



УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **100047**

(13) **U**

(51) МПК

A61K 35/14 (2015.01)

A61P 25/28 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2014 13241**

(22) Дата подання заявки: **10.12.2014**

(24) Дата, з якої є чинними
права на корисну
модель: **10.07.2015**

(46) Публікація відомостей
про видачу патенту: **10.07.2015, Бюл.№ 13**

(72) Винахідник(и):

**Гольцев Анатолій Миколайович (UA),
Лебединець Владимир Васильович (UA),
Останков Максим Вадимович (UA),
Бондарович Микола Олександрович
(UA),
Останкова Людмила Василівна (UA)**

(73) Власник(и):

**ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І
КРІОМЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ
АКАДЕМІЇ НАУК УКРАЇНИ,
вул. Переяславська, 23, м. Харків, 61015
(UA)**

(54) СПОСІБ ЛІКУВАННЯ ІШЕМІЧНОГО ІНСУЛЬТУ

(57) Реферат:

Спосіб лікування ішемічного інсульту передбачає використання біологічно активного препарату - кріоконсервованої кордової крові людини.

UA 100047 U

Корисна модель належить до галузі експериментальної медицини, а саме до неврології, і може бути використана при порушеннях мозкового кровообігу.

Відомий спосіб лікування ішемічного інсульту (ІІ), який включає поєднане використання аспірину і тренталу (пентоксифілін). Суть способу полягає в застосуванні у пацієнтів з ІІ протягом 2 місяців 320 мг аспірину (один раз на день) з 400 мг тренталу (три рази в день) [1].

Недоліком даного способу є низька його ефективність, а також високий ризик розвитку ускладнень (ураження наднирників з розвитком гострої надниркової недостатності і судинного колапсу, подразнення слизової шлунка і утворення виразок) [2].

Найбільш близьким аналогом до способу, що заявляється, є спосіб лікування ІІ за допомогою церебраліну, який вводять 1 раз на день внутрішньовенно в дозі 30 мл, протягом 10 днів [3]. Прийом препарату ініціюють протягом 12 годин після розвитку інсульту.

Однак, цей спосіб є недостатньо ефективним щодо відновлення неврологічного статусу та не забезпечує впливу на імунну систему, дисбаланс в якій є невід'ємною ланкою патогенезу інсульту [4].

В основу корисної моделі поставлено задачу створити такий спосіб лікування ІІ, у якому б, за рахунок використання клітинного препарату, забезпечувалася можливість покращити неврологічний та імунний статус хворих тварин.

Поставлена задача вирішується тим, що в способі лікування ІІ, який передбачає використання біологічно активного препарату, згідно з корисною моделлю, як такий препарат використовують кріоконсервовану кордову кров людини (кККЛ).

Кордова кров людини є альтернативним джерелом стовбурових клітин, які сприяють відновленню центральної нервової системи та імунного статусу. Використання кріоконсервованої кордової крові забезпечує можливість її сертифікації, яка є обов'язковою в клінічній практиці. Застосування кККЛ дозволяє досягти показників неврологічного і імунного статусу більш наближених до норми у порівнянні з прототипом, при цьому кККЛ не чинить токсичної дії на системи організму і тому не призводить до розвитку ускладнень.

Дослідження впливу кККЛ на показники неврологічного статусу та імунної системи при ІІ проведено на 70 щурах лінії Вістар 6 місячного віку масою 160-180 гр. Ішемію мозку викликали шляхом оклюзії середньої мозкової артерії (СМАО) кліпсуванням впродовж 2-3 мм протягом 40 хв. Щурам вводили кетамін (125 мг/кг) внутрішньочеревно. Під час операції і до виходу з наркозу температуру тіла тварин підтримували на рівні 37 °С. Операційну рану пошарово ушивали.

Із цільної кордової крові людини шляхом пасивної седиментації еритроцитів у градієнті щільності поліглюкіна одержували лейкоконцентрат, який відбирали в стерильні флакони і додавали цитратно-фосфатно-декстрозний розчин (антикоагулянт CPD). Потім лейкоконцентрат кордової крові піддавали кріоконсервуванню.

Щури були розділені на групи: 1 - інтактні щури (контроль, n=7); 2 - з індуцією ІІ (n=21); 3 - з ІІ і внутрішньочеревною ін'єкцією церебраліну (5 мл/кг маси тіла, n=21); 4 - з ІІ, внутрішньовенним введенням кККЛ (в обсязі 0,3 мл - $5 \cdot 10^6$ клітин, n=21).

Оцінку показників проводили після виведення з експериментів 7 щурів з контрольної групи і по 7 щурів з кожної дослідної групи (групи 2-4) на 1, 3 і 7 добу після ініціації ІІ.

Субпопуляційний склад клітин селезінки визначали методом прямої мембранної імунофлуоресценції на проточному цитофлуориметрі (FACS Calibur (BD, США)) з використанням антищурячих ФІТЦ - мічених моноклональних антитіл (МАТ) (BD, США) до CD3, CD4, CD8, CD16, CD25, ІФН- γ , ІЛ-10. Статистичне обрахування даних, отриманих цитофлуориметричним аналізом, здійснювали за допомогою програми WinMDi 2.8.

Циркуючі імунні комплекси в сироватці крові визначали спектрометричним методом, який базується на різній розчинності мономерів імуноглобулінів у складі імунних комплексів при наявності поліетилєнгліколю 6000.

Неврологічний статус у щурів з розвитком ІІ і після лікування оцінювали на 7 добу за 6 тестами: 1- спонтанна активність; 2 - симетричність використання кінцівок при русі; 3 - симетричність використання передніх кінцівок, коли тварина мала опору тільки на них; 4 - симетричність використання кінцівок для схоплювання сітчастої поверхні; 5 - реакція на подразнення пропріорецепторів тулуба; 6 - реакція на дотик до вібрисів. Оцінювали неврологічний статус за 18-бальною шкалою. Підсумкову оцінку формували як суму балів (від 0 до 3) для кожного з 6 тестів.

Дослідження інтегративної діяльності мозку тварин оцінювали з їхньої поведінки в тестах "Відкрите поле", де фіксували горизонтальну і вертикальну активність тварини, а також в тесті "Хрестоподібний лабіринт", де протягом 3 хв реєстрували загальний час знаходження тварини на світлі, а також кількість разів, коли тварина виглянула із закритих кінців лабіринту.

Статистичну обробку експериментальних даних проводили за методом Стюдента-Фішера за допомогою програми Statistica 7.0, (Stat Soft Inc), адаптованої до поставлених завдань.

Діагностика імунних розладів має велике значення при лікуванні II, оскільки відображає ступінь імунodefіциту на початку захворювання, а також динаміку, яка спостерігається під час лікування. В таблиці 1 показано, що після індукції патології спостерігаються явно виражені порушення стану загальних Т- лімфоцитів ($CD3^+$), концентрація яких на 7 добу після індукції II була в 5 разів нижче контролю. Концентрація $CD4^+$ - клітин у цей період знизилася приблизно в 6 разів, а $CD8^+$ клітин - в 2 рази. Це знайшло своє відображення в збільшенні імунорегуляторного індексу ($IPI - CD4^+/CD8^+$), який в 2 рази перевищував контроль. Вміст Т-рег ($CD4^+CD25^+$)- клітин, відповідальних за пригнічення імунзапальних реакцій, був в 5 разів нижче контрольних значень ($p < 0,05$). При розвитку II, на тлі істотної інтоксикації, вміст популяції клітин природних кілерів (ПК, $CB16^+$ -клітини) був в 2,6 разу менший, ніж у контролі ($p < 0,05$). Виявлені зміни вказують на стан імунodefіциту, викликаний розвитком патології. Знижений вміст Т-рег клітин указує на нездатність організму протистояти імунзапальним реакціям.

Застосування церебролізіну у групі 3 трохи поліпшувало показник загальних Т-лімфоцитів ($CD3$) у щурів з II, хоча цей показник залишався на стабільно більш низькому рівні в порівнянні з контролем. Вміст Т-хелперів також був вище, ніж у нелікованих тварин, про що свідчить наближення цього показника до значень контролю ($p < 0,5$). Такими ж змінами характеризувалися показники вмісту ПК і Т-рег. На 7 добу кількість Т-супресорних/цитотоксичних клітин підвищувалася, що обумовлювало зниження IPI.

Застосування кККЛ під час індукції II у тварин групи 4 продемонструвало поліпшення показників загальних Т-лімфоцитів ($CD3^+$), субпопуляції регуляторних Т-хелперів ($CD4^+$) і Т-супресорів/цитотоксичних ($CD8$). Важливо, що найбільшою мірою наближався до контролю IPI. Подібним чином після такої терапії змінювалися показники вмісту ПК і Т-рег клітин. Отримані дані вказують на те, що застосування кККЛ перешкоджає виникненню імунodefіциту, підвищуючи протизапальний потенціал організму.

Запальний цитокін ІФН- γ є регулятором функціонування субстратів клітинного і гуморального імунітету. ІФН- γ продукується Т- клітинами і ПК. Як видно із представлених у таблиці 2 даних, у тварин групи 2 кількість клітин-продуцентів цитокіну ІФН- γ вірогідно ($p < 0,001$) підвищувалася. У тварин групи 4 на 7 добу спостерігалось максимальне зниження даного показника до рівня контролю, що доводить участь кККЛ у зменшенні запальних реакцій, індукованих розвитком II. При стандартному лікуванні церебролізіном рівень запального цитокіна у щурів групи 3 залишався підвищеним, але був нижче, ніж у нелікованих тварин групи 2.

Інтерлейкін-10 (ІЛ-10) належить до цитокінів з яскраво вираженим протизапальним ефектом. Виробляють його Т-клітини і моноцити. Визначення вмісту клітин-продуцентів ІЛ-10 у щурів при розвитку II виявило значне його зниження (табл. 2). У тварин, яких лікували церебролізіном, був відзначений низький вміст ІЛ-10 $^+$ -клітин щодо контролю. Найбільш виражено показники вмісту ІЛ-10 $^+$ -клітин наближалися до контролю у щурів, які належали до групи 4. При цьому треба зауважити, що концентрація клітин-продуцентів цитокіну ІЛ-10 у цьому випадку залишалася нижче контролю. Виявлені зміни у вмісті клітин-продуцентів протизапального і запального цитокінів можуть бути відображенням тих механізмів, через які реалізується протизапальний ефект кККЛ.

Ступінь виразності вмісту у сироватці крові ЦІК, що є наслідком запалення, у щурів при розвитку II і після лікування була різна (табл. 3). Так у нелікованих тварин групи 2 на 7 добу після індукції II концентрація ЦІК у крові в 2,9 рази перевищувала контрольні показники. Застосування церебролізіну приводило до зниження вмісту ЦІК, однак, даний показник був вище контролю. У щурів групи 4 вміст ЦІК у крові знизився і практично відповідав контролю.

Як показано в таблиці 4, показники неврологічного статусу корелювали з відновленням імунного статусу і залежали від проведеного лікування. Тестування неврологічного статусу продемонструвало позитивний вплив кККЛ на весь організм у щурів групи 4 (табл. 4). Відновлення неврологічного статусу по 6 тестам на 7 добу після СМАО, у тварин цієї групи було в 1,8 разів вище, ніж у щурів в групах 2 і 3. У щурів групи 4 значно знижувався рівень тривожності, відновлювалася симетричність реакцій на подразнення лівого і правого боку тулуба та використання кінцівок.

При дослідженнях в тестах "Відкрите поле" і "Хрещатий лабіринт" було показано, що відновлення активності і орієнтації в експериментальній установці тварин, після введення кККЛ, більш виражено і відбувається швидше, ніж у тварин, яких лікували церебролізіном (табл. 5).

Порівняльний аналіз отриманих результатів свідчить про те, що показники неврологічного статусу тварин з II чітко корелювали зі зміною кількості ІКК, що визначають профіль запальних і

протизапальних цитокінів організму. Максимально виражена нормалізація клітин-продуцентів цитокінів обох типів (ІФН- γ і ІЛ-10) при лікуванні тварин кККП забезпечувала більшу наближеність показників неврологічного статусу щурів до контролю у порівнянні з такими у щурів, лікованих церебралізіном.

5

Таблица 1

Показники клітинної ланки імунітету у щурів з П до і після лікування, %

Популяції і субпопуляції клітин (фенотипові характеристики)	Групи тварин									
	1	2			3			4		
		1 доба	3 доба	7 доба	1 доба	3 доба	7 доба	1 доба	3 доба	7 доба
CD3 ⁺ /загальні Т-лімфоцити	20,4± 2,2	10,3±0,7 ^{1,4}	8,2± 0,6 ^{1,3,4}	4,1±0,3 ^{1,4}	11,0± 0,8 ^{1,4}	12,6± 0,9 ^{1,2}	11,6± 0,8 ¹	12,5± 0,2 ^{1,2,3}	13,9± 1,0 ^{1,2}	11,0± 0,8 ^{1,2}
CD4 ⁺ / Т-хелпери	16,7± 0,9	8,7± 0,6 ^{1,3,4}	6,0± 0,4 ^{1,4}	2,9± 0,2 ^{1,3,4}	10,0± 0,7 ^{1,2}	8,4± 0,6 ^{1,2}	9,4± 0,7 ^{1,2,4}	10,1± 0,7 ^{1,2}	8,9± 0,6 ^{1,2}	6,1± 0,4 ^{1,2,3}
CD8 ⁺ / Т-супресори/цитотоксичні	8,8± 1,5	2,2± 0,2 ^{1,3,4}	1,1± 0,1 ^{1,3,4}	4,0± 0,3 ^{1,3,4}	4,9± 0,3 ^{1,2,4}	7,9± 0,6 ^{2,4}	5,5± 0,4 ^{2,4}	3,7± 0,3 ^{1,2,3}	9,9±0,7 ^{2,3}	7,4± 0,5 ^{2,3}
CD16V ПК-клітини	12,5± 0,9	26,1± 1,8 ^{1,4}	10,0± 0,7 ⁴	4,9± 0,3 ^{1,3,4}	17,0± 1,2 ^{1,2,4}	10,6± 0,7 ⁴	7,1± 0,5 ^{2,4}	15,5± 1,1 ^{1,2,3}	13,7± 1,0 ^{2,3}	8,4± 0,6 ^{1,3,3}
GPI CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,9± 0,3	4,0± 0,3 ¹	4,2±0,3 ¹	4,5± 0,3 ¹	3,3± 0,2 ^{1,4}	3,8± 0,3 ^{1,4}	3,0±0,2 ^{1,4}	2,2± 0,2 ³	1,9± 0,1 ³	1,9* 0,1 ³
CD47 CD25 ⁺ Т-рег- клітини	5,3± 0,5	4,2± 0,3 ^{1,4}	3,4± 0,2 ^{1,3,4}	1,0* 0,1 ^{1,3,4}	4,3±0,3 ^{1,4}	4,3± 0,3 ^{1,2,4}	4,0± 0,3 ^{1,2,4}	5,0± 0,3 ^{2,3}	5,0± 0,3 ^{2,3}	5,3± 0,4 ^{2,3}

Примітки: Достовірні розходження ($p < 0,05$) у порівнянні: 1 - з контролем; 2 - із групою 2; 3 - із групою 3; 4 - із групою 4 у відповідний термін.

Таблица 2

Показники вмісту клітин-продуцентів цитокінів у щурів з ІІ до і після лікування, %

Клітини-продуценти цитокінів	Групи тварин									
	1	2			3			4		
		1 доба	3 доба	7 доба	1 доба	3 доба	7 доба	1 доба	3 доба	7 доба
ІФН-γ ⁺ -клітини	8,89± 0,4	22,2± 1,6 ^{1,3,4}	22,2± 1,6 ^{1,3,4}	17,8± 1,2 ^{1,3,4}	15,6± 1,1 ^{1,2}	13,3± 0,9 ^{1,2}	10,7± 0,7 ^{1,2}	16,2± 1,1 ^{1,2}	13,2± 0,9 ^{1,2}	10,3± 0,7 ^{1,2}
ІЛ-10 ⁺ -клітини	3,7± 0,4	1,5± 0,1 ^{1,3,4}	1,3± 0,1 ^{1,3,4}	1,6± 0,1 ^{1,3,4}	1,9±0,1 0,1 ^{1,2}	2,2± 0,2 ^{1,2}	2,0± 0,1 ^{1,2,4,5}	2,1± 0,1 ^{1,2}	2,4± 0,2 ^{1,2}	2,8± 0,2 ^{1,2,3}

Примітки: Достовірні розходження ($p < 0,05$) у порівнянні: 1 - з контролем; 2 - із групою 2; 3 - із групою 3; 4 - із групою 4 у відповідний термін.

Таблица 3

Вміст ЦПС у щурів з ІІ до і після лікування, ум. од.

Група тварин	Строк після індукції ІІ		
	1 доба	3 доба	7 доба
1. Інтакт	18,0 \pm 1,2 ^{2,3,4}	18,0 \pm 1,2 ^{2,3,4}	18,0 \pm 1,2 ^{2,3}
2. ІІ	28,8 \pm 2 ^{1,3,4}	33,7 \pm 2,4 ^{1,3,4}	52,2 \pm 3,7 ^{1,3,4}
3. ІІ+церебралізин	25,2 \pm 1,8 ^{1,2}	28,1 \pm 2 ^{1,2,4}	25,2 \pm 1,8 ^{1,2,4}
4. ІІ + кордова кров	25,2 \pm 1,8 ^{1,2}	22,5 \pm 1,8 ^{1,2,3*}	19,3 \pm 1,4 ^{2,3}

Примітки: Достовірні розходження ($p < 0,05$) у порівнянні: 1 - з контролем; 2 - із групою 2; 3 - із групою 3; 4 - із групою 4 у відповідний термін.

Таблиця 4

Оцінка неврологічного статусу у щурів на 7 добу після індукції ІІ і лікування

Група тварин	Тести оцінки неврологічного статусу (в балах)						Сума балів
	1	2	3	4	5	6	
1. Інтакт	3 ^{2,3,4}	3 ^{2,3,4}	3 ^{2,3,4}	3 ^{2,3,4}	3 ^{2,3,4}	3 ^{2,3,4}	18
2. ІІ	1,6±0,09 ^{1,3,4}	1,0±0,4 ^{1,4}	1,0±0,2 ^{1,4}	0,7±0,1 ^{1,4}	2,1±0,3 ¹	2,0±0,2 ^{1,4}	8,4±1,3 ^{1,4}
3. ІІ +церебралізін	2,0±0,2 ^{1,2}	1,2±0,2 ^{1,4}	1,1±0,3 ^{1,4}	0,9±0,1 ^{1,4}	2,2±0,1 ¹	2,1±0,1 ^{1,4}	9,5±1,0 ^{1,4}
4. ІІ + кордова кров	2,5±0,5 ^{1,2}	2,2±0,2 ^{1,2,3}	2,3±0,2 ^{1,2,3}	2,2±0,1 ^{1,2,3}	2,4±0,2 ¹	2,6±0,1 ^{1,2,3}	14,2±1,3 ^{1,2,3}

Примітки: 1 - спонтанна активність; 2 - симетричність використання кінцівок при русі; 3 - симетричність використання передніх кінцівок, коли тварина мала опору тільки на них; 4 - симетричність використання кінцівок для схоплювання сітчастої поверхні; 5 - реакція на подразнення пропріорецепторів тулуба; 6 - реакція на дотик до вібрисів. Достовірні розходження ($p<0,05$) у порівнянні: 1 - з контролем; 2 - із групою 2; 3 - із групою 3; 4 - із групою 4 у відповідний термін.

Таблиця 5

Оцінка інтегративної діяльності мозку у щурів на 7 добу після розвитку ІІ і лікування

Група тварин	Локомоторна активність тварин в тесті "Відрите поле"	Дослідна діяльність тварин в тесті "Хрестоподібний лабіринт"
	Кількість пробігів	Кількість визирвань
1. Інтакт	67,69±4,74 ^{2,3,4}	5,25±0,38 ^{2,3}
2. ІІ	29,13±2,04 ¹	3,19±0,22 ^{1,3,4}
3. ІІ+церебралізін	31,16±12,18 ¹	4,17±10,29 ^{1,2,4}
4. ІІ + кордова кров	33,54±2,35 ¹	4,96±0,33 ^{2,3}

Примітки: Достовірні розходження ($p<0,05$) у порівнянні: 1 - з контролем; 2 - із групою 2; 3 - із групою 3; 4 - із групою 4 у відповідний термін.

Джерела інформації

- 5 1. Gaur S.P., Garg R.K., Kar A.M., Srimal R.C. Effect of anti-platelet therapy (aspirin+pentoxiphylline) on plasma lipids in patients of ischaemic stroke //Indian J. Physiol. Pharmacol, - 1993, - Vol. 37, № 2. - P. 158-160.
2. Алезин Е.К. Аспирин: новая жизнь старого лекарства //Соровский образовательный журнал. - 1999. - №7. - С. 85-90.
- 10 3. Heiss W.D., Brainin M., Bornstein N.M., Tuomilehto J., Hong Z. Cerebrolisin in patients with acute ischemic stroke in Asia: results of a double-blind, placebo-controlled randomized trial //Stroke. - 2012. - Vol.43, № 3. - P. 630-636.
4. Гольцев А.Н., Лебединец Д.В., Лебединец В.В., Останков М.В., Рассоха И.В. Нарушения иммунного статуса при ишемическом инсульте и его коррекция криоконсервированными фетальными нервными клетками //Медицина сьогодні і завтра. - 2010. - № 2-3. - С. 47-48.
- 15

ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

- 20 Спосіб лікування ішемічного інсульту, який передбачає використання біологічно активного препарату, який **відрізняється** тим, що як такий препарат використовують криоконсервовану кордову кров людини.

Комп'ютерна верстка О. Рябо

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

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