронова Н.В. та інш. (1999) протягом періоду спостереження у 22% випадків після лікування мали місце ускладнення у вигляді алергічних реакцій. Одною з можливих причин розвитку ускладнень є присутність у суспензії, що вводиться, клітинних уламків, клітинних тіл з порушеною цілісністю клітинної оболонки, що завжди має місце при отриманні суспензій з ембріональних та фетальних тканин, їх кріоконсервуванні та культивуванні. Вказані компоненти суспензії, що трансплантується, можуть розглядатися як баласт, який негативно впливає на результати лікування.

Завдання, яке вирішує корисна модель, що заявляється, полягає в удосконаленні способу лікування ЕАЕ з використанням фетальних нейроклітин за рахунок оптимізації складу суспензії фетальних нейроклітин, що вводиться, внаслідок чого реципієнт отримує донорські алогенні клітини з більш високим відновлюючим потенціалом, які не провокують місцеве алергічне запалення, можуть продукувати трофічні фактори та самі інтегруватися в ЦНС реципієнта, здійснювати замісний ефект, поповнюючи кількісний склад попередників олігодендроцитів, забезпечуючи тим самим умови для

ремієлінізації аксонів і зменшення моторного дефіциту.

Технічний результат, що досягається корисною моделлю, буде полягати у зниженні частоти несприятливих побічних ефектів.

Поставлене завдання досягається тим, що у відомому способі лікування ЕАЕ з використанням фетальних нейроклітин, який включає ін'єкційне введення суспензії фетальних нейроклітин, згідно корисної моделі, в якості фетальних клітин застосовують алогенні фетальні нейроклітини другої половини вагітності, додатково здійснюють звільнення вказаної суспензії від мертвих клітин та їх уламків шляхом 20-хвилинної преінкубації при кімнатній температурі та вводять її субоципитально.

Відмінною особливістю способу, що заявляється, є те, що тварині з ЕАЕ субоципитально трансплантують клітинну суспензію, склад якої попередньо оптимізують шляхом звільнення від клітинних уламків та тіл мертвих клітин. Нейрохірургічний підхід - субоципитальне введення - забезпечує доставку необхідних клітинних субстанцій у місця руйнування мієліну, суттєво знижує небажані втрати лікувального ефекту, пов'язані з можливим швидким розпадом трофічних факторів та загибеллю стовбурових клітин. Звільнення суспензії від клітинних уламків, тіл мертвих клітин та живих клітин з вираженими адгезивними властивостями (інфільтруючі ЦНС макрофаги) дозволяє суттєво покращити результати лікування рухових порушень у щурів і знизити частоту розвитку ускладнень у вигляді тимчасового посилення алергічного запалення, прискорити поновлення руховості тварин. Покращення рухових функцій забезпечується поновленням мієлінізації аксонів.

За відомими літературними даними такий спосіб лікування ЕАЕ з використанням фетальних нейроклітин невідомий.

Запропонований спосіб лікування здійснюється наступним чином. Забір фетальних нейроклітин самки щура другої половини вагітності проводять шляхом видалення плодів з заплідненої матки. Після цього плід звільняють від навколоплідних оболонок, вилучають тканину головного мозку, звільняють від оболонок та отримують суспензію клітин за допомогою механічної дезагрегації. У тканині ЦНС у другій половині вагітності [2] присутні попередники олігодендроцитів, які можуть сприяти після трансплантації посиленню мієліноутворення, продукуючи відповідні трофічні фактори в органі-мішені (ЦНС). Крім того, вони самі можуть інтегруватися в ЦНС реципієнта, здійснювати замісний ефект, поповнюючи кількісний склад попередників олігодендроцитів, забезпечуючи тим самим умови для ремієлінізації аксонів і зменшення моторного дефіциту.

Перед використанням суспензії нейроклітин визначають їх фізико-хімічні властивості, життєздатність, морфологічні показники, функціональну повноцінність. Дно стерильної пластикової чашки Петрі малого діаметру (5см) зрошують стерильним фізіологічним розчином. Потім суспензію нейроклітин переносять у чашку Петрі, розподіляють рівномірно по дну чашки та залишають на 15-20 хвилин у горизонтальному положенні при кімнатній

температурі. Суспензію збирають шприцом в ампулу. Наркотизованим тваринам вистригають шерсть на шиї, змащують шкіру 3% спиртовим розчином йоду, проводять пункцію потиличної цистерни і вводять оптимізовану клітинну суспензію у об'ємі 0,05мл (2млн. клітин) інсуліновим шприцом. Введення меншої ніж 2×10^6 кількості фетальних клітин є малоефективним, оскільки розвивається ефект замалої сили, а застосування більшої кількості клітин може супроводжуватися негативними побічними явищами. Таку трансплантацію на курс лікування проводять одноразово.

Конкретний приклад втілення.

Білим безпородним щурам розводки віварію Інституту нейрохірургії АМН України у подушечки лап вводили енцефалітогенну емульсію [3]. Через 18 діб відбирали щурів з вираженими клінічними проявами захворювання (ступінь тяжкості ЕАЕ 2-3 бали). Потім з цих тварин формували 2 групи (основну і групу порівняння).

Щурам основної групи (група №1) субокципітально трансплантували оптимізовану суспензію фетальних нейроклітин, а щурам групи №2 ендолюмбально трансплантували суспензію фетальних клітин без етапу оптимізації складу. Протокол операції. Назва операції - субокципітальне введення суспензії аlogenних фетальних нейроклітин. Після наркотизації тваринам у велику потиличну цистерну введено по 0,05мл (2млн. клітин) оптимізованої (шляхом контакту з пластиковою поверхнею, [4]) суспензії клітин фетального аlogenного головного мозку. Через добу після операції неврологічна оці-

нка стану щурів - стан середньої тяжкості. Суттєве погіршення стану мало місце у 2 з 13 щурів. У післяопераційному періоді (14 діб після операції) методом електронної мікроскопії досліджено ступінь регенераторних змін у спинному мозку. Для цього проводили морфометрію та визначали співвідношення діаметру мієлінової оболонки до діаметру осьового циліндра [5]. У 80% випадків розрахований коефіцієнт дорівнював коефіцієнту, що був отриманий при дослідженні здорових тварин. Результати наведені у таблиці.

Щурам групи порівняння (група №2) субокципітально трансплантували суспензію фетальних нейроклітин без етапу оптимізації складу. Протокол операції. Назва операції - субокципітальне введення суспензії аlogenних фетальних нейроклітин. Після наркотизації у велику потиличну цистерну тваринам було введено у велику потиличну цистерну по 0,05мл (2млн. клітин) суспензії клітин фетального аlogenного головного мозку. Через добу після операції неврологічна оцінка стану щурів - стан середньої тяжкості та важкий. Суттєве погіршення стану мало місце у 6 з 16 щурів. У післяопераційному періоді (14 діб після операції) методом електронної мікроскопії досліджений ступінь регенераторних змін у спинному мозку як співвідношення діаметру мієлінової оболонки до діаметру осьового циліндра [5]. Тільки у 30% випадків розрахований коефіцієнт дорівнював коефіцієнту, що був отриманий при дослідженні здорових тварин. Результати наведені у таблиці.

Таблиця

Номер групи	Кількість тварин	Кількість випадків погіршення стану на 1-у добу після операції, %	Коефіцієнт товщини мієлінової оболонки через 2 тижня після операції	Кількість випадків нормалізації співвідношення діаметру мієлінової оболонки до діаметру осьового циліндра через 14 діб після операції, %
1	13	15,4	0,38 (0,33-0,47)	80,0
2	16	37,5	0,41 (0,34-0,53) $P_{1,2} < 0,05$	30,0

Дані таблиці засвідчують, що після субокципітального введення суспензії аlogenних фетальних нейроклітин щурам з ЕАЕ у першу добу погіршується неврологічний стан тварин, але у групі №1 цей феномен спостерігається у значно меншому відсотку випадків, ніж у групі №2 (15,4% проти 37,5% тварин, відповідно). Погіршення стану в цей період ми пов'язуємо з загостренням алергічного запалення в органі-мішені після введення фетальних нейроклітин, отриманих від самок другої половини вагітності. Відомо, що мієлінізація аксонів починається у другій половині вагітності, тому теоретично суспензії цього терміну можуть вмішувати незначну кількість енцефалітогенних білків, що провокують посилення алергічного запалення. Зменшення проявів алергічного запалення після оптимізації складу суспензії фетальних нейроклітин супроводжується стабілізацією неврологічного стану, а через 2 тижні після операції - покращенням морфологічного стану мієлінової оболонки (табл.). Нормалізацію співвідношення діаметру мієлінової оболонки до діаметру осьового цилін-

ра через 14 діб після операції ми спостерігали у 80% випадків при морфометричному аналізі аксонів спинного мозку щурів з групи №1 і тільки у 30% випадків щурів з групи №2.

Таким чином, оптимізація (шляхом контакту з пластиковою поверхнею [4]) суспензії клітин фетального аlogenного головного мозку супроводжується зменшенням проявів алергічного запалення у оперованих щурів та покращанням через 14 діб морфологічного стану мієлінової оболонки аксонів. В основу оптимізації суспензії покладені біологічні властивості суспензії, а саме адгезія до субстрату під час контакту з пластиковою поверхнею клітин з порушеною цілісністю мембрани, клітинних уламків та високоадгезивних макрофагів ЦНС [2, 4].

Література:

1. Миронов Н.В., Шмырев В.И., Бугаев В.С., Миронов И.Н., Сухих Г.Т. Способ лечения больных с демиелинизирующими заболеваниями. 20.10.99. Бюл. №29 RU 2139717 C1.
2. Sminia T., De Groot C.J.A., Dijkstra D., Koetsier J.C., Polmal C.H. Macrophages in the

central nervous system of the rat // Immunobiol - 1987. - 174. - P.43-50.

3. Нейрогенная дифференцировка стволовых клеток // Под ред. Ю.А. Зозули, Н.И. Лисяного. - Киев. - 2005. - 364с.

4. Позур В.К. Имуногенетика. Практикум. - Київ. - 2000. - 264с.

5. Цимбалюк В.І., Маркова О.В., Лісяний М.І.,

Пічкур Л.Д., Носов А.Т., Семенова В.М., Васлович В.В., Касяненко Ю.А., Вотякова І.А., Василовская С.В. Показники імунного статусу та ознаки ремієлінізації нервів у щурів з експериментальним алергічним енцефаломієлітом при трансплантації ембріональної нервової тканини // Трансплантологія - 2005. - том 8. - №1. - с.72-78.