



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 475 261** (13) **C2**

(51) МПК

A61K 36/725 (2006.01)

A61K 36/71 (2006.01)

A61K 36/48 (2006.01)

A61K 36/328 (2006.01)

A61K 36/324 (2006.01)

A61K 36/258 (2006.01)

A61K 36/185 (2006.01)

A61K 35/64 (2006.01)

A61K 35/62 (2006.01)

A61K 31/045 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61K 125/00 (2006.01)

A61K 131/00 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011107255/15, 29.07.2008

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.07.2008

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 29.07.2008

(43) Дата публикации заявки: 10.09.2012 Бюл. № 25

(45) Опубликовано: 20.02.2013 Бюл. № 5

(56) Список документов, цитированных в отчете о
поиске: CN 1939438 A, 04.04.2007. CN 1334121 A,
02.06.2006. RU 2294206 C2, 20.10.2006.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 28.02.2011

(86) Заявка РСТ:
CN 2008/001401 (29.07.2008)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2010/012127 (04.02.2010)

Адрес для переписки:

129090, Москва, ул.Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городиский и
Партнеры", пат.пов. А.В.Мишу, рег.№ 364

(72) Автор(ы):

ЯН Юэцзинь (CN),
ЦЯНЬ Хайянь (CN)

(73) Патентообладатель(и):

ХЭБЭЙ МЛИН МЕДСИН РИСЕРЧ
ИНСТИТЬЮТ КО., ЛТД. (CN)

(54) ПРИМЕНЕНИЕ ТРАДИЦИОННОЙ КИТАЙСКОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ КОМПОЗИЦИИ
ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ПРОМОТИРОВАНИЯ
ВЫЖИВАНИЯ *in vivo* ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КОСТНОГО МОЗГА МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ИХ ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ В КАРДИОМИОЦИТЫ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к средству для промотирования выживания полученных из костного мозга мезенхимальных стволовых клеток *in vivo* и дифференциации в кардиомиоциты. Применение традиционной китайской лекарственной композиции для получения лекарственного препарата для промотирования выживания полученных из костного мозга мезенхимальных стволовых клеток *in vivo* и дифференциации в

кардиомиоциты. Традиционная китайская лекарственная композиция (варианты). Способ лечения или профилактики сердечно-сосудистого заболевания, включающий введение нуждающимся пациентам эффективного количества традиционной китайской лекарственной композиции, и мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга. Вышеописанная композиция эффективна для промотирования выживания полученных из костного мозга мезенхимальных стволовых

клеток in vivo и дифференциации в табл., 1 пр.
кардиомиоциты. 5 н. и 10 з.п. ф-лы, 8 ил., 1

R U 2 4 7 5 2 6 1 C 2

R U 2 4 7 5 2 6 1 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.

- | | |
|------------------------------|------------------------------|
| <i>A61K 36/725</i> (2006.01) | <i>A61K 9/00</i> (2006.01) |
| <i>A61K 36/71</i> (2006.01) | <i>A61P 9/00</i> (2006.01) |
| <i>A61K 36/48</i> (2006.01) | <i>A61K 125/00</i> (2006.01) |
| <i>A61K 36/328</i> (2006.01) | <i>A61K 131/00</i> (2006.01) |
| <i>A61K 36/324</i> (2006.01) | |
| <i>A61K 36/258</i> (2006.01) | |
| <i>A61K 36/185</i> (2006.01) | |
| <i>A61K 35/64</i> (2006.01) | |
| <i>A61K 35/62</i> (2006.01) | |
| <i>A61K 31/045</i> (2006.01) | |

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: **2011107255/15, 29.07.2008**

(24) Effective date for property rights:
29.07.2008

Priority:

(22) Date of filing: **29.07.2008**

(43) Application published: **10.09.2012 Bull. 25**

(45) Date of publication: **20.02.2013 Bull. 5**

(85) Commencement of national phase: **28.02.2011**

(86) PCT application:
CN 2008/001401 (29.07.2008)

(87) PCT publication:
WO 2010/012127 (04.02.2010)

Mail address:

**129090, Moskva, ul.B.Spaskaja, 25, str.3, OOO
"Juridicheskaja firma Gorodisskij i Partnery",
pat.pov. A.V.Mitsu, reg.№ 364**

(72) Inventor(s):

**JaN Juehtszin' (CN),
TsJaN' Khajjan' (CN)**

(73) Proprietor(s):

**KhEhBEhJ MLIN MEDSIN RISERCh
INSTIT'JuT KO., LTD. (CN)**

(54) APPLICATION OF TRADITIONAL CHINESE MEDICAL COMPOSITION FOR OBTAINING MEDICATION FOR PROMOTION OF SURVIVAL OF OBTAINED FROM BONE MARROW MESENCHYMAL STEM CELLS in vivo AND THEIR DIFFERENTIATION IN CARDIOMYOCYTES

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, namely to medication for promotion of survival of obtained from bone marrow mesenchymal stem cells in vivo and differentiation in cardiomyocytes. Application of traditional Chinese medical composition for obtaining medication for promotion of survival of obtained from bone marrow mesenchymal stem cells in vivo and differentiation in cardiomyocytes. Traditional Chinese medication

composition (versions). Method of treatment and prevention of cardiovascular disease, including introduction to patients who need it of efficient quantity of traditional Chinese medical composition, and mesenchymal stem cells, obtained from bone marrow.

EFFECT: composition is efficient for promotion of in vivo survival of obtained from bone marrow mesenchymal stem cells and their differentiation in cardiomyocytes.

15 cl, 8 dwg, 1 tbl, 1 ex

C 2
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100

R U
2
4
7
5
2
6
1
C 2

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к новому применению традиционной китайской лекарственной композиции, в частности оно относится к применению традиционной китайской лекарственной композиции для получения лекарственного препарата для промотирования выживания *in vivo* полученных из костного мозга мезенхимальных стволовых клеток и их дифференциации в кардиомиоциты. Изобретение, кроме того, относится к традиционной китайской лекарственной композиции, которая оказывает стимулирующие эффекты на выживание полученных из костного мозга

мезенхимальных стволовых клеток *in vivo* и их дифференциацию в кардиомиоциты, и к способу профилактики или лечения сердечно-сосудистых заболеваний традиционной китайской лекарственной композицией.

Предпосылки изобретения

Сердечно-сосудистые заболевания являются причиной смерти 12 миллионов человек, что составляет примерно 1/4 всех случаев смерти во всем мире в год, и они становятся одними из самых опасных заболеваний людей. При инфаркте миокарда или сердечной недостаточности традиционная терапия, включая лекарственные препараты, различные вмешательства, включая хирургические, не могут вызвать регенерацию недостающих клеток миокарда, и ввиду того, что дефицит клеток миокарда вызывает необратимую перестройку миокарда, это, в конечном счете, приводит к сердечной недостаточности и смерти. В последние годы регенеративная медицина с использованием стволовых клеток достигла большого прогресса в лечении сердечно-сосудистых заболеваний, и используемая методика также носит название клеточной кардиомиопластики, то есть она достигает восстановления поврежденного миокарда за счет трансплантации стволовых клеток или клеток миокарда или путем мобилизации стволовых клеток периферической крови или миелоидных стволовых клеток для миграции к поврежденным частям миокарда. Проведение клеточной кардиомиопластики путем трансплантации стволовых клеток является возможным способом улучшения гемодинамических показателей и коррекции нейрогуморальных расстройств, вызванных инфарктом миокарда. Различные ранее проведенные эксперименты на животных показывают, что стволовые клетки обладают способностью восстанавливать клетки миокарда и могут улучшить перфузию зоны инфаркта и сердечную функцию (Schuster M.D., Kocher A.A., Seki T., Martens T.P., Xiang G., Homma S., et al. Myocardial neovascularization by bone marrow angioblasts results in cardiomyocyte regeneration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287: H525-532).

Хотя стволовые клетки использовались для клинических исследований восстановления миокарда, после воздействия ишемии/реперфузии и воспалительных факторов это приводило к гибели донорских клеток в области региональной ишемии миокарда, и поэтому развитие клеточной кардиомиопластики задерживалось низкой выживаемостью трансплантированных клеток. Исследования показывают, что большое число клеток погибало после трансплантации в пораженное сердце, и имелась значительная потеря клеток в пределах 24 ч, но 15% трансплантированных клеток выживали после 12 недель (Muller-Ehmsen J., Whittaker P., Kloner R.A., Dow J.S., Sakoda T., Long T.I., et al. Survival and development of neonatal rat cardiomyocytes transplanted into adult myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 2002; 34: 107-11)[PMID: 11851351].

Острый инфаркт миокарда может вызвать тяжелую региональную ишемию миокарда, воспалительную реакцию, окислительный стресс и апоптоз, которые могут в значительной степени снизить выживаемость трансплантированных клеток. Таким образом, защита региональных трансплантированных стволовых клеток или

исключение их гибели важны для клинического применения. В настоящее время доступно несколько способов повышения выживаемости трансплантированных клеток: (1) обработка тепловым шоком может повысить устойчивость трансплантированных клеток к повреждению ишемией/реперфузией *in vivo*, увеличить выживаемость после трансплантации в сердце (Suzuki K., Smolenski R.T., Jayakumar J., Murtuza B., Brand N.J., Yacoub M.H. Heat shock treatment enhances graft cell survival in skeletal myoblast transplantation to the heart. *Circulation* 2000; 102: 216-221)[PMID: 11082390]); (2) полученные из костного мозга мезенхимальные стволовые клетки, модифицированные вирусом Akt, предотвращают перестройку и восстанавливают сердечную функцию после инфаркта (Mangi A.A., Noiseux N., Kong D., He H., Pezvan M., Ingwall J. S., et al. Mesenchymal stem cells modifier with Akt prevent remodeling and restore performance of infarcted hearts. *Nat Med* 2003; 9: 1195-1201)[PMID: 12910262]; (3) инъекции плазмидного вектора в региональный ишемизированный миокард, что приводит к сверхэкспрессии оксигеназы-1 феррогема, уменьшению числа клеток миокарда, инфильтрированных мононуклеарными клетками, и подавляющей регуляции экспрессии воспалительных факторов (Tang Y.L., Tang Y., Zhang C., Qian K.P., Shen L.P., Phillips I. Improved graft mesenchymal stem cell survival in ischemic heart with a hypoxia-regulated Ferroheme Oxygenase-1 vector. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46: 1339-1350) [PMID: 1619885]. Все указанные выше средства основаны на уровне донорских клеток, однако ключом к судьбе трансплантированных клеток в сердце является микросреда регионального миокарда, пораженного в результате инфаркта, с тем, чтобы вмешательство, проводимое в микросреде пораженного инфарктом миокарда, могло быть более эффективным в промотировании выживания трансплантированных клеток и оказания биологического эффекта.

Настоящее изобретение представляет собой дальнейшее усовершенствование патента Китая № 01131203.3 и патентной заявки № 200410048292.2, которые полностью включены в настоящее описание путем ссылки. Изобретение относится к новому применению традиционной китайской лекарственной композиции для получения лекарственного препарата для промотирования выживания полученных из костного мозга мезенхимальных стволовых клеток *in vivo* и дифференциации в кардиомиоциты, которое улучшает качество региональной микросреды с помощью инвазивной терапии и эффективно содействует выживанию и биологическим эффектам трансплантированных клеток.

Краткое описание сущности изобретения

Целью настоящего изобретения является применение традиционной китайской лекарственной композиции для получения лекарственного препарата для промотирования выживания полученных из костного мозга мезенхимальных стволовых клеток *in vivo* и дифференциации в кардиомиоциты. Традиционная китайская лекарственная композиция состоит из следующих неочищенных лекарственных средств (в частях по массе):

Женьшень 3-10
 Пиявка 3-11
 Жужелица 5-10
 Ладанное дерево (обработанное) 1-5
 Корень красного пиона 3-9
 Сердцевина дальбергии 1-5
 Сандаловое дерево 1-5
 Скорпион 3-9

Выползок цикады 3-12

Многоножка 1-3

Борнеол 1-7

Семена зизифуса (печеные при перемешивании) 3-10;

5 предпочтительно традиционная китайская лекарственная композиция состоит из следующих неочищенных лекарственных средств (в частях по массе):

Женьшень 6

Пиявка 10

10 Жужелица 7

Ладанное дерево (обработанное) 2

Корень красного пиона 5

Сердцевина дальбергии 2

Сандаловое дерево 2

15 Скорпион 7

Выползок цикады 7

Многоножка 1

Борнеол 5

20 Семена зизифуса (печеные при перемешивании) 5;
или:

Женьшень 10

Пиявка 8

Жужелица 7

25 Ладанное дерево (обработанное) 2

Корень красного пиона 5

Сердцевина дальбергии 2

Сандаловое дерево 2

30 Скорпион 9

Выползок цикады 7

Многоножка 1

Борнеол 5

35 Семена зизифуса (печеные при перемешивании) 5;
или:

Женьшень 6

Пиявка 11

Жужелица 7

40 Ладанное дерево (обработанное) 2

Корень красного пиона 5

Сердцевина дальбергии 2

Сандаловое дерево 2

Скорпион 3

45 Выползок цикады 7

Многоножка 1

Борнеол 5

50 Семена зизифуса (печеные при перемешивании) 5;
или:

Женьшень 5,5

Пиявка 10,375

Жужелица 6,875

Ладанное дерево (обработанное) 2,25

Корень красного пиона 4,75

Сердцевина дальбергии 2,375

Сандаловое дерево 2,25

5

Скорпион 6,875

Выползок цикады 6,875

Многоножка 1,375

Борнеол 1,375

10

Семена зизифуса (печеные при перемешивании) 4,625;

более предпочтительно активные ингредиенты указанной выше традиционной китайской лекарственной композиции состоят из следующих ингредиентов:

15

а. скорпион, пиявка, многоножка, жужелица, выползок цикады и порошок обработанного ладанного дерева, который имеет средний размер частиц менее чем 100 мкм;

б. порошок борнеола;

с. летучие масла, экстрагированные из сердцевин дальбергии и сандалового дерева;

20

д. конденсированный спиртовой экстракт женьшеня, экстрагированный этанолом;

е. конденсированный водный экстракт, который получен следующим образом:

25

экстрагирование остатка сердцевин дальбергии и сандалового дерева водой после экстрагирования компонента с из них, вываривание корня красного пиона и печеных при перемешивании семян зизифуса в воде, экстрагирование остатка женьшеня водой после экстрагирования компонента d из него, фильтрация всех указанных выше экстрактов, их смешивание, затем концентрация.

30

Изобретение, кроме того, раскрывает, что лекарственный препарат, содержащий указанную выше китайскую медицинскую композицию в качестве активных компонентов, представляет собой капсулу, таблетку, пилюлю, пероральную жидкую лекарственную форму, мягкую капсулу или гомеопатический шарик, насыщенный жидкой лекарственной формой.

35

Другой целью изобретения является обеспечение применения указанной выше традиционной китайской лекарственной композиции для получения лекарственного препарата для лечения сердечно-сосудистых заболеваний мезенхимальными стволовыми клетками, полученными из аутологичного костного мозга, при этом предпочтительно, что сердечно-сосудистое заболевание представляет собой инфаркт миокарда, предпочтительнее острый инфаркт миокарда.

40

Другой целью изобретения является предоставление традиционной китайской лекарственной композиции, которая промотирует выживание *in vivo* мезенхимальных стволовых клеток, полученных из аутологичного костного мозга, и их дифференциации в кардиомиоциты, и традиционной китайской лекарственной композиции, которая применяется для лечения сердечно-сосудистых заболеваний в комбинации с мезенхимальными стволовыми клетками, полученными из аутологичного костного мозга, причем сердечно-сосудистое заболевание представляет собой инфаркт миокарда, предпочтительнее острый инфаркт миокарда.

50

В традиционной китайской лекарственной композиции по изобретению латинские названия и способ переработки сырьевых материалов в качестве активного компонента получены из Словаря Китайских Традиционных Лекарственных Средств (первое издание, Шанхайское Научное и Техническое Издательство, июль 1977 г.) и Китайской Фармакопеи (издание 2005 г., Издательство Химической

Промышленности).

Традиционная китайская лекарственная композиция по изобретению может быть составлена в виде любых обычных фармацевтически приемлемых лекарственных форм, таких как твердые капсулы, таблетки, пилюли, перорально принимаемые жидкие формы, мягкие капсулы, гомеопатические шарики, насыщенные жидкой лекарственной формой, и т.д., в соответствии с обычным способом получения, например технологией получения, зарегистрированной в Китайских лекарственных фармацевтических препаратах (Фэн-Би-Тин, Шанхайское Научное Издательство, декабрь 1997 г., 1-ое издание).

Препараты по изобретению могут необязательно также содержать включенные в их состав обычные фармацевтически приемлемые эксципиенты, такие как наполнители, разрыхлители, связывающие вещества, глиданты, антиоксиданты, ароматизирующие агенты, подслащивающие агенты, суспендирующие агенты и т.д. Эксципиенты включают, например, крахмал, сахарозу, лактозу, декстрин, предварительно желатинизированный крахмал, кросполвинилпирролидон и т.д., или другие китайские лекарственные средства, фармацевтически приемлемые эксципиенты (эксципиенты различных лекарственных форм, зарегистрированных в Китайских лекарственных фармацевтических препаратах (Фэн-Би-Тин, Шанхайское Научное Издательство, декабрь 1997 г., 1-ое издание).

Предпочтительно способ получения препаративных форм по изобретению следующий: очистка 5 сырьевых материалов указанной выше пропорции пиявки, скорпиона, выползка цикады, жужелицы и многоножки; сушка при низкой температуре; отстаивание; экстрагирование летучих масел сандалового дерева и сердцевины дальбергии; отстаивание остатка и водного раствора; экстрагирование женьшеня нагреванием дважды в сосуде с обратным холодильником с 70% этанолом, 3 часа в первый раз и 2 часа во второй раз; объединение экстрактов и полное извлечение этанола; объединение остатка женьшеня, остатка сандалового дерева и сердцевины дальбергии в водном растворе; добавление к нему корня красного пиона и семян зизифуса (печеных при перемешивании); добавление нужного количества воды для двукратного отваривания в течение 3 часов первый раз и 2 часов во второй раз; объединение отвара, фильтрация, концентрирование фильтрата в пасту с относительной плотностью 1,20-1,25 (60°C); затем добавление спиртового экстракта женьшеня; тщательное смешивание; сушка при низкой температуре; измельчение в мелкий порошок; совместный помол ладанного дерева (обработанного) и 5 материалов из пиявки и т.д. в мелкие порошки; помол борнеола и совместный помол постепенно с указанными выше мелкими порошками до тщательного смешивания; распыление летучих масел в порошки; тщательное смешивание; заполнение капсул для изготовления 1000 капсул.

Или, предпочтительно, препараты по изобретению получают следующим образом:

а) пропорция по массе сырьевых материалов следующая: женьшень - 3-10 частей, пиявка - 3-11 частей, жужелица - 5-10 частей, ладанное дерево (обработанное) - 1-5 частей, корень красного пиона - 3-9 частей, сердцевина дальбергии - 1-5 частей, сандаловое дерево - 1-5 частей, скорпион - 3-9 частей, выползок цикады - 3-12 частей, многоножка - 1-3 части, борнеол - 1-7 частей, печеные при перемешивании семена зизифуса - 3-10 частей;

б) способ пульверизации для медицинских материалов:

выбор и промывание пяти личиночных лекарственных препаратов из скорпиона, пиявки, многоножки, жужелицы и выползка цикады, затем объединение их с

обработанным ладанным деревом в соответствии с рецептом, измельчение ступкой для получения порошка из крупных частиц, которые могут достигать размера более 80 меш; сверхмелкий помол порошка из крупных частиц с использованием технологий сверхмелкого распыления для получения лекарственного порошка размером частиц менее чем 100 мкм; введение лекарственных материалов в условиях

5 пульверизации после очистки, сушки и стерилизации.

с) способы экстракции, концентрации и сушки:

добавление воды к сердцевине дальбергии и сандаловому дереву, экстрагирование летучих масел из них с последующим экстрагированием их водой, отваривание корня красного пиона и семян зизифуса, фильтрация водного раствора, отстаивание; экстрагирование женьшеня водой после экстрагирования его этанолом, извлечение этанола из спиртового раствора и концентрирование его в этаноловый экстракт, фильтрация водного раствора женьшеня и комбинирование его с другими водными

15 растворами, перемешивание и концентрирование в водный экстракт;

d) способ получения:

подача сверхмелких порошков в гранулирующую сушку с псевдосжиженным слоем, затем распыление экстракта со стадии с) для гранулирования; шлифовка гранул, добавление мелкого порошка борнеола, распыление летучих масел, экстрагированных из сердцевины дальбергии и сандалового дерева, заполнение в капсулы машиной для

20 заполнения капсул после тщательного смешивания.

Или, предпочтительно, препараты по изобретению получают следующим образом:

а) пропорция по массе сырьевых материалов следующая: женьшень - 3-10 частей, пиявка - 3-11 частей, жужелица - 5-10 частей, ладанное дерево (обработанное) - 1-5 частей, корень красного пиона - 3-9 частей, сердцевина дальбергии - 1-5 частей, сандаловое дерево - 1-5 частей, скорпион - 3-9 частей, выползок цикады - 3-12 частей, многоножка - 1-3 части, борнеол - 1-7 частей, печенье при перемешивании семени зизифуса - 3-10 частей;

30 б) способ пульверизации для медицинских материалов:

выбор и промывание пяти личиночных лекарственных препаратов из скорпиона, пиявки, многоножки, жужелицы и выползка цикады, затем объединение их с обработанным ладанным деревом в соответствии с рецептом, измельчение ступкой для получения порошка из крупных частиц, которые могут достигать размера более 80 меш; сверхмелкий помол порошка из крупных частиц использованием технологий сверхмелкого распыления для получения лекарственного порошка размером менее чем 100 мкм; введение лекарственных материалов в условиях

40 пульверизации после очистки, сушки и стерилизации.

с) способы экстракции, концентрации и сушки:

добавление воды к сердцевине дальбергии и сандаловому дереву, экстрагирование летучих масел из них с последующим экстрагированием их водой, отваривание корня красного пиона и семян зизифуса, фильтрация водного раствора, отстаивание; экстрагирование женьшеня водой после экстрагирования его этанолом, извлечение этанола из спиртового раствора и концентрирование его в этаноловый экстракт, фильтрация водного раствора женьшеня и комбинирование его с другими водными

45 растворами, перемешивание и концентрирование в водный экстракт, затем прямая сушка распылением для получения высушенных распылением порошков;

d) способ получения:

50 подача сверхмелких порошков и полученных распылением порошков со стадии с) в гранулирующую сушку с псевдосжиженным слоем, затем распыление растворителя

для получения гранул; шлифовка гранул, добавление мелкого порошка борнеола, распыление летучих масел, экстрагированных из сердцевины дальбергии и сандалового дерева, заполнение в капсулы машиной для заполнения капсул после тщательного смешивания.

5 Дозировка композиции по изобретению, рассчитанная по общей массе сырьевых материалов в качестве активного компонента, составляет 0,8-3 г на прием, 2-4 раза в сутки, предпочтительно составляет 1,11-2,22 г на прием, 3 раза в сутки.

10 Большое количество экспериментальных данных, представленных в рамках изобретения, показало, что применение группы лекарственных средств по изобретению может стимулировать клеточную кардиомиопластику, осуществляемую полученными из аутологичного костного мозга мезенхимальными стволовыми клетками. Выявление профилей генной экспрессии после инфаркта миокарда микрочипом обнаружило, что отдельное применение низкой дозы группы
15 лекарственных средств по изобретению может привести к положительным изменениям генной экспрессии, включая стимулирующую регуляцию противовоспалительных, противоапоптозных и противофиброзных генов. Таким образом, считается, что применение группы лекарственных средств по изобретению в лечебных целях может
20 улучшить региональную микросреду после острого инфаркта миокарда, с тем чтобы значимо улучшить выживание и дифференциацию имплантированных мезенхимальных клеток, полученных из костного мозга. Поэтому экспериментальные данные изобретения также показывают, что применение группы лекарственных
25 средств по изобретению для лечения может эффективно улучшить региональную внутреннюю микросреду после острого инфаркта миокарда и стимулировать клеточную кардиомиопластику, осуществляемую полученными из аутологичного костного мозга мезенхимальными стволовыми клетками, посредством этого оказывая
30 положительное воздействие на клиническое применение трансплантации полученных из костного мозга мезенхимальных стволовых клеток.

Другой целью изобретения является способ лечения или профилактики сердечно-сосудистых расстройств традиционной китайской лекарственной композицией, включающий введение нуждающимся в этом пациентам эффективного количества
35 традиционной китайской лекарственной композиции. Сердечно-сосудистое заболевание предпочтительно представляет собой инфаркт миокарда, предпочтительнее представляет собой острый инфаркт миокарда. Для введения могут применяться обычные подходы, используемые в данной области.

Описание фигур

40 Фиг. 1. Окрашивание гематоксилином-эозином (HE) и окрашивание трихромом по Мэссону пораженных инфарктом областей в четырех группах экспериментальных животных при световой микроскопии. На снимках показано, что во всех группах - первой группе (контрольной группе), второй группе (получавшей лечение только
45 низкой дозой лекарственного препарата по изобретению) и в третьей группе (получавшей лечение только трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга), проявляется тяжелый фиброз и воспалительная клеточная инфильтрация, в пораженных инфарктом областях по существу не было
50 обнаружено выживание кардиомиоцитов. Однако в четвертой группе (получавшей лечение трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, в комбинации с лекарственным средством по изобретению) проявляется незначительный фиброз и воспалительная клеточная инфильтрация. Увеличение фиг. 1А составляет 400х, а увеличение фиг. 1В составляет 40х.

Фиг. 2. Потенциал выживания мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, трансплантированных в сердце. На фиг. 2А указано, что трансплантированные клетки, окрашенные дигидрохлоридом 4',6-диамино-2-фенилиндола (DAPI), наблюдались в третьей группе (получавшей лечение только трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга), но в четвертой группе (получавшей лечение трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, в комбинации лекарственным средством по изобретению) было много трансплантированных клеток, окрашенных DAPI. Фиг. 2В показывает, что имеется статистически значимое различие между потенциалом выживания в третьей группе (получавшей лечение только трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга) и в четвертой группе (получавшей лечение трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, в комбинации лекарственным средством по изобретению). *P<0,0001, увеличение изображения А составляет 400х.

Фиг. 3. Дифференцировка трансплантированных в организм мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, в кардиомиоциты и сосудистые структуры. На фиг. 3А и 3В показано, что некоторые клетки, меченные DAPI, экспрессируют α -SCA (α -саркомерный актин) и cTnT (сердечный тропонин Т). Фиг. 3С иллюстрирует, что некоторые DAPI-положительные клетки экспрессируют VSMА (сосудистый гладкомышечный актин) и сосудистый эндотелиальный специфический фактор VEGF, указывая на вовлечение образования сосудов. На фиг. 3D показано, что потенциал дифференциации мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, в кардиомиоциты третьей группы (получавшей лечение только трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга), при статистическом сравнении соотношения DAPI-положительных клеток, дифференцирующихся в кардиомиоциты, с четвертой группой (получавшей лечение трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, в комбинации лекарственным средством по изобретению) выявляется значимое различие. *P<0,0001, увеличение фиг. 3А, фиг. 3В и фиг. 3С составляет 400х.

Примечание: MSC относится к мезенхимальным стволовым клеткам, полученным из костного мозга, VWF представляет фактор фон Виллебранда, SM-actin представляет сосудистый гладкомышечный актин, и Overlay относится к результатам наложения окрашивания трех полей зрения.

Фиг. 4. Экспрессия коннексинов в имплантированных клетках in vivo. Фиг. 4А показывает, что клетки, меченные DAPI, экспрессируют коннексин 43(Cx43). Фиг. 4В показывает значимое различие экспрессии коннексина 43, при сравнении третьей группы (получавшей лечение только трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга) с четвертой группой (получавшей лечение трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, в комбинации лекарственным средством по изобретению). *P<0,0001, увеличение фиг. 4А составляет 400х. Примечание: Overlay относится к результатам наложения окрашивания трех полей зрения.

Фиг. 5. Плотность капиллярной сети в зоне инфаркта и окружающей инфаркт зоне через 6 недель после трансплантации

Через 6 недель после трансплантации плотность капиллярной сети в зоне инфаркта и окружающей инфаркт зоне второй группы (получавшей лечение только низкой дозой лекарственного препарата по настоящему изобретению) и плотность капиллярной сети в третьей группе (получавшей лечение только трансплантацией

мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга) не имеют значимого отличия от контрольной группы (* $P > 0,05$, ** $P > 0,05$), но обе величины плотности были ниже, чем у четвертой группы (получавшей лечение трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, в комбинации с

5

лекарственным средством по изобретению), (соответственно, # $P < 0,0001$, ## $P < 0,0001$).

Фиг. 6. Зона дефекта перфузии миокарда, выявленная однофотонной эмиссионной компьютерной томографией (СПЕКТ) через 1 неделю и 6 недель после трансплантации.

10

На фиг. 6А показаны типичные графики каждой группы. На фиг. 6В показаны исходные результаты СПЕКТ, где нет значимого различия между зоной дефекта перфузии миокарда в четырех группах (* $P = 0,984$). Через 6 недель после трансплантации зона дефекта перфузии миокарда в четвертой группе (получавшей лечение трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, в комбинации с лекарственным средством по изобретению) значительно уменьшилась на $22,1 \pm 9,3\%$; при сравнении с контрольной группой, второй группой (получавшей лечение только низкой дозой лекарственного препарата по настоящему изобретению) и третьей группой (получавшей лечение только трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга) имеется резкое

15

20

различие ($n=7$, * $P < 0,0001$).

Фиг. 7. Анти-апоптотическое действие лекарственного препарата по настоящему изобретению

25

(А) Апоптотические клетки с разрушенной ДНК в ядре, которые определялись с помощью антител против связывающего белка в миокарде, окружающем зону инфаркта у свиней и мечением «ник»-конца, опосредованного концевой дезоксиуклеотидил-трансферазой (dUTP) дезоксиуридин-трифосфата (TUNEL). В

30

конце наблюдения было несколько апоптотических ядер во второй группе (получавшей лечение только низкой дозой лекарственного препарата по настоящему изобретению) и в четвертой группе (получавшей лечение трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, в комбинации с лекарственным средством по изобретению) (отмечено стрелкой). Увеличение в 20 раз. (В)

35

Статистические показатели апоптоза (AI) четвертой группы. По сравнению с контрольной группой AI во второй группе (получавшей лечение только низкой дозой лекарственного препарата по настоящему изобретению) резко снизился (* $P < 0,0001$).

40

Кроме того, AI в четвертой группы (получавшей лечение трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, в комбинации с лекарственным средством по изобретению) был очевидно ниже, чем во второй группе (получавшей лечение только низкой дозой лекарственного препарата по настоящему изобретению) (* $P < 0,0001$). Но по сравнению с контрольной группой AI третьей группы (получавшей лечение только трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга) значимо не отличался (** $P = 0,289$).

45

Фиг. 8. Выявление уровня окислительного стресса миокарда, окружающего зону инфаркта, в конце эксперимента

50

Активность супероксид-дисмутазы (SOD) во второй группе (получавшей лечение только низкой дозой лекарственного препарата по настоящему изобретению) и в четвертой группе (получавшей лечение трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, в комбинации с лекарственным средством по изобретению) значительно увеличилась по сравнению с контрольной группой (* $P < 0,05$, # $P < 0,05$), но не было очевидного различия активности супероксид-дисмутазы между третьей группой (получавшей лечение только трансплантацией

мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга) и контрольной группой (**P=0,449). (B) Содержание малондиальдегида (MDA) во второй группе (получавшей лечение только низкой дозой лекарственного препарата по настоящему изобретению) и в четвертой группе (получавшей лечение трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, в комбинации с лекарственным средством по изобретению) было значительно по сравнению с контрольной группой (*P<0,05, #P<0,05). Не было значимого различия между третьей группой (получавшей лечение только трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга) и контрольной группой (P=0,195).

Конкретные варианты осуществления

Пример 1: Получение лекарственного препарата по изобретению

а) Составление сырьевых материалов:

женьшень 55 г

пиявки 103,75 г

жужелица 68,75 г

ладанное дерево (обработанное) 22,5 г

корень красного пиона 47,5 г

сердцевина дальбергии 23,75 г

сандаловое дерево 22,5 г

скорпион 68,75 г

выползок цикады 68,75 г

многоножка 13,75 г

борнеол 13,75

семена зизифуса (печеные при перемешивании) 46,25 г;

б) способ пульверизации для лекарственных материалов:

выбор и промывание пяти личиночных лекарственных препаратов из скорпиона, пиявки, многоножки, жужелицы и выползка цикады, затем объединение их с обработанным ладанным деревом в соответствии с рецептом, измельчение ступкой для получения порошка из крупных частиц, которые могут достигать размера более 80 меш; сверхмелкий помол порошка из крупных частиц с использованием технологий сверхмелкого распыления для получения лекарственного порошка размером частиц менее чем 30-40 мкм; введение лекарственных материалов в условиях пульверизации после очистки, сушки и стерилизации.

в) способы экстракции, концентрации и сушки:

добавление воды к сердцевине дальбергии и сандаловому дереву, экстрагирование летучих масел из них с последующим экстрагированием их водой, отваривание корня красного пиона и семян зизифуса по 3 часа каждое, объединение отваров, фильтрация объединенного отвара, отстаивание его; дважды экстрагирование женьшеня подходящим количеством 70% этанола, по 3 часа каждый раз, объединение этаноловых растворов, полное извлечение этанола, затем экстрагирование остатка женьшеня водой, концентрирование этанолового раствора в этаноловый экстракт с относительной плотностью 0,9-1,1 (60°C), фильтрация водного раствора женьшеня и объединение его с другими водными растворами, перемешивание и концентрирование раствора в водный экстракт с относительной плотностью 0,9-1,1 (60°C), отстаивание;

г) способ получения:

подача сверхмелких порошков в гранулирующую сушку с псевдосжиженным слоем, затем распыление экстракта стадии в) для гранулирования; шлифовка гранул, добавление мелкого порошка борнеола, распыление летучих масел, экстрагированных

из сердцевины дальбергии и сандалового дерева, заполнение в капсулы машиной для заполнения в 1000 капсул после тщательного смешивания.

Дозировка лекарственного препарата по изобретению, рассчитанная по общей массе сырьевых материалов в качестве активного компонента, составляет 2-4 капсулы на прием, 3 раза в сутки.

Экспериментальный пример. Стимулирующая роль лекарственного препарата по изобретению при применении мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга

Материалы и методы

Животные

Китайские минисвиньи в возрасте 10 месяцев с массой тела 30 ± 5 кг были предоставлены Центром Экспериментальных Животных Китайского Сельскохозяйственного Университета. Все манипуляции с животными проводили гуманно в соответствии с «Руководством по обращению и использованию лабораторных животных», изданным Национальными Институтами Здоровья США. Все экспериментальные программы были поддержаны Комитетом по Обращению с Животными Лаборатории Китайской Академии Медицинских Наук и одобрены Этическим Комитетом в Отношении Экспериментальных Животных Госпиталя традиционной китайской медицины Фу-Уай Пекинского Объединенного Медицинского Колледжа.

Выделение и культивирование свиных мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга

Свиней анестезировали внутримышечной инъекцией кетамина и диазепама соответственно в дозе 25 мг/кг и 1 мг/кг. В асептических условиях проводили подготовку кожных покровов в области гребня левой подвздошной кости, которую обкладывали хирургическими салфетками, и с помощью шприца, содержащего 12500 единиц гепарина, и иглы из подвздошной кости брали 50 мл костного мозга. Всем животным перед возвращением в помещения для содержания внутримышечно инъецировали 0,3 мг бупренорфина.

Способы выделения и культивирования мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, представляли собой ранее описанные способы с небольшими модификациями. Вкратце, экстрагированный костный мозг разбавляли равным объемом PBS (солевого раствора с фосфатным буфером), добавляли коллоидную суспензию диоксида кремния (раствор Перколла для сепарации, 1,077 г/мл Sigma Company), мононуклеарные клетки отделяли центрифугированием при 800 g в течение 30 минут при 4°C. После двукратного промывания клеточного осадка PBS клетки культивировали при плотности $5 \times 10^5 / \text{см}^2$ в нормальной среде (содержащей DMEM (модифицированную по Дульбекко среду Игла) (Gibco Company), 10% фетальную телячью сыворотку (Gibco), 100 ЕД/мл пенициллина и стрептомицина) во влажном инкубаторе с 5% диоксида углерода при 37°C. Через 3 дня удаляли гематопозитические клетки, фибробласты и другие не прилипшие клетки замещением культуральной среды. Удержанные и очищенные прилипшие мезенхимальные клетки, полученные из костного мозга, культивировали для дальнейшей пролиферации. Культуру замещали через каждые 3 дня в течение эксперимента. После 10 дней культивирования прилипшие клетки образовывали однородный клеточный клон. Когда клетки достигали слияния 80%, то к прилипшим клеткам добавляли раствор 0,25% трипсина-0,02% EDTA (этилендиаминтетрауксусной кислоты) (Sigma) для их ресуспендирования, при эффективности пассирования 1:3 для дальнейшего

культивирования.

Получение модели инфаркта миокарда и трансплантированных клеток и стимулирующее действие лекарственного препарата по изобретению

28 китайских минисвиной были разделены на 4 группы: первая группа служила контролем (n=7), вторая группа (получала лечение только низкой дозой лекарственного препарата по изобретению, n=7), третья группа (получала лечение только трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, n=7), четвертая группа (получала лечение трансплантацией мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, в комбинации с лекарственным средством по изобретению, n=7).

После того как слияние клеток достигало 80%, их отделяли от культуральных колб, ресуспендировали в DMEM (Gibco), содержащей 10% фетальную телячью сыворотку, метили дигидрохлоридом 4',6-диамино-2-фенилиндола (DAPI) (50 мкг/мл, Sigma) в течение 30 минут при 37°C. Клетки промывали 6 раз в PBS для отмывания несвязанного DAPI и затем отбирали 3×10^7 клеток каждого животного и помещали их в теплую среду DMEM на несколько минут перед трансплантацией. Способ мечения имел большое значение, т.к. он должен был обеспечить окрашивание всех ядер трансплантированных клеток.

Свиной анестезировали внутримышечной инъекцией кетамина и диазепама в дозе соответственно 25 мг/кг и 1 мг/кг, производили канюлирование трахеи, соединенной с аппаратом искусственной вентиляции легких для ее проведения, анестезию поддерживали внутрисосудистой инъекцией кетамина и диазепама. Производили торакотомию стернотомией по средней линии, выделяли левую переднюю нисходящую ветвь (LAD) коронарной артерии до первых, отходящих под углом противоположных ветвей и выделенную ветвь перевязывали пластиковой кольцевой лигатурой для обеспечения образования ишемической зоны. Перед перевязкой коронарной артерии внутривенно инъецировали 2 мг/кг лидокаина, и внутривенное введение должно было продолжаться до конца операции при поддерживающей дозе лидокаина 0,5 мг/мин. Оклюзию левой передней нисходящей ветви (LAD) коронарной артерии продолжали в течение 90 минут для обеспечения получения модели инфаркта миокарда-реперфузии.

Через 30 минут после реперфузии, в зоны инфаркта и окружающие их области инъецировали 500 мкл суспензии мезенхимальных стволовых клеток, полученных из аутологичного костного мозга (3×10^7 клеток). Животным в контрольной группе производили инъекцию DMEM в таком же объеме.

После трансплантации разрез грудной клетки ушивали, в полость средостения помещали катетер 18 калибра для восстановления внутригрудного отрицательного давления и дренировали остаточную кровь и орошающий раствор. После этого прекращали введение наркотических средств и интубирующую трахею канюлю извлекали с учетом целесообразности в отношении заживления ран. Дренажную трубку из грудной полости удаляли при отсутствии утечки газа или остаточной крови. Все животные получали лечение антибиотиками после операции путем внутримышечной инъекции цефалоспорины в дозе 1,0 г 2 раза в сутки в течение 3 дней, при внутримышечной инъекции животным бупренорфина для облегчения боли 2 раза в день по 0,3 мг на прием в течение 3 дней.

Животные получали лекарственное средство для лечения по изобретению в дозировке на основании предыдущего эксперимента, начиная за 3 дня до и продолжая до 4 дней после трансплантации мезенхимальных стволовых клеток, полученных из

костного мозга, доза составляла 0,05 г/кг/д.

Магнитно-резонансная визуализация (МРТ)

Через одну и шесть недель после трансплантации параметры сердечной функции экспериментальных животных получали соответственно с помощью динамической МРТ и усиленной МРТ. Магнитно-резонансную визуализацию выполняли клинически используемым сканером 1,5T MRI [Siemens, Germany] с радиочастотной катушкой. Экспериментальных животных анестезировали внутримышечной инъекцией кетамина и диазепама, дозы составляли соответственно 25 мг/кг и 1 мг/кг. В МРТ использовалось беспроводное синхронизированное с ЭКГ спиновое эхо. С помощью динамической МРТ и соответствующей усиливающей МРТ сканировали один слой через каждые 4 мм, и было 6-8 слоев, начиная с уровня двустворчатого клапана. Выявляемый вид в горизонтальной и сагиттальной плоскости для определения правильных плоскостей по короткой оси определял изображение по длинной оси через каждые 60°. Изображения динамической МРТ получали стационарным быстрым градиентным эхом (TrueFisp) в комбинации с использованием параллельной технологии чувствительного к импульсной последовательности кодирования (TSENSE). Параметры типичных изображений были следующими: время цикла (TR)=41,7 мс, время эха (TE)=1,39 мс, ширина полосы частот (BW)=965 Гц/Пкс (пиксель), угол переворота (FA)=48°, матрица изображения=109×192, пространственное разрешение=3,2 мм×2,0 мм, толщина среза (SL)=6,0 мм, параллельный фактор=3. Эхо-визуализирующее устройство с технологией визуализации TSENSE использовали для получения изображений перфузии первого потока 3-4 коротких осей и четырехкамерных перфузионных изображений (TR=6,0 мс, TE=1,2 мс, FA=30°, пространственное разрешение=2,8 мм×2,8 мм, SL=10,0 мм, параллельный фактор=2, 4-5 изображений на одно сокращение сердца, все уровни представляли собой импульсы перед первым насыщением). Первый скан получал изображение для примерно 60 сердечных циклов. Промывание проводили 0,1 ммоль Gd-DTPA (Schering AG) с 20 мл 0,9% NaCl (скорость потока 4 мл/с). Внутривенно инъецировали 0,1 ммоль/кг раствора Magnevist после внутривенной перфузии, через 5 минут внутривенно инъецировали 0,2 ммоль/кг комплекса гадолиния с диэтилентриаминпентауксусной кислотой (Gd-DTPA), и затем непосредственно делали фотографии с использованием усиленной МРТ. Для проведения взвешивания T1 использовали инверсионное извлечение последовательности световых вспышек (PSIR). PSIR использовали для коррекции T1. Типичные параметры изображения были следующие: TR=700 мс, TE=4,8 мс, BW=130 кГц, плоскостное разрешение=1,8×1,3 мм, матрица изображения=156×256, SL=8 мм. Повторную съемку всех изображений, полученных с помощью динамической МРТ и усиленной МРТ, проводили через 6 недель после трансплантации стволовых клеток. Обеспечивали получение срезов по короткой оси в соответствии с первоначально снятыми исходными изображениями, в соответствии с анатомическим распределением по областям. Кроме того, для обеспечения контроля без патологических изменений исследовали 5 ложно оперированных животных с использованием той же структуры эксперимента с использованием МРТ.

Однофотонная эмиссионная компьютерная томография (SPECT)

Однофотонную эмиссионную компьютерную томографию миокарда проводили через одну и шесть недель после трансплантации клеток для выявления зоны дефекта перфузии миокарда. Через 40-60 минут после внутривенной инъекции 296 МБк (8 мКи) Tc-метоксиизобутилизонитрила, с помощью γ камеры проводили SPECT миокарда с

использованием низкоэнергетической γ камеры с двумя головками (Varicum, GE) с коллиматором высокого разрешения с 20% энергетическими окнами, установленными на γ пик 140 КЭВ. Получали 32 изображения по 40 с в каждой рамке, получали матрицу 64×64, диапазон проекций от правой передней косо́й под 45° ~ до левой задней косо́й под 45°, всего 180°. СPECT реконструировали низкочастотным полостным фильтром Butterworth, частота отсечки составляла 0,45, тип 5, путем коррекции сердечной оси для реконструкции данных изображений по короткой оси, по вертикальной длинной оси и по горизонтальной длинной оси, в трехосной плоскости. Зону дефекта перфузии рассчитывали с использованием методик видеоанимации флэш-метода.

Гистологический анализ

Для выявления способности трансплантированных мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, дифференцироваться в кардиомиоциты и клетки сосудов, замороженные срезы сердечной ткани анализировали флюоресцентным иммунным анализом полученных серийных срезов толщиной 5 мкм. Антитела для выявления включали: антитела к сосудистому эндотелиальному клеточно-специфичному фактору (VWF 1:50, DAKO), α -гладкомышечному актину (SM-актину, 1:50, DAKO), α -скелетномышечному актину (1:50, DAKO), сердечному тропонину Т (сTn-Т, 1:50, Sigma), коннексину 43 (1:50, Sigma). После споласкивания срезов PBS их инкубировали с меченым родамином или изотиоцианатом флюоресцеина козым анти-мышинным (GAM) или кроличьим IgG. Наконец, делали снимки лазерным сканирующим конфокальным микроскопом.

Для определения выживания и способности к дифференциации *in vivo* трансплантированных мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, миокард левого желудочка разрезали на 8 кусочков от верхушки до дна, и случайным методом выбирали 5 замороженных срезов толщиной 5 мкм каждого кусочка. Под флюоресцентным микроскопом исследовали 5 выбранных случайным методом горизонтальных плоскостей каждого из замороженных срезов для подсчета DAPI- и сTn-Т-позитивных клеток. сTn-Т-позитивные клетки считались готовыми к дифференциации в кардиомиоциты. Случайным методом выбирали 5 срезов в зоне инфаркта для выявления интенсивности межклеточного окрашивания коннексина 43 и анализировали с использованием системы анализа изображений.

Выявляли плотность капиллярной сети в зоне инфаркта и окружающих зонах с использованием способа подготовки ткани, описанного в публикации Weidner N., Semple J.P., Welch W.R., Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma (N Engl J Med 1991; 324: 1-8) [PMID: 1701519]. Срезы окрашивали антителом к VWF (1:200, DAKO). Выбирали соответственно 5 и 8 срезов из зон инфаркта и окружающих тканей каждого экспериментального животного, срезы анализировал штат исследователей, которые не участвовали в обработке клеток, для подсчета кровеносных сосудов с положительным окрашиванием. Для расчета в каждом срезе выбирали 5 полей с высоким оптическим усилением, результаты представляли в виде числа капилляров в каждом поле с высоким оптическим усилением.

Мечение «ник»-конца, опосредованное дезоксиуклеотидил-трансферазой (dUTP) дезоксиуридин-трифосфата (TUNEL) для выявления апоптоза

Заявители использовали анализ TUNEL (Rochhe, Germany) для выявления клеточного апоптоза в ткани миокарда. В конце эксперимента заявители получали у всех животных срезы вокруг зоны пораженной инфарктом ткани, залитые в парафин

срезы депарафинизировали трипсинизацией, инкубировали с меченной dUTP концевой дезоксинуклеотидил-трансферазой (TdT) и флюоресцеином при 37°C во влажной камере в течение 60 минут. Затем инкубировали со специфичным к щелочной фосфатазе антителом, сопряженно связанным с гидрофлюоресцеином в течение 30 минут; 3,3-диаминобензидин (DAB) использовали для цветного окрашивания для анализа TUNEL, содержащие ядра сегменты разрушенной ДНК окрашивались в синий цвет. Для выявления соотношения апоптозных ядер в срезах срезы ткани подвергали противоокрашиванию кардиоспецифическим моноклональным антителом к десмину (1:100, DAKO), срезы ткани осматривали под микроскопом при увеличении в 400 раз, подсчитывали более чем 100 кардиоцитов, по меньшей мере, в восьми полях с высоким оптическим усилением; индекс апоптоза относится к процентной доле числа апоптотических клеток миокарда от общего числа кардиоцитов в поле зрения.

Активность антиоксидантных ферментов и пероксиды липидов

Для выявления уровня окислительного стресса при инфаркте миокарда заявители получали ткань миокарда, окружающую зону инфаркта, в конце эксперимента, выявляли супероксид-дисмутазу способом с использованием ксантиноксидазы (Nanjing Jiancheng Company); пероксиды липидов были выражены в виде уровня MDA в миокарде, выявленного способом с использованием тиобарбитуровой кислоты (Nanjing Jiancheng Company).

Статистический анализ

Непрерывные переменные величины выражали в виде средней \pm стандартное отклонение, критерии хи-квадрат (χ^2) использовали для анализа частоты различий между третьей и четвертой группой. После выполнения теста однородности дисперсии и нормальности проводили анализ дисперсии для определения отличия каждой группы на каждой фазе (исходный уровень тестировали через одну неделю после трансплантации, через шесть недель после трансплантации происходило итоговое выявление); анализировали данные через 6 недель после трансплантации, сравнивали с данными через одну неделю после трансплантации. Сравнивали различные параметры в двух группах по минимальному значимому различию (LSD). Данные корректировали способом Бонферрони; различие считалось высоко значимым при $P < 0,05$. Все данные анализировали с использованием программного обеспечения SPSS13.0.

Результаты

Перед успешным сбором всех параметров погибло по одному животному соответственно в контрольной группе, второй группе и третьей группе; данные по погибшим животным не были включены в статистический анализ.

Гистологический анализ

Через 6 недель после трансплантации клеток окрашивание HE показало, что в контрольной группе инфаркт вызвал тяжелый фиброз с хронической инфильтрацией воспалительными клетками, редкое выживание клеток миокарда; во второй и третьей группах ситуация была аналогичной. В отличие от этого в четвертой группе был обнаружен незначительный фиброз и инфильтрация воспалительными клетками, и отмечено некоторое выживание клеток миокарда при инфаркте (фиг. 1).

В четвертой группе наблюдалось очевидно большее количество позитивных клеток, меченных DAPI, чем в третьей группе ($308,9 \pm 88,2$, в сравнении с $73,2 \pm 21,3$, $P < 0,0001$)(фиг. 2A-B).

Через 6 недель после трансплантации анализ иммунофлюоресценции в третьей и четвертой группах показал, что позитивные клетки, меченные DAPI, экспрессировали специфические для миокарда и специфические для микрососудов белки, включая α -

актин скелетных мышц, сердечный тропонин Т, фактор фон Виллебранда и актин сосудистой гладкой мускулатуры, указывая на то, что части имплантированных мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, дифференцировались в сердечную мышцу и микрососуды (фиг. 3А-С). В частности, в четвертой группе частота дифференциации имплантированных мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, была значительно выше, чем в третьей группе ($45,8 \pm 5,1\%$, в сравнении с $8,7 \pm 2,4\%$, $P < 0,0001$) (фиг. 3D).

Кроме того, межклеточное соединение позитивных клеток, меченных DAPI в зонах инфаркта, исследовали путем выявления экспрессии коннексина 43. Результаты показали, что экспрессия коннексина 43 в четвертой группе была значительно больше, чем его экспрессия в третьей группе ($16,1 \pm 1,4$, в сравнении с $4,7 \pm 1,8$, $P < 0,0001$) (фиг. 4А-В).

Плотность капиллярной сети

Плотность капиллярной сети в зонах инфаркта и в пограничных зонах определяли в соответствии с иммуногистохимическим окрашиванием VWF антител; не было значимого различия плотности капиллярной сети контрольной группы по сравнению со второй группой и третьей группой ($1,8 \pm 0,5$ /HPF (на поле с высоким оптическим усилением), в сравнении с $2,0 \pm 0,6$, в сравнении с $1,8 \pm 0,8$, $P > 0,05$). Однако по сравнению с третьей группой плотность капиллярной сети в зоне инфаркта в четвертой группе увеличилась на 105% ($3,7 \pm 1,0$ /HPF, $P < 0,0001$). Плотность капиллярной сети в зоне, граничащей с зоной инфаркта, в четвертой группе составляла $8,9 \pm 1,9$ /HPF, что было значительно выше, чем в других трех группах ($4,9 \pm 1,3$ /HPF, $5,1 \pm 0,9$, $5,2 \pm 1,4$, $P < 0,0001$) (фиг. 5).

Магнитно-резонансная визуализация и однофотонная эмиссионная компьютерная томография

Для анализа из каждой группы были выбраны 36 сегментов, подсчитывали число сегментов с расстройствами движения для расчета частоты утолщения стенки. Через одну неделю после трансплантации число сегментов с расстройствами движения из 36 выбранных сегментов составило в контрольной группе, второй группе, третьей группе и четвертой группе соответственно $8,2 \pm 3,0$; $8,3 \pm 3,1$; $8,7 \pm 3,9$ и $8,9 \pm 3,6$, что составляет соответственно 22,8%, 23,1%, 24,2% и 24,7% общего числа; между группами не было статистически значимого различия ($P = 0,983$). Все сегменты с нарушениями движения использовали для измерения частоты регионального утолщения стенки. Через одну неделю после трансплантации среди 4 групп не было статистически значимого различия между другими параметрами, включая частоту регионального утолщения стенки ($P = 0,915$), фракцию изгнания левого желудочка (LVEF, $P = 0,996$), размер зоны инфаркта ($P = 0,991$), конечнодиастолический объем левого желудочка (EDV, $P = 0,852$), конечносистолический объем левого желудочка (ESV, $P = 0,990$), индекс массы левого желудочка (LVmass index, $P = 0,791$). Через 6 недель после трансплантации параметры сердечной функции в четвертой группе, за исключением EDV и ESV, значительно улучшились ($P < 0,0001$) по сравнению с контрольной группой. Показатели функции левого желудочка и изменения желудочковой геометрии представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результаты исследования с помощью МРТ желудочковой функции и структуры через одну и шесть недель после трансплантации

5	группа	1		2		3		4	
		исходный уровень	исход	исходный уровень	исход	исходный уровень	исход	исходный уровень	исход
	LVEF (%)	42.6±7.9	43.9±7.6	43.3±7.9	44.8±8.5	43.5±10.0	45.7±9.6#	42.7±7.6*	50.0±10.1
10									##
	EDV (мл)	57.8±5.8	66.2±6.8	58.2±5.8	65.8±5.6	56.8±6.9	63.5±6.3#	55.1±8.2*	64.6±7.5
									**
	ESV (мл)	33.5±7.6	37.3±7.5	33.3±7.7	36.7±8.3	32.7±9.6	35.0±9.5#	32.1±9.2*	32.8±10.1
15									**
	Дискинетические сегменты	8.2±3.0	7.7±2.4	8.3±3.0	7.5±2.3	8.7±3.9	7.8±3.4#	8.9±3.6*	4.9±1.8
									##
	и толщина стенки (%)	-25.5±17.	-27.5±15.	-27.2±15.	-25.7±14.	-23.0±14.	-20.2±12.	-25.9±14.	35.9±10.8
20		2	7	6	0	5	8#	1*	##
	размер зоны инфаркта (см ²)	6.6±2.0	6.7±2.1	7.0±2.2	7.1±2.3	6.8±2.1	7.0±2.1#	6.5±2.3*	3.3±1.8
									##
	индекс массы LV (г/м ²)	64.7±6.3	77.8±8.1	63.2±8.1	76.2±8.1	60.2±7.9	76.0±5.4#	60.8±4.*	66.4±8.1
25									##

Исходный уровень представляет одну неделю после трансплантации, исход относится к шести неделям после трансплантации; LVEF представляет фракцию изгнания левого желудочка; EDV представляет конечнодиастолический объем левого желудочка; ESV представляет конечносистолический объем левого желудочка; дискинетические сегменты; толщина стенки (%); размер зоны инфаркта; индекс массы левого желудочка (LV mass index);

*P>0,05 (сравнение между четырьмя группами через одну неделю после трансплантации); #P>0,05 (контрольная группа в сравнении со второй группой через 6 недель после трансплантации);

**P>0,05 (конечнодиастолический объем и конечносистолический объем во второй группе и третьей группе через 6 недель после трансплантации по сравнению с таковыми в контрольной группе);

##P<0,0001 (вторая группа и третья группа по сравнению с контрольной группой через 6 недель после трансплантации).

На фиг. 6 представлены типичные изображения, полученные СПЕКТ, для выявления зоны дефекта перфузии через одну и шесть недель после трансплантации.

Результаты СПЕКТ исходной первой недели после трансплантации показали, что не было значимого различия среди четырех групп (соответственно 50,7±14,5%, в сравнении с 52,7±15,5%, в сравнении с 51,8±16,5%, в сравнении с 49,4±16,0%, P=0,984).

Через 6 недель после трансплантации результаты СПЕКТ исхода эксперимента показали, что средний размер области дефекта перфузии в контрольной группе, второй группе и третьей группе составил 47,8±11,1%, 50,7±12,5%, 47,3±13,2% (n=6, P=0,899), тогда как средняя площадь дефектов перфузии в четвертой группе составила 22,1±9,3%, которая значимо уменьшилась по сравнению с первыми тремя

группами (n=7, P<0,0001).

Клеточный апоптоз вокруг миокарда, пораженного инфарктом

Путем окрашивания клеток миокарда белками, связывающими специфический маркер, сопровождаемого концевой меткой ДНК, было установлено, что композиция по изобретению значительно снижала количество апоптотических клеток в зоне инфаркта левого желудочка, во второй группе и четвертой группе, по сравнению с их количеством в контрольной группе (апоптозный индекс $6,1 \pm 1,4$; $2,4 \pm 0,9$, по сравнению с $10,1 \pm 1,8$, P<0,0001), и также апоптозный индекс в четвертой группе был статистически значимо меньше, чем во второй группе (P<0,0001). Однако апоптозный индекс в третьей группе не проявил значимого различия по сравнению с контрольной группой (P=0,289) (фиг. 7).

Оценка уровня окислительного стресса

В конце эксперимента величины активности SOD (супероксиддисмутаза) на периферии зоны инфаркта во второй группе и четвертой группе были значительно выше, чем в контрольной группе ($98,7 \pm 9,8$; $105,1 \pm 7,0$ к $83,4 \pm 8,8$ ЕД/мг белка, P<0,05); это показало, что в группе, получавшей лечение лекарственным средством по изобретению, могла быть усилена акцепторная активность «тушения» свободных радикалов; однако между третьей группой и контрольной группой не было статистически значимого различия ($87,4 \pm 10,2$ ЕД/мг белка, P=0,449). По сравнению с соответствующими уровнями MDA в зоне инфаркта миокарда, во второй группе и в четвертой группе уровни были значительно снижены ($6,1 \pm 0,7$, $6,0 \pm 0,6$, в сравнении с $9,0 \pm 0,8$ нмоль/мг белка, P<0,05), указывая на то, что лекарственное средство по изобретению могло значительно снизить перекисное окисление липидов и повреждение клеток, вызванное им; не было статистически значимого различия между контрольной группой и третьей группой ($8,5 \pm 0,8$ нмоль/мг белка, P=0,195) (фиг. 8).

Обсуждение

Результаты эксперимента показали, что: (1) инъекция мезенхимальных стволовых клеток, полученных из аутологичного костного мозга, непосредственно после острого инфаркта миокарда/реперфузии не влияла на ограниченное выживание и способность к дифференциации трансплантированных клеток и не способствовала значимому улучшению сердечной функции; (2) применение низкой дозы лекарственного средства по настоящему изобретению в течение короткого периода времени также не окажет значительного благоприятного воздействия на сердечную функцию, однако на основании применения лекарственного средства по настоящему изобретению инъекция мезенхимальных стволовых клеток, полученных из аутологичного костного мозга, непосредственно после острого инфаркта миокарда/реперфузии значимо увеличивала выживание и способность к дифференциации трансплантированных клеток, по сравнению с группой, которой только трансплантировали клетки *in vivo*. Кроме того, лекарственное средство по настоящему изобретению в комбинации с трансплантацией стволовых клеток может также уменьшить размер зоны инфаркта, способствовать ангиогенезу, улучшить сердечную функцию и устранить перестройку желудочковой ткани.

Наиболее важными данными этого эксперимента является то, что на основании кратковременного лечения низкой дозой композиции по изобретению инъекция мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, в миокард непосредственно после острого инфаркта миокарда и реперфузии *in vivo* значительно больше увеличила выживание и способность к дифференциации имплантированных клеток, чем в группе, которой только имплантировали мезенхимальных стволовых

клеток, полученных из костного мозга, и в то же время также значительно улучшала сердечную функцию. Это свидетельствует о том, что трансплантация, выживание и дифференциация стволовых клеток проявляет выраженную зависимость от микросреды миокарда после острого инфаркта.

5 Этот эксперимент показал, что лекарственное средство и трансплантация мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, значительно улучшили выживание и дифференциацию клеток по сравнению с группой, получавшей только мезенхимальные стволовые клетки, полученные из костного мозга. Кроме
10 того, применение только низких доз композиции по настоящему изобретению не вызывало значимого улучшения сердечной функции. На основании описанных выше результатов можно сделать вывод, что улучшение региональной микросреды с помощью лекарственного средства по изобретению после острого инфаркта миокарда повышает выживаемость и биологическую активность имплантированных клеток.
15 Несмотря на то, что отдельное применение низкой дозы лекарственного средства по изобретению не оказывало значимых эффектов, оно может значительно повысить выживание и дифференциацию имплантированных мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга. Результаты экспериментов показали, что
20 кратковременное применение низкой дозы лекарственного препарата по изобретению может содействовать кардиомиопластике имплантацией мезенхимальных стволовых клеток из аутологичного костного мозга. Выявление профилей генной экспрессии после инфаркта миокарда с помощью технологии генных микрочипов показало, что отдельное применение низкой дозы лекарственного средства по изобретению может
25 привести к положительным изменениям генной экспрессии, включая стимулирующую регуляцию противовоспалительных, противоапоптозных и противofiброзных генов (данные не представлены). На основании описанных выше исследований авторы считают, что применение низкой дозы лекарственного средства по изобретению после
30 острого инфаркта миокарда в течение короткого периода времени может улучшить региональную микросреду миокарда после острого инфаркта, с тем чтобы обеспечить устойчивое выживание и дифференциацию имплантированных мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга.

Резюмируя изложенное, можно утверждать, что авторы впервые обнаружили, что
35 применение низкой дозы лекарственного средства по изобретению в течение короткого периода времени может эффективно улучшить региональную микросреду после острого инфаркта миокарда, содействовать клеточной кардиомиопластике путем имплантации мезенхимальных стволовых клеток, полученных из аутологичного
40 костного мозга, и это имеет значение для клинического применения трансплантации стромальных стволовых клеток костного мозга.

Формула изобретения

1. Применение традиционной китайской лекарственной композиции для получения
45 лекарственного препарата для промотирования выживания полученных из костного мозга мезенхимальных стволовых клеток *in vivo* и дифференциации в кардиомиоциты, отличающееся тем, что традиционная китайская лекарственная композиция получена из следующих неочищенных лекарственных средств, мас.ч.:

50	женьшень	3-10
	пиявка	3-11
	жужелица	5-10
	ладанное дерево (обработанное)	1-5

	корень красного пиона	3-9
	сердцевина дальбергии	1-5
	сандаловое дерево	1-5
	скорпион	3-9
5	сброшенная кутикула цикады	3-12
	многоножка	1-3
	борнеол	1-7
	семена зизифуса (печенные при перемешивании)	3-10

10 где активные ингредиенты традиционной китайской лекарственной композиции состоят из следующих ингредиентов:

а. скорпион, пиявка, многоножка, жужелица, сброшенная кутикула цикады и порошок обработанного ладанного дерева, который имеет средний размер частиц менее чем 100 мкм;

15 б. порошок борнеола;

с. летучие масла, экстрагированные из сердцевины дальбергии и сандалового дерева;

d. конденсированный спиртовой экстракт женьшеня, экстрагированный этанолом;

20 е. конденсированный водный экстракт, который получен следующим образом:

экстрагирование остатка сердцевины дальбергии и сандалового дерева водой после экстрагирования из них компонента (с), вываривание корня красного пиона и печенных при перемешивании семян зизифуса в воде, экстрагирование остатка женьшеня водой после экстрагирования из него компонента (d), фильтрация всех 25 указанных выше экстрактов, их смешивание, затем концентрирование.

2. Применение по п.1, где традиционная китайская лекарственная композиция получена из следующих неочищенных лекарственных средств, мас.ч.:

	женьшень	6
30	пиявка	10
	жужелица	7
	ладанное дерево (обработанное)	2
	корень красного пиона	5
	сердцевина дальбергии	2
35	сандаловое дерево	2
	скорпион	7
	сброшенная кутикула цикады	7
	многоножка	1
	борнеол	5
40	семена зизифуса (печенные при перемешивании)	5.

3. Применение по п.1, где традиционная китайская лекарственная композиция получена из следующих неочищенных лекарственных средств, мас.ч.:

	женьшень	10
45	пиявка	8
	жужелица	7
	ладанное дерево (обработанное)	2
	корень красного пиона	5
	сердцевина дальбергии	2
50	сандаловое дерево	2
	скорпион	9
	сброшенная кутикула цикады	7
	многоножка	1
	борнеол	5

семена зизифуса (печенные при перемешивании) 5.

4. Применение по п.1, где традиционная китайская лекарственная композиция получена из следующих неочищенных лекарственных средств, мас.ч.:

5	женьшень	6
	пиявка	11
	жужелица	7
	ладанное дерево (обработанное)	2
10	корень красного пиона	5
	сердцевина дальбергии	2
	сандаловое дерево	2
	скорпион	3
	сброшенная кутикула цикады	7
	многоножка	1
15	борнеол	5
	семена зизифуса (печенные при перемешивании)	5.

5. Применение по п.1, где традиционная китайская лекарственная композиция получена из следующих неочищенных лекарственных средств, мас.ч.:

20	женьшень	5,5
	пиявка	10,375
	жужелица	6,875
	ладанное дерево (обработанное)	2,25
25	корень красного пиона	4,75
	сердцевина дальбергии	2,375
	сандаловое дерево	2,25
	скорпион	6,875
	сброшенная кутикула цикады	6,875
	многоножка	1,375
30	борнеол	1,375
	семена зизифуса (печенные при перемешивании)	4,625.

6. Применение традиционной китайской лекарственной композиции для получения лекарственного препарата для промотирования выживания *in vivo* и дифференциации мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, где лекарственный препарат содержит традиционную китайскую лекарственную композицию, определенную в любом из пп.1-5, в качестве активного компонента и представляет собой капсулу, таблетку, пилюлю, пероральную жидкую лекарственную форму, мягкую капсулу или гомеопатический шарик, насыщенный жидкой лекарственной формой.

7. Применение по любому из пп.1-5, отличающееся тем, что традиционная китайская лекарственная композиция применяется для получения лекарственного препарата для лечения сердечно-сосудистых заболеваний мезенхимальными стволовыми клетками, полученными из аутологичного костного мозга.

8. Применение по п.7, где сердечно-сосудистое заболевание представляет собой инфаркт миокарда.

9. Применение по п.7, где сердечно-сосудистое заболевание представляет собой острый инфаркт миокарда.

10. Традиционная китайская лекарственная композиция, определенная в любом из пп.1-5, которая промотирует выживание *in vivo* мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга, и их дифференциацию в кардиомиоциты.

11. Традиционная китайская лекарственная композиция, определенная в любом из пп.1-5, в комбинации с мезенхимальными стволовыми клетками, полученными из аутологичного костного мозга, для лечения сердечно-сосудистого заболевания.

5 12. Традиционная китайская лекарственная композиция по п.11, где сердечно-сосудистое заболевание представляет собой инфаркт миокарда, предпочтительно острый инфаркт миокарда.

13. Способ лечения или профилактики сердечно-сосудистого заболевания, включающий введение нуждающимся пациентам эффективного количества
10 традиционной китайской лекарственной композиции, определенной в любом из пп.1-6, и мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга.

14. Способ по п.13, где сердечно-сосудистое заболевание представляет собой инфаркт миокарда, предпочтительно острый инфаркт миокарда.

15 15. Способ по п.13, где мезенхимальные стволовые клетки, полученные из костного мозга, представляют собой мезенхимальные стволовые клетки, полученные из аутологичного костного мозга.

20

25

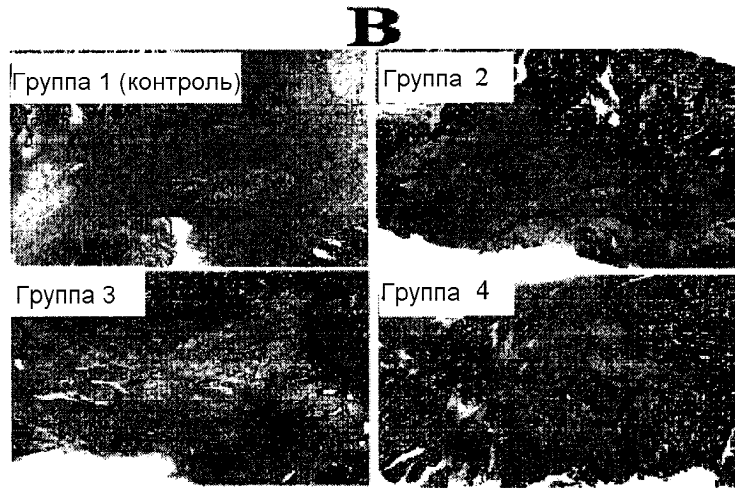
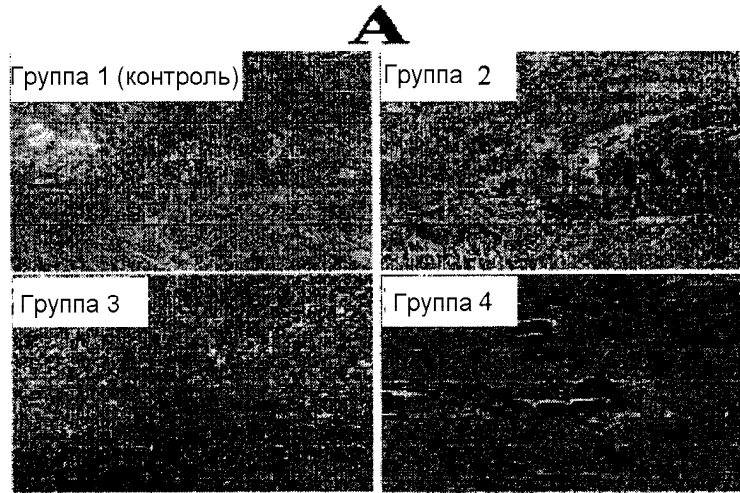
30

35

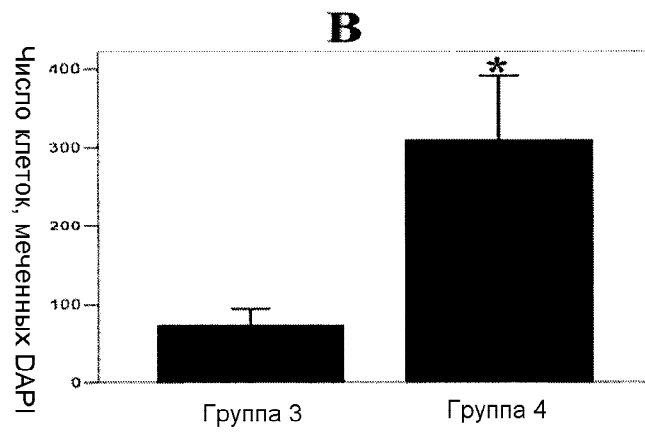
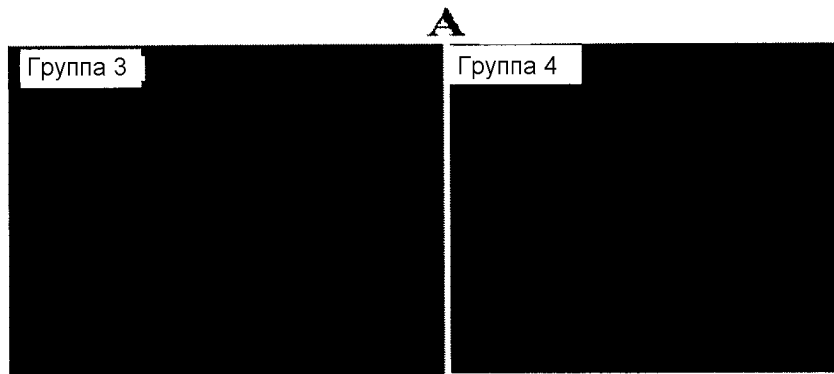
40

45

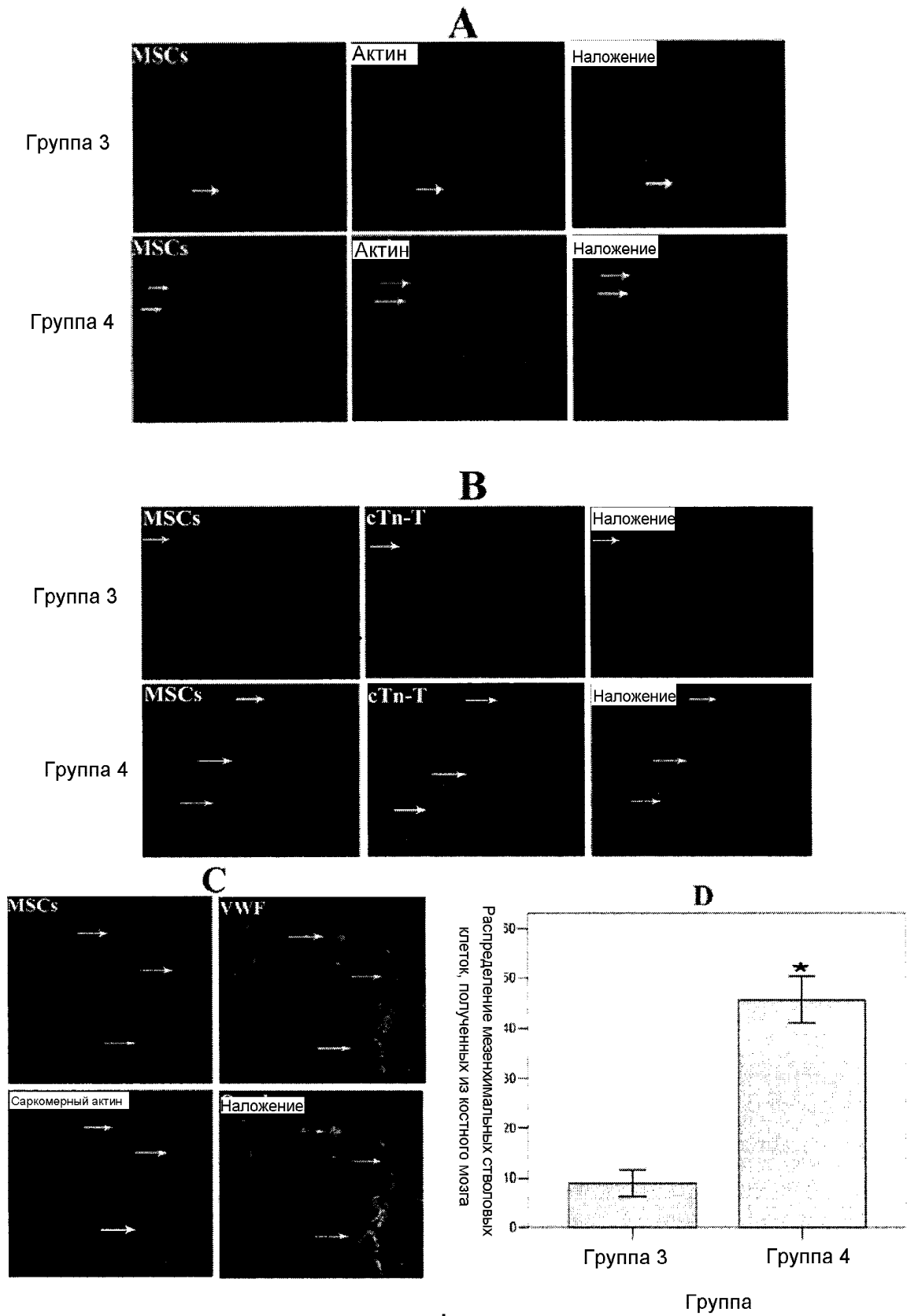
50



ФИГ. 1

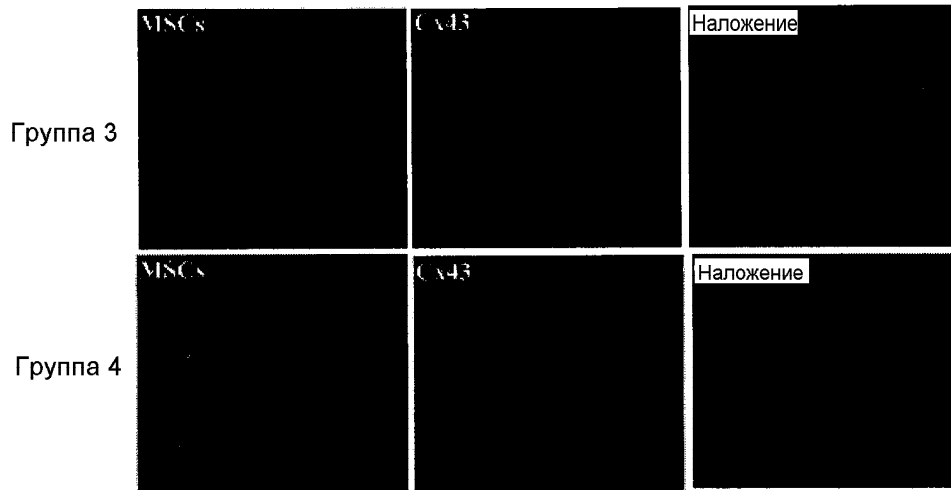


ФИГ. 2

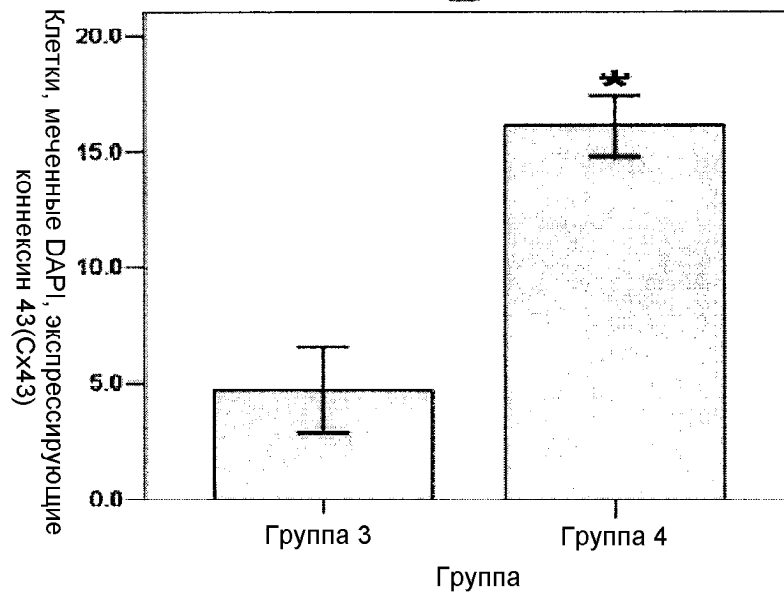


ФИГ. 3

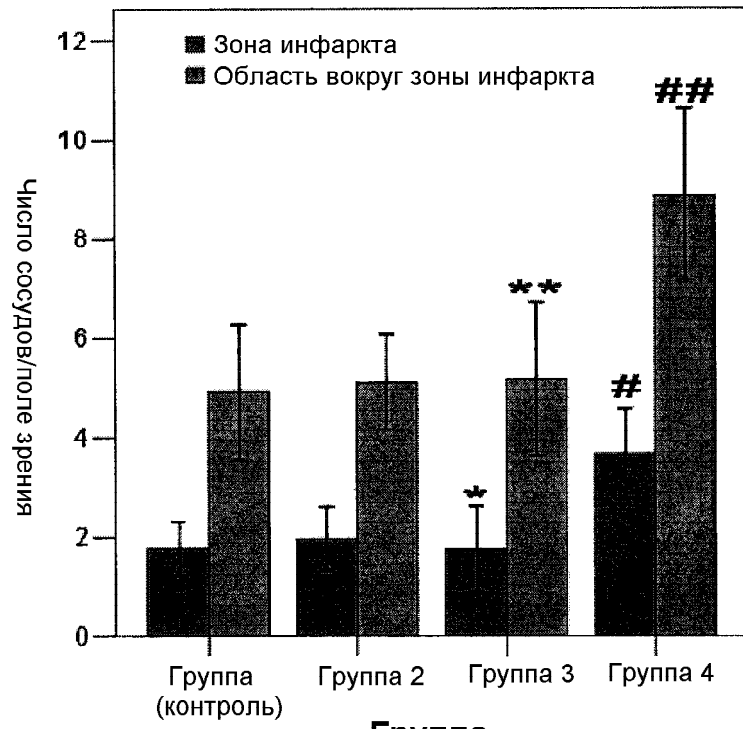
A



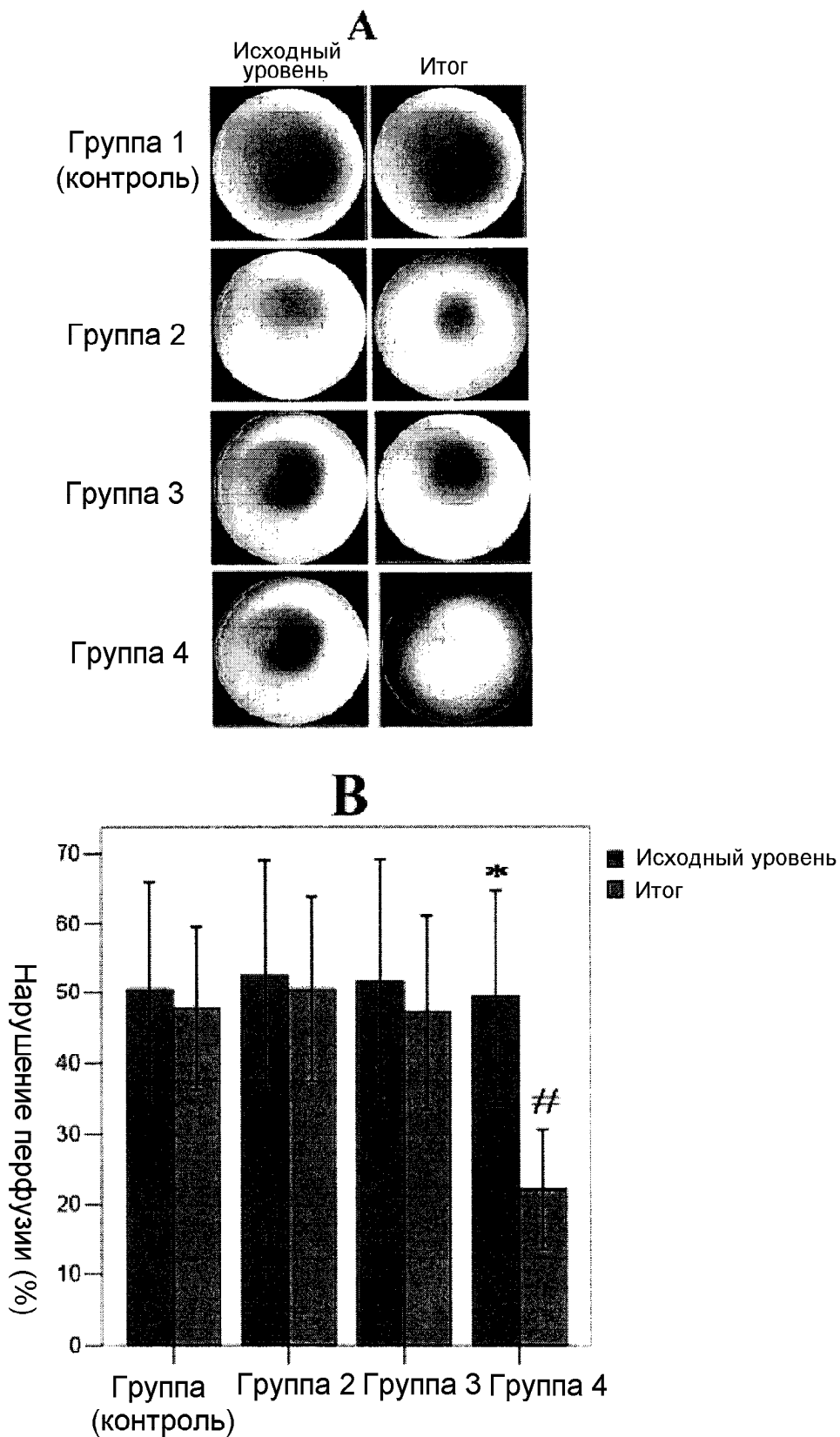
B



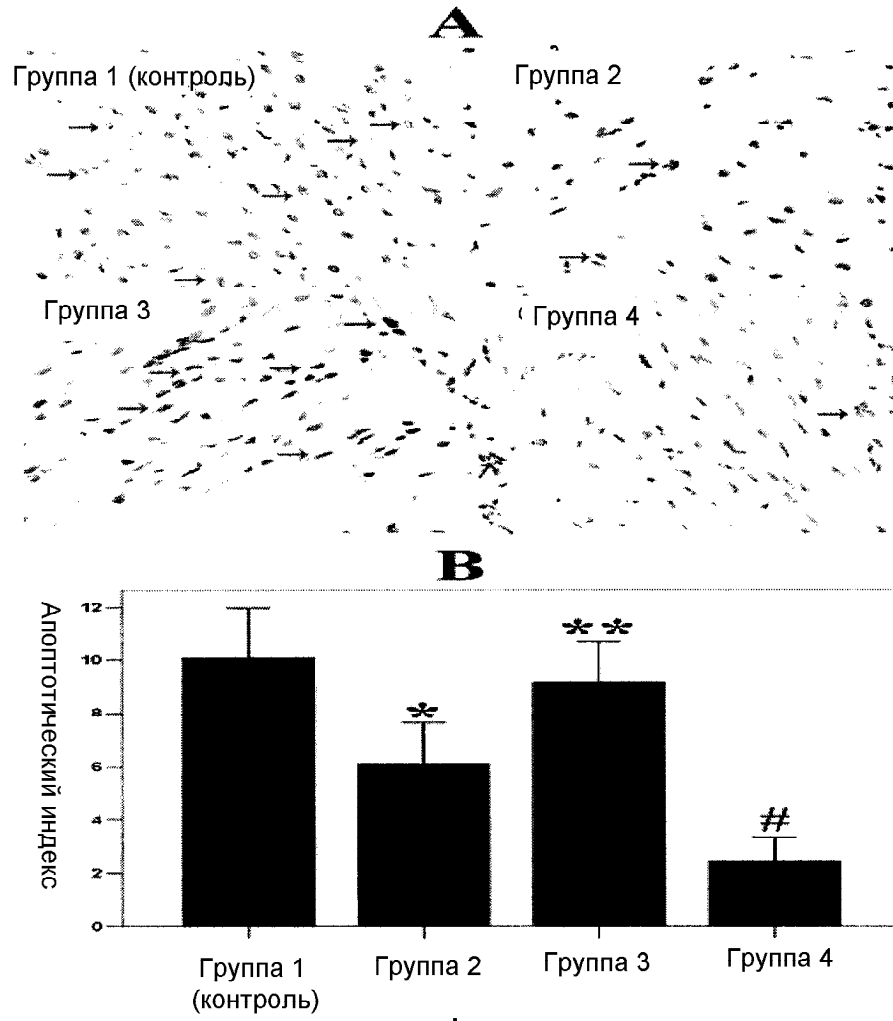
ФИГ. 4



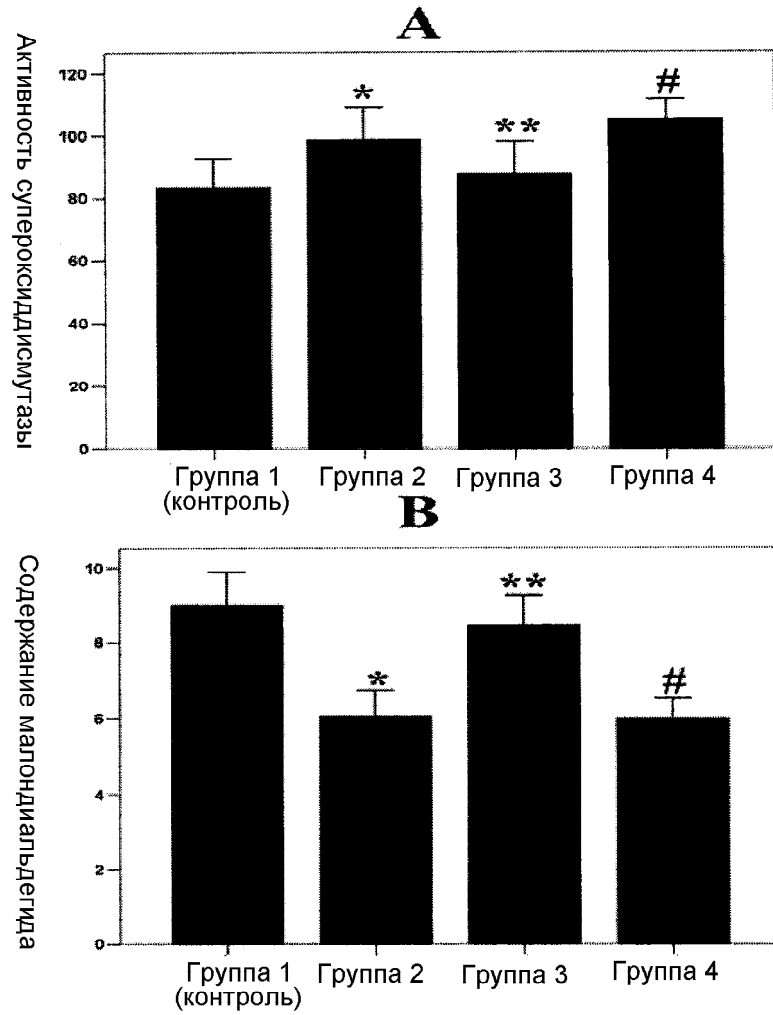
Группа
Фиг. 5



ФИГ.6



Фиг. 7



Группа
Фиг. 8