



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **91622** (13) **U**
(51) МПК
A61K 35/28 (2006.01)
A61P 19/04 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: u 2014 01498	(72) Винахідник(и): Волкова Наталія Олександрівна (UA), Юхта Марія Сергіївна (UA), Блонський Роман Іванович (UA), Коструб Олександр Олексійович (UA), Гольцев Анатолій Миколайович (UA)
(22) Дата подання заявки: 17.02.2014	
(24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 10.07.2014	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.07.2014, Бюл.№ 13	(73) Власник(и): ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ, вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015 (UA)

(54) СПОСІБ СТИМУЛЯЦІЇ РЕГЕНЕРАЦІЇ ДЕГЕНЕРАТИВНО-ДИСТРОФІЧНИХ ПОШКОДЖЕНЬ СУХОЖИЛЬ

(57) Реферат:

Спосіб стимуляції регенерації дегенеративно-дистрофічних пошкоджень сухожиль включає ін'єкційне введення аутологічних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку в товщу пошкодженого сухожилля. При цьому використовують кріоконсервовані клітини, суспензію яких перед введенням відігрівають з наступним видаленням кріопротектору.

UA 91622 U

Корисна модель належить до галузі медицини і може бути використана в ортопедії та травматології.

Існують способи стимуляції регенерації дегенеративно-дистрофічних пошкоджень сухожиль, які засновані на використанні біологічно активних препаратів - безклітинних (збагачена тромбоцитами аутологічна плазма крові) або клітинних (фібробласти шкіри, стовбурові клітини пуповинної крові, кісткового мозку та ін.) [1]. Проте застосування безклітинних форм є недостатньо ефективним для повноцінного відновлення, що, певно, пов'язано з малим вмістом в тканині сухожилля таких клітинних елементів як фібробласти та теноцити. Патогенетично обґрунтованим є застосування клітинних препаратів, проте їх отримання в достатній для стимуляції регенерації кількості потребує культивування клітин, яке займає досить тривалий проміжок часу, що негативно позначається на оперативності способу. А використання фетальних клітин ускладнює лікування і з етичної точки зору.

Найбільш близьким до заявленого за своєю суттю є спосіб стимуляції регенерації дегенеративно-дистрофічних пошкоджень сухожиль шляхом ін'єкційного введення в їх товщу суспензії нативних аутологічних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) кісткового мозку [2].

Проте цей спосіб не є оперативним, бо отримання необхідної для стимуляції регенерації кількості нативних ММСК займає доволі тривалий проміжок часу (2-3 тижні). Крім цього при терапії дегенеративних пошкоджень сухожиль часто виникає необхідність повторного введення клітин і, відповідно, повторного втручання в організм пацієнта, пов'язаного з забором кісткового мозку.

В основу корисної моделі поставлена задача удосконалити відомий спосіб стимуляції регенерації дегенеративно-дистрофічних пошкоджень сухожиль таким чином, щоб забезпечити оперативність способу та уникнути додаткового травмування пацієнта у разі необхідності повторного введення клітинного препарату.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі стимуляції регенерації дегенеративно-дистрофічних пошкоджень сухожиль, який передбачає ін'єкційне введення аутологічних ММСК в товщу пошкодженого сухожилля, згідно з корисною моделлю, використовують кріоконсервовані ММСК кісткового мозку, суспензію яких перед введенням відігрівають з наступним видаленням кріопротектору.

Використання кріоконсервованих клітин забезпечує оперативність способу, що дозволяє пришвидшити початок лікування, та виключає додаткове травмування пацієнта при необхідності повторного введення ММСК.

Ефективність заявленого способу досліджували на 53 щурах-самцях масою 250-300 г, яких утримували в умовах клініки для експериментальних тварин на стандартному харчовому раціоні з вільним доступом до їжі і води. При дослідженні керувалися "Європейською конвенцією щодо захисту хребетних тварин, які використовуються з експериментальними та іншими науковими цілями" (Страсбург, 1986 р.), а також "Загальними принципами експериментів на тваринах", схваленими II Національним конгресом по біоетиці (Київ, 2004 р.).

ММСК виділяли із резеційованих фрагментів клубових кісток щурів за методом адгезії стромальної фракції до культурального пластику з наступним видаленням фракції неадгезивних клітин. Щільність посіву на культуральні флакони складала 10^3 клітин/см². Культивування клітин проводили у стандартних умовах (37 °C, 5 % CO₂) до досягнення клітинами конфлюенту. Кріоконсервування проводили в середовищі культивування під захистом 10 % ДМСО з додавання 20 % ембріональної сироватки великої рогатої худоби. Заморожування здійснювали зі швидкістю 1 °C/хв. до -80 °C з наступним зануренням у рідкий азот. Зразки зберігали в умовах низькотемпературного банку не менше 3 міс. Відігрівали на водяній бані (37 °C) з наступним видаленням кріопротектору. Життєздатність клітин оцінювали по тесту на виключення суправітального барвника трипанового синього. Життєздатність кріоконсервованих ММСК після заморожування-відігріву складала 78,5±6,2 %, при цьому вони зберігали здатність до проліферації - утворення моношару на 14 добу.

Моделювання дегенеративно-дистрофічних пошкоджень Ахіллових сухожиль у щурів проводили шляхом ін'єкційного введення 0,03 мл розчину Дипроспану кожну 7 добу на протязі 4 тижнів [3]. На 28 добу в Ахіллові сухожилля дослідних тварин з тендопатією, відступивши на 0,25 см від п'яtkового горба, вводили: контрольна група (n=24) - фізіологічний розчин у кількості 0,025 мл; дослідна група (n=24) - локальне введення кріоконсервованих аутологічних ММСК в дозі $0,25 \cdot 10^6$ клітин; інтактна група (n=5) - тварини без жодних втручань. Після проведення терапії тварин виводили з експерименту на 7, 21 та 45 добу. Для гістологічного, біомеханічного та імуофлюоресцентного досліджень витинали Ахіллові сухожилля разом з місцем кріплення до бугра п'яtkової кістки. Оцінку вмісту колагену I типу проводили на кріостатних зрізах

Ахіллових сухожиль завтовшки 7мкм. Забарвлення на колаген І типу проводили з використанням моноклональних антитіл до колагену І типу (1:2000, COL-1, Sigma-Aldrich, США) та SKIM488A (Sigma-Aldrich, США) згідно з інструкцією фірми виробника. Люмінесцентну мікроскопію препаратів зразків Ахіллових сухожиль проводили за допомогою флуоресцентного мікроскопа (МИКМЕД-2, Росія). Руйнующе навантаження при натягу F (МПа), визначали за формулою: $F=N/S$, де N - прикладене навантаження до виникнення розриву сухожилля; S - площа поперечного перерізу сухожилля ($S=\pi \cdot a \cdot b$, де $\pi=3,14$; a - висота; b - ширина).

При статистичній обробці результатів використовували однофакторний дисперсійний аналіз і t - критерій Стюдента з використанням програми Excel.

Аналіз даних гістологічного дослідження сухожиль контрольної групи показав, що на 7 добу терапії спостерігалася дезорганізація, хвилястість та погіршення тинкторіальних якостей Ахіллових сухожиль з візуалізацією невеликих за розміром та щільністю ділянок колагену І типу. В дослідній групі із застосуванням кріоконсервованих аутологічних ММСК на 7 добу явища хвилястості і дезорганізації у ділянках дегенеративно-дистрофічного процесу зберігалися. У тварин з локальною терапією на фоні цих змін відмічали значне збільшення кількості клітинних елементів з посиленням базofilієм забарвленням. Сухожилльні волокна мали велику кількість ділянок з інтенсивним забарвленням до колагену І типу, які охоплювали більшу частину препарату. На 21 добу спостереження у тварин контрольної групи в сухожиллях відмічали наростання патологічних змін. Нерівномірна забарвленість сухожилльної тканини, хвилястість та явища дезорганізації сухожилльних волокон зберігалися. Ділянки світіння колагену були неінтенсивними та мали дезорганізоване розташування. У тварин з локальним введенням кріоконсервованих аутологічних ММСК на 21 добу спостереження було виявлено прогресуюче збільшення кількості та інтенсивності фарбування клітинних елементів в осередку патологічного процесу. В розташуванні сухожилльних волокон спостерігалася покращання чіткості контурів, зменшення їх хвилястості, рівномірне розташування ділянок колагену з інтенсивним світінням. За 45 діб в Ахіллових сухожиллях тварин контрольної групи спостерігали більш виражені порушення тинкторіальних якостей і дезорганізації сухожилльних волокон, безклітинні ділянки сухожилля набували більшої поширеності, кількість волокон з ділянками колагену І типу була зменшена у порівнянні з попередніми строками. В сухожиллях тварин за умов локального введення кріоконсервованих аутологічних ММСК, відбувалася нормалізація процесів проліферації та інтенсивності фарбування клітинних елементів і сухожилльних волокон, що свідчило про виражені процеси ремодулювання зони дегенеративно-дистрофічного процесу. Сухожилльні волокна в місці ураження мали впорядковане розташування з рівномірним, чітким світінням колагену І типу. Усі вищенаведені зміни за умов локального введення кріоконсервованих аутологічних ММСК свідчили про перебіг відновлювальних процесів у зоні дегенеративно-дистрофічного ураження сухожилля.

Для оцінки міцнісних характеристик сухожилля при тендопатії та за умов локального введення кріоконсервованих аутологічних ММСК проводили визначення руйнующого навантаження при натягу в динаміці. Отримані результати наведені на рисунку у вигляді діаграм. На діаграмі видно, що у тварин контрольної групи міцність сухожиль зменшувалася та була вірогідно нижчою, ніж у інтактних тварин у всі строки спостереження. У тварин з терапією кріоконсервованими аутологічними ММСК спостерігалися виражені зміни міцності сухожиль, а саме: зростання в 1,5 рази на 7-у добу, в 2,3 рази - на 21-у, в 2,7 рази - на 45-у порівняно з контролем.

Отже, проведені дослідження свідчать, що введення кріоконсервованих аутологічних ММСК впливає на інтенсивність диференціювання клітинних елементів в зоні дегенеративно-дистрофічного процесу, зростання їх проліферативної активності з наступною нормалізацією структурно-функціональної організації, вмістом колагену І типу та міцності сухожиль. Наведена різниця між контрольною та дослідною групами свідчить про ефективність застосування кріоконсервованих аутологічних ММСК, що виражається у відновленні гістологічної структури пошкодженої тканини і супроводжується тенденцією до нормалізації міцності. При цьому зміни, що відбуваються в тканині Ахіллових сухожиль за умов введення кріоконсервованих аутологічних ММСК, за гістологічними характеристиками, міцністю при натягу суттєво не різняться від показників тварин з терапією нативними ММСК [2, 4].

Таким чином, заявлений спосіб стимуляції регенерації дегенеративно-дистрофічних пошкоджень сухожиль за ефективністю не поступається найближчому аналогу і при цьому забезпечує оперативність лікування та дозволяє уникнути додаткового травмування пацієнта у разі необхідності повторного введення препарату.

Джерела інформації:

1. Schmitt A., van Griensven M., Imhoff A.B. et al. Application of stem cells in orthopedics // Stem Cells Int. - 2012. - Vol. 2012. - P. 1-11.

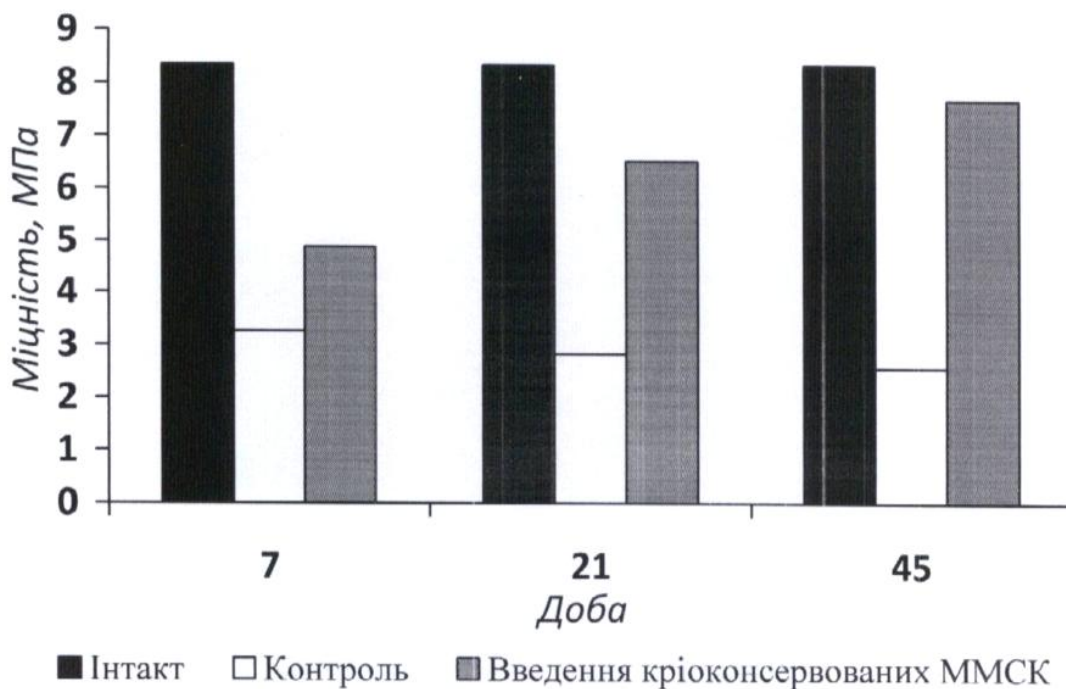
2. Волкова Н.О., Коструб О.О., Блонський Р.І. та ін. Клітинні культури стромального походження в терапії експериментальної тендопатії // Ортопедія, травматологія та протезування. - 2012. - № 4. - С. 40-44.

3. Коструб О.О., Бруско А.Т., Блонський Р.І. та ін. Модель дегенеративно-дистрофічного ураження сухожилля (експериментальне дослідження) // Вісн. ортопед. травматол. та протезув. - 2009. - № 3. - С. 26-28.

4. Коструб О.О., Блонський Р.Т., Лазарев І.А. та ін. Міцність сухожилля на розтягування після клітинної терапії його дегенеративного пошкодження в експерименті // Вісн. ортопедії, травматології та протезування. - 2011. - № 3. - С. 23-26.

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

15 Спосіб стимуляції регенерації дегенеративно-дистрофічних пошкоджень сухожилля, що включає ін'єкційне введення аутологічних мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин кісткового мозку в товщу пошкодженого сухожилля, який **відрізняється** тим, що використовують кріоконсервовані клітини, суспензію яких перед введенням відігрівають з наступним видаленням кріопротектору.



Комп'ютерна верстка А. Крулевський

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