



УКРАЇНА

(19) UA (11) 96710 (13) C2

(51) МПК

G01N 33/48 (2006.01)

A61K 35/28 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИОПИС
ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

(54) СПОСІБ ОЦІНКИ ЕФЕКТИВНОСТІ ТРАНСПЛАНТАЦІЇ АУТОЛОГІЧНИХ МЕЗЕНХІМАЛЬНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ПРИ ІШЕМІЇ НИЖНІХ КІНЦІВОК В ЕКСПЕРИМЕНТІ

1

(21) а201014326

(22) 30.11.2010

(24) 25.11.2011

(46) 25.11.2011, Бюл.№ 22, 2011 р.

(72) КОМАРЕВЦЕВ ВІТАЛІЙ МИКОЛАЙОВИЧ, ШИПІЛОВА ІННА ВОЛОДИМИРІВНА, КОМАРЕВЦЕВА ІРИНА ОЛЕКСАНДРІВНА, АНДРОСОВ ЄВГЕН ДМИТРОВИЧ, КОМАРЕВЦЕВА КАТЕРИНА ВІТАЛІЇВНА, АНДРОСОВА МАРИНА ЄВГЕНІЇВНА
(73) ДЕРЖАВНИЙ ЗАКЛАД "ЛУГАНСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ"

(56) І.В.Шипілова, Динамика содержания лактат-дегидрогеназы и креатинкиназы в сыворотке крови при ишемии нижней конечности на фоне применения аллогенных мезенхимальных стволовых клеток в эксперименте, Український журнал екстремальної медицини імені Г.О.Можаєва, Том 9, №3, 2008. С. 98-101.

Frank P. Barry, J. Mary Murphy, Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization, Osiris Therapeutics Inc., The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 36 (2004) 568-584.

І.В. Бабушкіна, Т.Е. Курильська і др., Характер впливання кліткової трансплантації на течение патологического процесса в условиях подавления белкового синтеза в организме, бюллетень ВСНЦ СО РАМН, 2010, № 6 (76), Часть 1, Экспериментальные исследования в биотехнологии и медицине, 06.2010. С. 156-159.

І.А.Комаревцева, І.В.Шипілова, Состояние уровня фрагментированной ДНК, свободного сфингозина и их связь с антиоксидантной системой при введении мезенхимальных стволовых клеток животным с ишемией нижней конечности, Українсь-

2

кий журнал екстремальної медицини імені Г.О.Можаєва, Том 9, №4, 2008. С. 86-90.

Комаревцева І.А., Шипілова І.В., Влияние мезенхимальных стволовых клеток на уровень адениловых нуклеотидов в мышечной ткани ишемизированной нижней конечности в эксперименте, Український медичний альманах. - 2007. - Т.10. - №4. - С. 77-81.

Біохімічні особливості ішемії нижньої кінцівки при введенні алогенних мезенхимальних стовбурових клітин в експерименті: автореф. дис. ... канд. мед. наук/ І.В. Шипілова; Луган. держ. мед. ун-т. - Луганськ, 2009. - 21 с.

UA U 13854 17.04.2006.

RU C2 2350275, 27.03.2009.

RU C2 2350277, 27.03.2009.

(57) Спосіб оцінки ефективності трансплантації аутологічних мезенхимальних стовбурових клітин кісткового мозку при ішемії нижніх кінцівок (ІНК), що включає проведення клінічного обстеження й інструментальних методів дослідження, який **відрізняється** тим, що додатково в сироватці крові щурів з ІНК визначають активність креатинкінази (КК) і лактатдегідрогенази (ЛДГ) і, якщо величини активності цих ферментів у процесі лікування досягають їх фізіологічних рівнів від 4016,15 до 4091,03 МО/л для КК і від 542,53 до 545,89 МО/л для ЛДГ, тобто збільшуються в разі їх зниження нижче нижньої межі фізіологічних коливань до терапії і зменшуються в разі підвищення за верхню межу фізіологічних коливань до лікування, трансплантацію оцінюють як ефективну, а за відсутності змін активності даних ферментів у процесі терапії або за наявності негативної динаміки, трансплантацію оцінюють як неефективну.

Винахід належить до галузі медицини, а саме до лабораторних методів дослідження і може бути використаний для оцінки ефективності лікування експериментальних тварин з ішемією нижніх кінцівок (ІНК), що дозволить визначати об'єм і трива-

лість терапевтичних заходів у кожної конкретної особи.

Актуальність предмету винаходу пов'язана не тільки з суттєвим підвищенням частоти розвитку оклюдуючих захворювань судин у людей, особли-

(19) UA (11) 96710 (13) C2

во нижніх кінцівок, але й відомими труднощами лікування ІНК, що призводить до зниження якості життя, необхідності у високій ампутації, значної загальної смертності. Одним із нових напрямів у лікування хворих на ІНК є трансплантація їм аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку (ТАМСККМ). Показані безпечність та ефективність клітинної терапії як у тварин, так і людини, однак явно недостатньо об'єктивних критеріїв доказу цієї ефективності. Для вибору оптимальної схеми лікування ІНК у кожному конкретному випадку важливо мати об'єктивні критерії ефективності протиішемічної терапії. Тому вельми важливими є спроби виявлення нових, патогенетично значущих тестів наявності ІНК та оцінки результатів проведеного лікування.

Існує спосіб оцінки ефективності ТАМСККМ при ІНК шляхом використання такого критерію, як біль у стані спокою [Tateishi-Yuyama E. et al. Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomized controlled trial // *Lancet*.-2002. - V. 360. - P. 427-435].

Однак згаданий критерій, по-перше, є досить суб'єктивним, а, по-друге, лише в 80 % пацієнтів з ІНК відмічається його зменшення після ТАМСККМ, у той час як у 8 % - навіть посилення.

Відомий також спосіб оцінки ефективності ТАМСККМ при ІНК хворих, який включає додаткове врахування загоєння виразок на їх ішемізованих кінцівках [Esato K. et al. Neovascularization induced by autologous bone-marrow cells implantation in peripheral arterial disease // *Cell Transplant*.-2002. - V. 11(8). -P. 747-752].

Але даний критерій, хоча й є більш об'єктивним, ніж попередній, має місце тільки в 44-67 % пацієнтів з ІНК після здійснення їм ТАМСККМ.

Тому був запропонований спосіб оцінки ефективності ТАМСККМ при ІНК хворих, що передбачає додаткове використання показника, отриманого за допомогою інструментального методу дослідження, а саме - кровотоку за Допплером [Teiji O. Treatment for limb ulcer with severe ischemia: therapeutic angiogenesis by autologous transplantation of bone-marrow // *Wound Repair Regen*.-2004.-V. 12(1).-A5].

Однак ангіографічно розвиток коллатерально-го кровообігу фіксується лише в 60-78 % випадків дослідження ішемізованих кінцівок після проведення пацієнтам ТАМСККМ.

У зв'язку з цим були запропоновані й інші інструментальні показники - перфузійний індекс і тиск кисню [Higashi Y. et al. Autologous bone-marrow mononuclear cell implantation improves endothelium-dependent vasodilation in patients with limb ischemia // *Circulation*.-2004. - V. 109. - P. 1215-1218].

Цей спосіб є найбільш ефективним з існуючих і тому вибраний як прототип.

До недоліків прототипу належить недостатня його інформативність, оскільки відомі показники свідчать тільки про посилення оксигенації тканин, а до того ж їх покращання виявляються не в усіх 100 % випадків дослідження. Все це, а також відносно висока вартість дослідження не дозволяють

використовувати зазначений спосіб для оцінки ефективності лікування хворих на ІНК у повсякденній практиці.

Задачею винаходу було підвищення відсотка виявлення, до того ж об'єктивних критеріїв оцінки ефективності ТАМСККМ при експериментальній ІНК з урахуванням їх патогенетичної значущості.

Указана задача досягається шляхом визначення в сироватці крові щурів з ІНК, яким вводяться аутологічні мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку (АМСККМ), активності креатинкінази (КК) і лактатдегідрогенази (ЛДГ), тобто ферментів, які є основними, що характеризують саме ішемічне пошкодження скелетної мускулатури. Запропонований спосіб надасть можливість своєчасно оцінювати ефективність використаної терапії залежно від інтенсивності показників ферментів і використовувати одержані дані для обґрунтованої розробки подальшої лікувальної тактики не тільки експериментальних тварин, а й хворих на ІНК. Одночасне визначення до й після лікування в сироватці крові активності двох ферментів, які відіграють ключову роль в енергетичному забезпеченні м'язової тканини, особливо в умовах недостатнього надходження кисню, і мають на цій підставі певні органоспецифічні властивості щодо цієї тканини, забезпечує під впливом лікування більш точну, більш надійну, більш об'єктивну, тобто більш діагностично інформативну оцінку змін функціонального стану ішемізованої нижньої кінцівки.

Діагностика ішемічних пошкоджень нижніх кінцівок звичайно проводиться на підставі клінічних ознак, які в цілому створюють уявлення про ступінь ішемії. Поряд з цим, зміни метаболічних параметрів, викликаних ішемією, повинні віддзеркалювати регіональні й загальні реакції організму у відповідь на порушення гемодинаміки місцевого характеру.

Порушення гемодинаміки в крупних магістральних судинах і в системі мікроциркуляції приводить до регіональної ішемії. Організм на розвиток ішемії крім підвищення згортання крові відповідає катаболічними зсувами й розвитком системної запальної реакції. Порушення цілісності плазматичної мембрани міоцитів приводить до виходу великих білкових молекул, якими є ферменти. Навіть незначне порушення цілісності плазматичної мембрани клітини приводить до зникнення градієнта концентрації одновалентних катіонів, яке є характерною ознакою живої клітини. Величина активності цитозольних ферментів служить маркером кількості ушкоджених міоцитів.

Відомо, що генерація аденозинтрифосфату (АТФ) із креатинфосфату й аденозиндифосфату в м'язовій тканині в умовах недостатнього кровопостачання може здійснюватися за рахунок креатинкіназної реакції. Вивчення динаміки активності КК має не тільки діагностичну цінність для оцінки тяжкості ураження, але й дає можливість судити про репаративні процеси в скелетній мускулатурі. Для більш повної оцінки порушення енергетичного гомеостазу й ступеня пошкодження м'язової тканини при модульованих умовах експерименту було проведено вивчення й динаміки активності ЛДГ. Більш

довгостроковим механізмом адаптації до зменшення кровопостачання скелетної мускулатури є анаеробний гліколіз, у регуляції протікання якого приймає участь ЛДГ - фермент, що завершує внутрішній окислювально-відновний цикл.

Наша пропозиція щодо використання вищевказаних біохімічних показників в якості критеріїв оцінки ефективності ТАМСКМ при ІНК базується на вперше встановленій авторами заявленого способу в експериментальних умовах закономірності, яка полягає в тому, що за змінами саме цих показників є можливість судити як про ступінь ішемічного пошкодження скелетної мускулатури, так і про ефективність лікування, що проводиться. Раніше запропоновані показники як критерії оцінки ефективності ТАМСКМ при ІНК не використовувалися.

Заявлений спосіб здійснюється таким чином. У сироватці практично здорових щурів, щурів з ІНК, але без проведення ТАМСКМ, а також з її здійсненням на тлі ІНК визначають активність КК і ЛДГ. На підставі отриманих даних оцінюють ефективність лікування ішемічного пошкодження скелетної мускулатури тварин.

Для підтвердження ефективності заявленого способу оцінки ефективності ТАМСКМ при ІНК було обстежено три групи білих безпородних статевозрілих щурів-самців масою 160-200 г: I - без ІНК (інтактна), II - з ІНК без введення АМСКМ

(контрольна) і III - з ІНК і введенням АМСКМ (дослідна). ІНК в двох останніх групах тварин вивчали на моделі редукованого кровообігу, яку формували шляхом лігування з подальшим перерізом стегнової артерії під тіопенталовим наркозом. Введення АМСКМ дослідній групі щурів проводили через тиждень після операції. Клітини вводили внутрішньом'язово по ходу судиннонервового пучка в кількості 5 млн. Дослідження проводились у динаміці: через 10, 12, 14, 21, 28 і 34 доби після лігування й перерізу стегнової артерії в контрольній групі й на 3, 5, 7, 14, 21 й 28 добу після введення АМСКМ у дослідній групі. Кожна група включала по 6 щурів.

У процесі дослідження було встановлено, що протягом перших двох тижнів спостереження значення активності КК у групі тварин з ІНК, яким не вводили АМСКМ, були вірогідно нижчими ($p < 0,05$), ніж в інтактній групі (табл. 1). Можливо це було пов'язано зі зривом адаптаційно-компенсаторних реакцій та з порушенням функціонування механізмів внутрішньоклітинної регуляції обміну речовин у клітинах, наслідком чого є пригнічення синтезу АТФ за допомогою легко мобілізованих фосфатних зв'язків креатинфосфату. Однак уже на 21 добу активність КК у групі щурів з ІНК була вірогідно вищою, ніж в інтактній групі тварин, і не відрізнялася від такої в останній на 28 добу.

Таблиця 1

Динаміка активності КК у сироватці крові щурів ($M \pm m$)

Строки Тварини	3 доба	5 доба	7 доба	14 доба	21 доба	28 доба
Здорові	4053,59 \pm 37,44					
Контрольні	2194,05 \pm 42,33*	2357,4 \pm 115,9*	2314,86 \pm 77,66*	2846,95 \pm 132,6*	5323,74 \pm 256,93*	4095,11 \pm 167,78
Дослідні	3120,75 \pm 151,03*#	3773,45 \pm 178,74#	4142,87 \pm 188,63#	5720,14 \pm 232,43 *#	5813,49 \pm 289,51*#	4345,81 \pm 75,89*

Примітка: у табл. 1 і 2 * - показники вірогідні відносно здорових щурів ($p < 0,05$);

- показники вірогідні відносно контрольних тварин ($p < 0,05$).

Зовсім інша динаміка активності КК у сироватці крові була в групі щурів з ІНК, яким вводили АМСКМ. Так, лише на 3 добу вона була вірогідно зниженою відносно інтактної групи, але вже на 5 добу практично не відрізнялася від такої в останній, зрівнювалась з даними в інтактній групі на 7 добу й вірогідно перевищувала їх в наступні строки дослідження. У той же час, спостерігалось вірогідне збільшення активності цього ферменту в порівнянні з групою щурів з ІНК без введення АМСКМ уже на 3 добу, яке ще більше зростало протягом наступних трьох тижнів (з максимумом на 21 добу). Це, можливо, було пов'язано з більш високим рівнем метаболізму в клітинах м'язової тканини тварин, яким вводили АМСКМ, з порушенням цілісності плазматичних мембран клітин м'язової тканини, у зв'язку з чим збільшується вихід цитоплазматичних ферментів у кров. На 28 добу дослідження активність КК залишалась більшою, ніж у контрольній групі, але невірогідно.

Отже, застосування АМСКМ сприяло підвищенню активності КК в м'язовій тканині при її ішемії.

Що стосується динаміки активності ЛДГ, то її значення максимально й вірогідно збільшувалось відносно інтактної групи вже на 3 добу в групі щурів з ІНК, яким не вводили АМСКМ (табл. 2). Зменшення відносно вихідного рівня цього ферменту на 5 й 7 добу (підвищення відносно інтактної групи вже невірогідне) може бути пов'язано з виснаженням запасів глікогену в м'язовій тканині й пригніченням реакцій анаеробного гліколізу. У всі наступні строки дослідження знов мало місце вірогідне підвищення активності ЛДГ у групі тварин з ІНК у порівнянні з інтактною групою (з максимумом на 21 добу), що може свідчити про збільшення функціонування реакцій анаеробного гліколізу, як слідство розвитку пізніх адаптаційних механізмів.

Таблиця 2

Динаміка активності ЛДГ у сироватці крові щурів (M±m)

Строки Тварини	3 доба	5 доба	7 доба	14 доба	21 доба	28 доба
Здорові	544,21±1,68					
Контрольні	714,27±6,98*	554,74±6,22	590,91±20,89	616,36±19,99*	706,09±11,06*	681,42±11,76*
Дослідні	342,13± 12,14*#	503,38± 13,14*	517,6± 9,39#	639,09± 13,45*	628,32 ± 38,99*#	594,96± 27,42#

У групі щурів з ІНК, яким вводили АМСККМ, протягом перших п'яти діб мало місце вірогідне зменшення активності цього ферменту в порівнянні з інтактною групою, після чого вона практично не відрізнялася від такої в останній на 7 добу й була вже вірогідно збільшеною протягом наступних двох тижнів, а також невірогідно - на 28 добу. У той же час рівень ЛДГ у порівнянні з таким у групі щурів з ІНК, яким не вводили АМСККМ, був вірогідно зменшеним на 3 добу, практично не відрізнявся від нього на 5 добу, знов був вірогідно меншим на 7 добу, вирівнювався на 14 добу й залишався вірогідно зниженим до кінця дослідження. Виходячи з останнього, можна припустити зменшення анаеробного гліколізу, що приводить до припинення гліколітичного синтезу АТФ і відновлення процесів окислювального фосфорилування.

Таким чином, застосування АМСККМ сприяло зниженню активності ЛДГ у м'язовій тканині при її ішемії.

Отже, аналізуючи динаміку змін активності КК і ЛДГ при введенні АМСККМ в умовах ІНК, можна зробити висновок, що АМСККМ сприяють запоби-

ганню мембранодеструкції й справляють позитивний ефект на внутрішньоклітинний метаболізм і, особливо, на нормальний перебіг енергетичних процесів, а також запобігають зниженню активності КК, яке у відомому сенсі, приводить до активації синтезу АТФ з використанням легкоомобілізованих фосфатних зв'язків креатинфосфату, що є вельми значущим у плані ефективності здійснюваної корекції патологічного процесу шляхом введення АМСККМ на тлі ІНК. У цілому ТАМСККМ сприяє меншим зсувам активності запропонованих ферментів, що не тільки вказує на нормалізуючу дію АМСККМ на метаболізм в ішемізованій м'язовій тканині, а й може бути застосовано як додаткові об'єктивні критерії оцінки ефективності трансплантації.

Таким чином, запропонований спосіб оцінки ефективності ТАМСККМ при ІНК є абсолютно безпечним, не складним у виконанні, добре відтворюваним і високоінформативним, а тому може бути рекомендований для поширеного використання в лабораторній практиці.