



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **79143** (13) **U**  
(51) МПК (2013.01)  
**G09B 23/28** (2006.01)  
**A61B 17/00**

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

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

<b>(21)</b> Номер заявки: <b>u 2012 12474</b>	<b>(72)</b> Винахідник(и): <b>Колесник Володимир Володимирович (UA),</b> <b>Забірник Арсеній Сергійович (UA),</b> <b>Цимбалюк Віталій Іванович (UA),</b> <b>Омельченко Олена Анатоліївна (UA),</b> <b>Панібратцева Світлана Георгіївна (UA),</b> <b>Торяник Інна Іванівна (UA)</b>
<b>(22)</b> Дата подання заявки: <b>01.11.2012</b>	
<b>(24)</b> Дата, з якої є чинними права на корисну модель: <b>10.04.2013</b>	
<b>(46)</b> Публікація відомостей про видачу патенту: <b>10.04.2013, Бюл.№ 7</b>	<b>(73)</b> Власник(и): <b>ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ,</b> вул. Корчагінців, 58, м. Харків, 61176 (UA), <b>ТОВАРИСТВО З ОБМЕЖЕНОЮ ВІДПОВІДАЛЬНІСТЮ ФІРМА "ВІРОЛА",</b> вул. Корчагінців, 58, м. Харків, 61176 (UA)

**(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ МОДЕЛЬОВАНОГО ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ ГОЛОВНОГО МОЗКУ У ЩУРІВ**

**(57) Реферат:**

Спосіб лікування модельованого ішемічного інсульту головного мозку у щурів здійснюють шляхом введення в організм клітин. Піддослідному проводять аутотрансплантацію клітин строми кісткового мозку, які індуковані в нейрональні клітини. Трансплантат вводять в кількості від  $0,4$  до  $1,5 \times 10^6$  клітин строми кісткового мозку у  $0,1$ - $0,4$  мл трансфузійного середовища. При цьому преддиференційовані клітини вводять субокципітально та інтракраніально; недиференційовані - в хвостову вену тварин.

U  
UA 79143



Корисна модель належить до медицини, зокрема до неврології, і може бути використана для лікування ішемічного інсульту.

Відомим є спосіб лікування спинального інсульту, який полягає у субарахноїдальній трансплантації фетальних нервових тканин людини шляхом люмбальної пункції (Брюховецкий А.С., Ушаков С.О. Клинико-патогенетическое обоснование применения фетальных тканей человека при заболеваниях центральной нервной системы // Трансплантация фетальных тканей человека. - Москва, 1996. - С. 53-56).

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

Відомим є спосіб лікування гострої фокальної ішемії щура, вибраний за прототип, при якому доставку в організм мезенхімальних стовбурових клітин у систему кровообігу тварини здійснюють через хвостову вену (Jieli Chen, Yi Li, Mark Katakowski, Xiaoguang Chen, Lei Wang, Dunyue Lu, Mei Lu, Subhash C. Gautam, Michael Chopp. Intravenous bone marrow stromal cell therapy reduces apoptosis and promotes endogenous cell proliferation after stroke in female rat. Journal of Neuroscience Research. - 2001. - Volume 73, Issue 6, Pages 778-786).

При цьому мезенхімальні стовбурові клітини розповсюджуються по всьому організму щура і органу-мішені досягає незначна їх кількість, також існує проблема міграції мезенхімальних стовбурових клітин і продуктів їх секреції через гематоенцефалічний бар'єр.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу лікування модельованого ішемічного інсульту головного мозку у щурів, в якому за рахунок зміни форми трансплантаційного матеріалу і способу його введення, досягається заміщення в організмі реципієнта загинувших нервових клітин та відновлення нервової тканини у випадку її пошкодження, внаслідок чого підвищується ефективність лікування, вирішуються імунологічні та етичні проблеми.

Поставлена задача вирішується в способі лікування модельованого ішемічного інсульту головного мозку у щурів шляхом введення в організм клітин, згідно з корисною моделлю, піддослідному проводять ауто трансплантацію клітин строми кісткового мозку, які індукують в нейрональні клітини, трансплантат вводять в кількості від 0,4 до  $1,5 \times 10^6$  клітин строми кісткового мозку у 0,1-0,4 мл трансфузійного середовища, при цьому предиференційовані клітини вводять субокципітально та інтракраніально; недиференційовані - в хвостову вену тварин.

Піддослідний є сам для себе донором стовбурових клітин, необхідних для клітинної терапії. Використання клітин строми кісткового мозку (КСКМ) як джерела мультипотентних стовбурових клітин дозволяє перетнути бар'єр імунологічної несумісності тканин і вирішити етичні проблеми, які пов'язані з застосуванням ембріональних стовбурових клітин.

Трансплантовані клітини мігрують у зону пошкодження, утворюють потужну мережу контактів з нейронами мозку, виділяють нейромедіатори, синтезують нейро- та астроцитоспецифічні білки, трофічні фактори, що приводить до зменшення процесів апоптозу в мозку і покращенню функціонального стану. В той же час ауто трансплантат не має токсичної дії, індукції пухлинного росту, імунних реакцій.

Експерименти проводили на самцях щурів лінії Вістар 5-місячного віку. КСКМ отримували зі стегнової кістки щурів відповідно за стандартним протоколом. Кістковий мозок виділяють з кістково-губчастої тканини ( $1 \text{ см}^3$ ) стегнової кістки піддослідної тварини, видавлюючи його у розчин Хенкса (Sigma) за допомогою стерильних щипців та пінцета. Тканину ресуспендують, і двічі відмивають у розчині Хенкса, центрифугуючи протягом 10 хвилин при 400 g. Відмиті клітини ресуспендують у культуральному середовищі DMEM/F12 (1:1) (Sigma) з 10 % фетальною бичачою сироваткою (ФБС) (Sigma) та розсіюють по 100 млн. клітин на культуральну посудину ( $80 \text{ см}^2$ , Nunc). Через 24 год. 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 тижні для отримання первинної культури КСКМ. До прикріплених до дна посудин клітин додають свіже культуральне середовище й культивують клітини строми при  $37^\circ \text{C}$  та 5 %  $\text{CO}_2$  у повітрі. Через 5 діб змінюють середовище і потім продовжують культивувати клітини ще 8-10 діб до утворення клітинного моношару, змінюючи середовище кожні 3 доби.

Для диференціації КСКМ у нейробласти (попередники нервових клітин) використовують  $10^{-6}$  М ретиноевої кислоти, відомого нейроіндуктора, який використовується для

нейродиференціювання ембріональних і нервових стовбурових клітин людини. Морфологію клітин оцінюють у живій культурі. Індуковані у нервові клітини КСКМ вводять через 1,5-2 години після додавання до них індукційного середовища у момент активного росту нейритів.

Використана нами методика розмноження КСКМ дозволяє отримати до 8 мл КСКМ від одного донора через 14 діб культивування поза межами організму. Клітини строми мають виразні адгезивні властивості, утворюють фібробластоподібні колонії на дні культуральної посудини. Під дією ретиноевої кислоти у середовищі ДМЕМ/Т12 (1/1) з 2 % ФБС понад 30 % цих клітин диференціюються у нейроноподібні клітини.

Для моделювання інсульту наркотизованих тварин оперують для отримання доступу до правої сонної артерії, виконують розріз шкіри по середній лінії від верхньої третини шиї до груднини. В артерію вводять 0,2 мл 25 % розчину сульфату барію, після чого на артерію накладають лігатури, а м'які тканини - ушивають. Успішність змодельованого інсульту оцінюють на 1-3 добу після операції за шкалою оцінки важкості неврологічної симптоматики при ішемії головного мозку у щурів.

Введення реципієнту КСКМ здійснюють через 3 години та на 1, 3, 7, 14 добу після операції. Преддиференційовані клітини вводять субокципітально та інтракраніально; недиференційовані - в хвостову вену тварин. Індуковані у нервові клітини КСКМ вводять через 2 години після додавання до них індукційного середовища у момент активного росту нейритів.

Для субокципітального методу введення клітин, культуру КСКМ ресуспендують в 100 мкл розчину Хенкса з додаванням щурячої сироватки в кількості  $4 \times 10^5$  клітин. Під каліпсоловим наркозом, при максимальному згинанні голови щура, проводять пункцію великої потиличної цистерни, а саме: місце перехрестя середньої (сагітальної) лінії та краю потиличної кістки щура на 1 мм нижче краю потиличної кістки по середній лінії, на глибину 1,5-2 мм.

Для інтракраніального введення  $4 \times 10^5$  клітин були адгезовані на желеподібному біодеградованому трансплантаційному субстраті об'ємом 50 мкл. Тварину под каліпсоловим наркозом фіксують на столику для препарування у положенні на животі. Розріз шкіри по середній лінії голови над мозковою частиною черепа. Розпатером оголюють кістку черепа від м'яких тканин справа. Сфероподібним бором проводять трепанацію черепа, щоб не поранити тверду мозкову оболонку, викроюють клапоть у скронево-тім'яній ділянці мозку  $2 \times 3$  мм. Клапоть видаляють та зберігають у стерильному розчині. Використовуючи налобний освітлювач зі збільшенням та хірургічний мікроінструментарій, обережно, не ранивши тканини мозку, розрізають оболонки мозку. Потім проводять трансплантацію КСКМ, котрі були адгезовані на желеподібному біодеградованому трансплантаційному субстраті об'ємом 50 мкл. Місце трансплантації вкривають раніше сформованим апоневротичним клаптем, потім рану пошарово ушивають. Спосіб є менш травматичним у технічному виконанні за рахунок відсутності травми мозкової речовини під час пункції шлуночка мозку.

Для субокципітального методу введення клітин, культуру КСКМ ресуспендували в 100 мкл розчину Хенкса з додаванням щурячої сироватки в кількості  $4 \times 10^5$  клітин. Далі під каліпсоловим наркозом, при максимальному згинанні голови щура, проводили пункцію великої потиличної цистерни, а саме: місце перехрестя середньої (сагітальної) лінії та краю потиличної кістки щура на 1 мм нижче краю потиличної кістки по середній лінії, на глибину 1,5-2 мм.

Стан тварин після операції та протягом експерименту в дослідній та контрольних групах оцінюють за допомогою батареї тестів. Тварин виводять із експерименту на 7, 14 та 28 добу після введення КСКМ і гістологічне дослідження уражених та інтактних ділянок мозку проводять на парафінових зрізах під світловим мікроскопом.

Суттєві результати по відновленню стану тварин після інсульту спостерігались на 4 добу після введення клітин в дослідних групах та на 12 добу в контрольній групі. Повне відновлення функцій спостерігалось в 22-30 % дослідної групи в залежності від післяопераційної складності інсульту. Результати клітинної терапії не прямо корелювали з проміжком часу між операцією та введенням КСКМ: при ранньому введенні КСКМ розвиток запалення та гостра загибель клітин у вогнищі інсульту перешкоджало виживанню та інтеграції КСКМ; а з певного часу (3-тя доба) чим більше був цей проміжок, тим гірше наслідки інсульту піддавались терапії. Гістологічне дослідження виявило, що КСКМ у більшості зосереджувались в уражених ділянках мозку навколо судин та у зоні ішемічної напівтіні (пенумбри), стимулюючи неоангіо- та нейрогенез. Здебільшого, КСКМ чинили паракринний вплив на структури мозку, що регенерували за рахунок неоангіогенезу та нейрогенезу. Найбільш ефективним виявилось застосування КСКМ на 3 добу після інсульту та комбінованому (субокципітальному та внутрішньовенному) введенні.

Таким чином, запропонований спосіб лікування ішемічних інсультів головного мозку на моделі щурів, сприяє значному клінічному покращенню і не має побічних ефектів. Отримані

модельні дані можна екстраполювати на поліпшення постінсультних станів у людини і використовувати для подальшої розробки клінічних методів лікування.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

5

Спосіб лікування модельованого ішемічного інсульту головного мозку у щурів шляхом введення в організм клітин, який **відрізняється** тим, що піддослідному проводять аутотрансплантацію клітин строми кісткового мозку, які індуковані в нейрональні клітини, трансплантат вводять в кількості від 0,4 до  $1,5 \times 10^6$  клітин строми кісткового мозку у 0,1-0,4 мл трансфузійного середовища, при цьому преддиференційовані клітини вводять субокципітально та інтракраніально; недиференційовані - в хвостову вену тварин.

10

---

Комп'ютерна верстка Л.Литвиненко

---

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

---

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