



(51) МПК
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61P 1/16 (2006.01)
G09B 23/28 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

A61K 31/7105 (2021.01); A61K 35/28 (2021.01); A61P 1/16 (2021.01); G09B 23/28 (2021.01)

(21)(22) Заявка: 2020119914, 16.06.2020

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
16.06.2020

Дата регистрации:
16.03.2021

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 16.06.2020

(45) Опубликовано: 16.03.2021 Бюл. № 8

Адрес для переписки:

123182, Москва, ул. Щукинская, 1, ФГБУ
 "НМИЦ ТИО им. ак. В.И. Шумакова"
 Минздрава России, отдел координации и
 мониторинга научных программ

(72) Автор(ы):

Онищенко Нина Андреевна (RU),
 Никольская Алла Олеговна (RU),
 Гоникова Залина Залимгериевна (RU),
 Шагидулин Мурат Юнусович (RU),
 Кирсанова Людмила Анфилофьевна (RU),
 Севастьянов Виктор Иванович (RU)

(73) Патентообладатель(и):

Федеральное государственное бюджетное
 учреждение "Национальный медицинский
 исследовательский центр трансплантологии
 и искусственных органов имени академика
 В.И. Шумакова" Министерства
 здравоохранения Российской Федерации
 (ФГБУ "НМИЦ ТИО им. ак. В.И.
 Шумакова" Минздрава России) (RU)

(56) Список документов, цитированных в отчете
 о поиске: RU 2739996 C1, 30.12.2020. RU
 2701792 C1, 01.10.2019. ГОНИКОВА З.З.
 Исследование регенераторной активности
 общей РНК клеток костного мозга на
 экспериментальных моделях печеночной
 недостаточности. Диссер. Москва 2019, стр.1-
 118. РУДАКОВ В.С. Влияние
 мультипотентных мезенхимальных
 стромальных клеток на регенерацию печени
 после ее обширной резекции. (см. прод.)

(54) Способ лечения острой печёночной недостаточности

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине, а именно к гепатологии, и может быть использовано для лечения острой печеночной недостаточности (ОПН) в эксперименте, после хирургической операции, в результате которой формируется критический дефицит функционирующей ткани печени. Получают несортированную фракцию мононуклеарных клеток костного мозга (ККМ) от крысы-донора и хранят в растворе «Кустодиол» при температуре 4-6°C в течение 3-

18 часов. После чего из нее получают общую РНК (oРНК) и вводят однократно внутривентриально интраоперационно экспериментальному животному - крысе после выполнения хирургической операции, в дозе 90-110 мкг/100 г веса животного. Способ обеспечивает возможность ускорения темпа, надежности и результативности лечения тяжелых и крайне тяжелых форм ОПН, развивающихся после хирургического иссечения критических объемов

ткани печени, за счет повышения активности индукционного и регуляторного воздействия оРНК из свежесыводенных ККМ на процессы

репаративной регенерации печени. 1 з.п. ф-лы, 2 ил., 4 табл.

(56) (продолжение):

Автореф. диссер. Москва 2017, стр.1-24. ВAI Н. et al. Comprehensive analysis of lncRNA-miRNA-mRNA during proliferative phase of rat liver regeneration. J Cell Physiol. 2019, 234(10), p.18897-18905. YAN I.K. et al. Circulating Extracellular RNA Markers of Liver Regeneration. PLoS One. 2016, 11(7), e0155888.

R U
2 7 4 4 8 4 6
2 7 4 4 8 4 6
C 1

R U
2 7 4 4 8 4 6
C 1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 35/28 (2015.01)
A61P 1/16 (2006.01)
G09B 23/28 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

A61K 31/7105 (2021.01); A61K 35/28 (2021.01); A61P 1/16 (2021.01); G09B 23/28 (2021.01)(21)(22) Application: **2020119914, 16.06.2020**(24) Effective date for property rights:
16.06.2020Registration date:
16.03.2021

Priority:

(22) Date of filing: **16.06.2020**(45) Date of publication: **16.03.2021 Bull. № 8**

Mail address:

123182, Moskva, ul. Shchukinskaya, 1, FGBU
"NMITS TIO im. ak. V.I. Shumakova" Minzdrava
Rossii, otdel koordinatsii i monitoringa nauchnykh
programm

(72) Inventor(s):

**Onishchenko Nina Andreevna (RU),
Nikolskaya Alla Olegovna (RU),
Gonikova Zalina Zalimgerievna (RU),
Shagidulin Murat Yunusovich (RU),
Kirsanova Lyudmila Anfilofevna (RU),
Sevastyanov Viktor Ivanovich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Federalnoe gosudarstvennoe byudzhethnoe
uchrezhdenie "Natsionalnyj meditsinskij
issledovatel'skij tsentr transplantologii i
iskusstvennykh organov imeni akademika V.I.
Shumakova" Ministerstva zdravookhraneniya
Rossijskoj Federatsii (FGBU "NMITS TIO im.
ak. V.I. Shumakova" Minzdrava Rossii) (RU)**

(54) **METHOD OF TREATMENT OF ACUTE LIVER FAILURE**

(57) Abstract:

FIELD: medicine; hepatology.

SUBSTANCE: invention relates to medicine, namely to hepatology, and can be used for the treatment of acute liver failure (ARF) in an experiment, after a surgical operation, in the result of which a critical deficiency of functioning liver tissue is formed. An unsorted fraction of mononuclear bone marrow cells (BMC) is obtained from a donor rat and stored in a Custodiol solution at a temperature of 4-6 °C for 3-18 hours. After that, total RNA (oRNA) is obtained from it and entered at once intraperitoneally and

intraoperatively to an experimental animal - a rat after performing a surgical operation, at a dose of 90-110 mcg/100 g of animal weight.

EFFECT: method makes it possible to accelerate the rate, reliability and effectiveness of the treatment of severe and extremely severe forms of ARF that develop after surgical excision of critical volumes of liver tissue, by increasing the activity of the induction and regulatory effects of oRNA from freshly isolated BMC on the processes of reparative liver regeneration.

2 cl, 2 dwg, 4 tbl

Изобретение относится к медицине, а именно, к гепатологии, и может быть использовано для профилактики и лечения острой печеночной недостаточности (ОПН).

На протяжении последних десятилетий проблема эффективного лечения печеночной недостаточности остается нерешенной проблемой, т.к. летальность, как при острой, так и при хронической печеночной недостаточности, по-прежнему, остается на высоком уровне и не имеет тенденции к снижению. По данным ВОЗ смертность от ОПН, сопровождающейся обширным некрозом паренхимы, достигает 70-90% и более [Ивашкин В.Т., Уланова И.Н. /Преждевременная смертность в Российской Федерации и пути ее снижения. Стратегия «шесть в четырех». //Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, 2006, №1, с. 8-14], а после часто выполняемых в клинике операций обширной резекции печени, особенно при онкологических заболеваниях печени, смертность в раннем послеоперационном периоде достигает 7% [Л.П. Котельникова, И.М. Будянская /Профилактика и лечение осложнений после резекции печени.// Вестник хирургии им. И.И. Грекова, 2012; 171(3):67-71]. Указанные обстоятельства требуют продолжения поиска эффективных и доступных методов лечения ОПН.

Настоятельная необходимость разработки более эффективных способов лечения печеночной недостаточности диктуется также неутешительными прогнозами дальнейшего повышения заболеваемости по этой нозологии во всех странах мира в ближайшие 10-20 лет [Плеханов А.Н., Товаршинов А.И. /Современные подходы к диагностике и лечению печеночной недостаточности (обзор литературы). //Бюллетень ВСНЦ, 2016, том 1, вып. 4 (110), с. 136].

К настоящему времени стало очевидным, что трансплантация печени, будучи самым эффективным методом лечения острой и хронической печеночной недостаточности из-за дефицита донорских органов не может обеспечить всех нуждающихся в ней. Рассматривая высокую летальность при ОПН, как следствие нарушения процессов регенерации в поврежденной печени, надежду на повышение эффективности восстановительного лечения печени стали связывать с регенерационной медициной, основанной на применении клеточных биотехнологий.

Были предложены методы интенсивной терапии ОПН, основанные на применении экстрактов ткани печени, полученных либо от крыс с 70% резекцией, либо от неонатальных поросят [Э.И. Гальперин, Т.Г. Дюжева, Л.В. Платонова и др. Уменьшение повреждения печени при ее обширной резекции и токсическом повреждении //Анналы хирургической гепатологии, 2008, т. 13, №1, с. 51-55]. Однако при возможном клиническом применении экстрактов из нативных тканей всегда существует потенциальная опасность заражения пациента трансмиссивными инфекциями животных, а изготовление высокоэффективного медикаментозного препарата из экстракта животных тканей предполагает идентификацию химического переносчика биологических эффектов и выделение его из тканевого экстракта, чего авторами не было предпринято.

В последние годы стал известен новый биотехнологический способ лечения ОПН после обширной резекции печени (ОРП), который основан на имплантации в организм (брыжейку тонкой кишки) клеточно-инженерных конструкций, состоящих из сокультивированных аллогенных клеток печени и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга (ММСК КМ) в составе биополимерного гетерогенного коллагенсодержащего гидрогеля [M. Shagidulin, N. Onishchenko, M. Krashenninikov et al., Transplantation liver cells and multipotent mesenchymal stromal cells for correction and treatment of hepatic failure //Medimond. International Proceedings., 2010, P. 83-86]. Достоверно ускоренное восстановление функции печени авторы объясняют высоким

регенерационным потенциалом культивированных стволовых/прогениторных клеток, выделенных из костного мозга.

Между тем, внедрение в практику регенеративной медицины клеточных технологий пока не получило единодушного одобрения из-за опасности малигнизации и генетических мутаций трансплантированных стволовых/прогениторных клеток, из-за опасности развития реакции «трансплантат против хозяина» при трансплантации гемопоэтических стволовых клеток, а также из-за быстрой гибели или быстрого снижения активности как аутологичных, так и аллогенных клеток [A.C. Lyra, M.B. Soares, L.F. da Silva et al. / Infusion of autologous bone marrow mononuclear cells through hepatic artery results in a short-term improvement of liver function in patients with chronic liver disease: a pilot randomized controlled study. //European Journal of Gastroenterology & Hepatology.- 2010. - Vol. 22(1). - P. 33-42].

Альтернативой клинического применения биомедицинских клеточных продуктов в регенерационной медицине, включая клеточно - и тканеинженерные конструкции, могут стать технологии, основанные на применении выделенного из клеток костного мозга комплекса внутриклеточных биологически активных компонентов.

Вопрос о том, какие внутриклеточные структуры и сигнальные молекулы клеток костного мозга (ККМ) способны обеспечивать «адресный перенос регенерационной информации» к поврежденным органам долго не был предметом специальных исследований.

В последние годы, однако, появились исследования, из которых следует, что продуцентами и переносчиками регенерационной информации в межклеточной сигнальной системе выступают разнообразные по своим структурным и функциональным свойствам молекулы РНК [Н.В. Тишевская, А.Г. Бабаева, Н.М. Геворкян / Роль лимфоцитарных РНК в межклеточном информационном обмене и регуляции регенеративных процессов. // Российский Физиологический Журнал им. И.М. Сеченова. - 2016, - Т. 102. - вып. 11, С. 1280-1301; А.Г. Бабаева, Н.В. Тишевская, Н.М. Геворкян / О морфогенетических свойствах РНК лимфоидных и стволовых клеток при восстановительных процессах // Российская академия наук. - Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва. - 2016, 272 с].

Начиная с 2008 г. во всем мире проводятся интенсивные исследования свойств молекул малых белок некодирующих РНК - микроРНК, которые начали использовать не только в качестве биомаркеров, но и в качестве терапевтических средств регуляции восстановительных процессов при различных патологиях [D.P. Bartel / MicroRNAs: target recognition and regulatory functions // Cell.-2009. - Vol. - 136(2). - P. 215-233].

Однако, выделение какой-либо одной микро РНК с адресным эффектом для целей регенерационной терапии представляет собой сложный технологический процесс. Уже к 2015 году было идентифицировано свыше 1800 вне - и внутриклеточных микроРНК человека [S.M. Peterson, J.A. Thompson, M.L. Ufkin, P. Sthyanarayana, L. Liaw, C.B. Congdon / Common features of microRNA target prediction tools. // Frontiers in Genetics. - 2014.- Vol. - 5.- S.M. P23], причем функция большинства из них остается неизвестной. Кроме того, вызывает сомнение возможность индукции и осуществления эффективного регенерационного процесса в поврежденных органах с помощью какой-либо одной выделенной микро РНК, так как уже показано, что в процессах регенерации принимают участие разные классы молекул РНК [I.K. Yan, X. Wang, Y.W. Asmann, H. Haga, T. Patel / Circulating Extracellular RNA Markers of Liver Regeneration. // PLoS One.-2016.-Vol. 11(7)], в том числе разные классы белок некодирующих РНК, [J. Li, W. Jin, Y. Qin, W. Zhao, C. Chang, C. Xu / Expression Profile and Function Analysis of LncRNAs during Priming Phase of

Rat Liver Regeneration/ // PLoS One.-2016, Jun 21, Vol.-11(6); F. Mottaghitlab, A. Rastegari, M. Farokhi, R. Dinarvand, H Hosseinkhani et al Prospects of siRNA applications in regenerative medicine. // International Journal of Pharmaceutics. 2017 May 30. - Vol. - 524(1-2). - P. 312-329].

В последние годы стал известен биотехнологический способ индукции
5 восстановительных процессов в поврежденной печени с помощью общей РНК (оРНК) ММСК КМ [RU 2650209, C1], который, однако, был предназначен для лечения хронической печеночной недостаточности (ХПН), когда в печени уже сформированы все признаки ее хронического повреждения. Способ обеспечивает постепенное (в течение нескольких месяцев) восстановление структуры и функции поврежденных клеток, а
10 также восстановление гистологических характеристик ткани печени, которое достигается за счет многократного (по крайней мере, трехкратного) парентерального введения в организм оРНК, выделенной из предварительно культивированных в течение 3-4-х недель ММСК КМ здорового донора. В результате применения оРНК, выделенной из ММСК КМ, а не самих ММСК КМ, этот способ позволяет избежать развития известных
15 опасных осложнений, связанных с применением стволовых/прогениторных клеток костного мозга (малигнизация и мутация клеток). Кроме того, предложенный способ позволяет использовать только биологически активный комплекс этих клеток, содержащий в себе все типы РНК (в том числе все типы регуляторных белок - не кодирующих микро-РНК), что позволяет осуществлять непосредственный перенос
20 регенерационной информации клеткам хронически поврежденного органа - печени, индуцируя в них процесс эффективной репаративной регенерации.

Однако известный способ, предполагающий использование оРНК из ММСК КМ млекопитающих в качестве средства для коррекции печеночной недостаточности, не лишен недостатков, препятствующих его широкому и эффективному использованию
25 для лечения ОПН.

Прежде всего, указанный выше известный способ относится к лечению ХПН, вызванной хроническим токсическим повреждением печени. К недостаткам относится также сложность и длительность сроков выделения и получения достаточных количеств ММСК КМ из моноклеарной фракции клеток костного мозга, в которой эти клетки
30 составляют не более 0,5-1,5%.

Для выделения ММСК из моноклеарной фракции клеток костного мозга сначала проводят краткосрочное культивирование (3-4 суток), а затем путем длительного культивирования выделенных ММСК КМ в течение 3-4 недель проводят наращивание клеточной массы с применением дорогостоящих культуральных сред, что существенно
35 повышает себестоимость получения оРНК из ММСК КМ.

Кроме того, предложенная схема использования оРНК оказалась непригодной для лечения ОПН. Применение оРНК по известной схеме обеспечивает лишь постепенную (в течение нескольких месяцев) инволюцию и устранение признаков деструкции паренхиматозных и непаренхиматозных структур ткани печени, сформировавшихся в
40 процессе ее длительного хронического токсического повреждения. Между тем, для успешного лечения ОПН в клинике, особенно после субтотальной или обширной резекции, уже в первые часы послеоперационного периода необходимо обеспечить условия для устранения индуцированного операционным стрессом раннего и опасного ингибирования митотической и пролиферативной активности клеток в остатке печени.
45 Более того, требуется в первые-вторые сутки достигнуть раннего и максимально ускоренного темпа наращивания дополнительных количеств здоровых клеток в остатке здоровой ткани печени для быстрого преодоления дефицита ткани печени (ее критической массы) после операции, ускоренного восстановления печеночного

гомеостаза и предотвращения гибели пациента.

Известен способ коррекции ОПН в эксперименте после хирургической операции путем раннего применения оРНК из свежeweделенной несортированной моноклеарной фракции ККМ в дозе 30 мкг/100 г веса животного, введенной внутрибрюшинно однократно через 3-5 часов после завершения моделирования обширной резекции печени [З.З. Гоникова, А.О. Никольская, Л.А. Кирсанова, М.Ю. Шагидулин, Н.А. Онищенко, В.И. Севастьянов / Сравнительный анализ эффективности стимуляции процессов регенерации печени клетками костного мозга и общей РНК этих клеток // Вестник трансплантологии и искусственных органов, 2019, т. 21(1), С. 113-121]. Было показано, что применение оРНК из свежeweделенных моноклеарных ККМ способствует активизации восстановительных процессов в остатке печени после ОРП, причем эффект коррекции ОПН от применения оРНК из моноклеарных ККМ был более выраженным, чем от применения самих моноклеарных ККМ в эквивалентной дозе, и это, как полагают, обусловлено более высокой проникающей и регуляторной способностью оРНК как химического вещества.

Между тем, анализ эффективности регуляторного воздействия оРНК из свежeweделенных ККМ на восстановительные процессы в печени при ОПН показал, что эффект от однократного применения оРНК из свежeweделенных ККМ в указанной дозе недостаточен.

Известен способ лечения ОПН [RU 2701792, C1] путем двукратного применения оРНК из свежeweделенных моноклеарных ККМ в лечебной дозе оРНК 50-60 мкг/100 г веса животного в предоперационном периоде, а затем через 3-4 часа после операции (прототип). Обладая высокой регуляторной активностью и предотвращая развитие летальных исходов при моделировании обширной резекции печени (70-75% печени), способ-прототип не способствует предотвращению или снижению летальности при моделировании субтотальной резекции печени (85-90% печени).

Таким образом, несмотря на существующие достоинства применения оРНК из свежeweделенных моноклеарных ККМ при ОПН по сравнению с применением свежeweделенных моноклеарных ККМ, (отсутствие опасности возникновения мутаций и малигнизации, возможности развития реакции «трансплантат против хозяина», а также достоверно более высокая регуляторная активность) даже при двукратном применении свежeweделенной оРНК сохраняется неудовлетворенность результатами ее индукционного воздействия на процессы восстановительной регенерации в печени при моделировании тяжелых форм ОПН путем хирургического иссечения критических объемов ткани печени.

По современным представлениям недостаточная эффективность применения клеточных биотехнологий при тяжелых формах острых заболеваний печени может быть связана с возникающим в ткани печени истощением резервов активации собственных тканевых адаптационно - приспособительных механизмов, запускающих и регулирующих процесс восстановительной регенерации: например, в результате возникновения резкого дефицита печеночной ткани и возросшей функциональной нагрузки на оставшуюся ткань после обширной резекции печени при ОПН. Такое представление обосновывается тем, что индукция регенерационных процессов в печени, как и в других органах, всегда начинается с активации и использования собственных сохранившихся резервов, необходимых для защиты и выживания клеток, а именно с процессов клеточной аутофагии, развивающихся в рамках эволюционно выработанного неспецифического адаптационного синдрома клеточной системы для формирования энергетической, структурной и функциональной устойчивости клеток к действию

различных стрессорных факторов внешней и внутренней среды организма [А.Д. Браун, Г.П. Мозженок / Неспецифический адаптационный синдром клеточной системы //Л., Изд. Наука, 1987].

5 Аутофагия представляет собой процесс прижизненной утилизации измененного метаболитами содержимого цитоплазмы клеток для поддержания их структурного и энергетического гомеостаза. В настоящее время аутофагию рассматривают даже не как процесс «запрограммированного умирания», а как процесс преимущественно «запрограммированного выживания» клеток [М.П. Потапнев / Аутофагия, апоптоз, некроз клеток и иммунное распознавание своего и чужого // Иммунология, 2014, №2, 10 с. 95-102]. Аутофагия ингибирует развитие необратимого апоптоза клеток и играет защитную роль в условиях оксидативного стресса [Pu T., Liao X.H., Sun H. et al. / Augmenter of liver regeneration regulates autophagy in renal ischemia-reperfusion injury via the AMPK/mTOR pathway// Apoptosis, 2017 jul.; 22(7): 955-969].

15 В печени аутофагия служит важнейшим регулятором поддержания функциональной активности ее стволовых/прогениторных клеток, которые, как известно, являются неперенными участниками запуска процессов самообновления, пролиферации и дифференцировки клеток печени при регенерации [Cheng Y., Wang B., Zhou H., Dang S. et al. /Autophagy is required for the maintenance of liver progenitor cell functionality // Cell Physiol Biochem., 2015; 36(3): 1163-1174].

20 Известно также, что фармакологическая модуляция аутофагии в печени в ранние сроки после обширной (70-75%) и субтотальной (85-90%) резекции печени способна повысить выживаемость животных и эффективность регенерации оставшейся части печени [Lin C.W., Chen Y.S., Lin C.C. et al. / Amiodarone as an autophagy promoter reduces liver injury and enhances liver regeneration and survival in mice after partial hepatectomy // Sci. 25 Rep., 2015 Oct 30; 5: 15807].

30 Таким образом, по нашему мнению, из-за недостаточной выраженности процессов аутофагии в печени в результате критического истощения ее индукционных резервов при тяжелом (критическом) снижении массы печени, регенерационный эффект от применения оРНК из свежесекретированных ККМ оказался недостаточным при лечении тяжелых форм ОПН.

35 Техническая проблема заключается в повышении активности индукционного и регуляторного воздействия оРНК из свежесекретированных ККМ на процессы репаративной регенерации печени для обеспечения ускорения темпа, надежности и результативности лечения тяжелых и крайне тяжелых форм ОПН, развивающихся после хирургического иссечения критических объемов ткани печени.

Технический результат, достигаемый при осуществлении предлагаемого изобретения заключается:

40 - в сокращении сроков и повышении эффективности лечения ОПН, включая предотвращение летальных исходов после обширной резекции печени (70-75% печени), а также снижение летальности при осуществлении субтотальной резекции печени (85-90% печени) путем интраоперационной индукции у оперируемого пациента раннего и более высокого темпа процессов восстановительной регенерации (индукция высокого уровня митотической и пролиферативной активности клеток в оставшейся части печени уже на вторые сутки послеоперационного периода) за счет интраоперационного 45 применения биологически эффективной дозы активированной оРНК, полученной из ККМ, предварительно подвергнутых аутофагии, что позволяет повысить мощность и эффективность формирования регенерационного процесса в печени, всегда происходящего в рамках неспецифического адаптационного синдрома клеточной

системы на воздействия стресс факторов слабой и умеренной биологической силы.

в простоте и низкой себестоимости процесса получения активированной оРНК из ККМ, предварительно подвергнутых аутофагии.

5 Нами предложена оригинальная «предварительная подготовка» несортированных мононуклеарных ККМ перед выделением из них оРНК. За счет хранения этих клеток при 4-6°C в ион сбалансированном водно-солевом растворе «Кустодиол» (раствор Бредшнейдера) в течение 3-18 часов происходит активация оРНК. Предлагаемый режим хранения, обеспечивая аутофагию ККМ, исключает при этом развитие необратимого апоптоза этих клеток.

10 Разработанная нами технология подготовки получения и применения оРНК при ОПН обеспечивает ранний и более высокий уровень митотической и пролиферативной активности в сохранившихся клетках резецированной печени, создает условия для раннего восстановления (на 7-10 сутки) исходной массы печени и тем самым позволяет предотвратить летальность после обширной резекции печени (70-75%) и снизить
15 летальность после субтотальной резекции печени (85-90%).

В предлагаемом нами способе лечения ОПН, исходным материалом для получения активированной оРНК служит свежевыделенная фракция гемопоэтических мононуклеарных ККМ (аутологичных или аллогенных) здорового донора. В качестве донора мононуклеарных ККМ при резекции печени может выступать сам пациент, но
20 только до резекции у него печени, так как операция обширной резекции печени (70-75%) и тем более субтотальная резекция (85-90%) сама по себе уже в ранний период (первые сутки) ингибирует регенераторные процессы, как в печени, так и в костном мозге.

В предлагаемом способе лечения ОПН, развившейся после хирургической операции резекции печени используется предварительно активированная оРНК из
25 мононуклеарных ККМ. Активированная оРНК содержит уже готовый спектр молекул РНК тех типов и классов, которые образовались в результате аутофагии мононуклеарных ККМ в ответ на применение их гипотермической консервации (биологически допустимый стресс-фактор умеренной силы) в ион сбалансированном водно-солевом консервирующем растворе «Кустодиол», обеспечивающем при
30 температуре 4-6°C длительную и надежную сохранность этих клеток в течение 3-18 часов. Длительная и надежная сохранность мононуклеарных ККМ обеспечивается составом консервирующего раствора и гипотермическими условиями хранения, которые воздействуют на ККМ, как адаптогены средней и слабой биологической силы, индуцирующие в самих ККМ гомеостатическую перестройку (в том числе метаболизма)
35 через активацию процессов аутофагии в рамках развития эволюционно выработанного в клетках неспецифического адаптационного синдрома.

При введении в организм для лечения ОПН активированная оРНК в биологически эффективной дозе, полученная из ККМ, подвергнутых аутофагии, действует более ускоренно и результативно на поврежденную печень, так как реализует свой эффект
40 на клетки печени и как адаптоген (в рамках неспецифического адаптивного синдрома), и как готовый регулятор процессов регенерации, аккумулирующий в своем составе адекватный спектр молекул РНК, необходимых для запуска процессов аутофагии и регенерации поврежденной печени. В результате активированная оРНК более ускоренно и эффективно индуцирует в клетках поврежденной печени процессы аутофагии - ранней
45 самой важной и определяющей фазы запуска регенераторного процесса, проявляющегося более ранней активацией восстановительных и пролиферативных процессов.

Очевидно, запуск регенерационного процесса в печени осуществляют два фактора

- содержащиеся в активированной оРНК многочисленные микро РНК, образовавшиеся в процессе индукции аутофагии ККМ при их гипотермическом хранении в растворе «Кустодиол», а также микро РНК ускоренно экспрессировавшиеся в клетках поврежденной печени под воздействием использования адаптогенов.

5 Достоинствами предлагаемого способа лечения ОПН, позволяющими обеспечить клиническую доступность метода и по существу достигнуть выраженного и надежного лечебного эффекта являются:

- раннее интраоперационное применение активированной оРНК в эффективной дозе при ОПН, вызванной обширной (70-75%) или субтотальной (85-90%) резекцией печени
10 позволяет уже в 1-2 сутки послеоперационного периода активизировать адаптационные и восстановительные процессы в остатке печени, затормозить деструктивные процессы, обеспечить максимально раннюю регенерационную поддержку печени и, тем самым, предотвратить или достоверно снизить процент летальных исходов.

- возможность применения при необходимости повторных парентеральных введений активированной оРНК и достижения позитивного результата при использовании даже
15 сниженных доз препарата.

- возможность обеспечить раннюю компенсаторную поддержку процессам восстановительной регенерации не только печени, но и адаптационную поддержку других органов (почки, легкие), относящихся к единой системе детоксикации организма
20 и участвующих в поддержании печеночного гомеостаза, а также в снижении опасности возникновения летальных исходов;

- возможность проводить более эффективную регенерационную терапию различных органов и систем в организме, так как активированная оРНК, выделенная из мононуклеарной фракции ККМ здорового донора, сохраняет универсальность
25 регуляторных свойств этих клеток и будучи биохимическим препаратом с высокой проникающей активностью, обладает более мощным регуляторным воздействием, чем неактивированная оРНК;

- возможность использования стандартного ион сбалансированного водно-солевого консервирующего раствора «Кустодиол», применяющегося в трансплантологии для
30 сохранения (консервации) различных органов перед пересадкой делает процедуру индукции аутофагии в мононуклеарных ККМ, используемых для получения препарата активированной оРНК, доступной для широкого клинического применения.

Сущность изобретения заключается в следующем.

Для лечения ОПН в эксперименте после хирургической операции, в результате
35 которой формируется критический дефицит функционирующей ткани печени, получают несортированную фракцию мононуклеарных клеток костного мозга от крысы-донора и хранят в растворе «Кустодиол» при температуре 4-6°C в течение 3-18 часов. Затем из нее получают общую РНК и вводят в дозе 90-110 мкг/100 г веса животного однократно внутривентриально экспериментальному животному - крысе сразу после
40 завершения хирургического моделирования ОПН путем обширной (70-75%) или субтотальной (85-90%) резекции печени, в результате которой формируется критический дефицит функционирующей ткани печени.

Хирургической операцией, в результате которой формируется критический дефицит функционирующей ткани печени может быть обширная или субтотальная резекция
45 печени.

Таким образом, для лечения в эксперименте тяжелой формы ОПН, созданной путем хирургического иссечения больших (70-75%) и крайне больших (85-90%) объемов ткани печени, выделяют мононуклеарную фракцию ККМ от здорового животного-донора-

крысы. Затем полученную фракцию несортированных моноклеарных клеток активируют для индукции в этих клетках процессов аутофагии и адаптивной перестройки клеточного (в том числе энергетического) гомеостаза путем погружения их в охлажденный консервирующий раствор «Кустодиол» с допустимым сроком хранения в нем при температуре 4-6°C в течение от 3 до 18 часов (срок в течение которого ККМ преимущественно сохраняют жизнеспособность и в них развивается аутофагия, что контролируется по уровню появления в сохраняемых клетках необратимого апоптоза, составляющего не более 7-10% от общей массы клеток).

Затем из полученной фракции несортированных моноклеарных ККМ, которые активированы процессом их хранения в охлажденном растворе «Кустодиол», выступающего в роли биологически допустимого адаптогена, выделяют оРНК, которая является уже активированной, т.к. содержит в своем составе новый готовый спектр образовавшихся молекул РНК, способных запустить адаптационный и регенерационный процессы в печени после применения.

Активированную оРНК вводят экспериментальному животному - крысе однократно внутрибрюшинно интраоперационно сразу после завершения хирургического моделирования ОПН путем обширной (70-75%) или субтотальной (85-90%) резекции печени в дозе 90-110 мкг/100 грамм веса животного.

Предлагаемый способ, главным компонентом которого, является получение и применение активированной оРНК, обладает более мощным лечебным воздействием на поврежденную (резецированную) печень, чем неактивированная оРНК, полученная из свежесодержанных ККМ.

Обнаруженный эффект обусловлен двумя механизмами:

- активированная оРНК, будучи экзогенным адаптогеном, оказывает адаптивное воздействие на организм пациента с острой печеночной недостаточностью, вызывает гомеостатическую перестройку метаболизма в сохранившихся клетках печени, а также в клетках других органов, индуцируя в них процессы аутофагии. За счет индукции процессов аутофагии создаются предпосылки для запуска процессов восстановительного морфогенеза (регенерации) в клетках печени, костного мозга, а также в клетках других органов (почки, легкие), участвующих в поддержании детоксикационной функции печени;

- активированная оРНК содержит дополнительно в своем составе новый готовый спектр именно тех регуляторных молекул РНК, которые образовались в процессе аутофагии моноклеарных ККМ, более ускоренно запускающие в организме регенераторные процессы, дополнительно усиливая морфорегуляторную активность клеток печени, костного мозга, а также клеток почек и легких, участвующих в поддержании функции печени, как у экспериментального животного, так и у пациента в клинике.

Сочетанная реализация обоих механизмов при использовании активированной оРНК существенно усиливает и ускоряет восстановительный процесс в остатке резецированной печени.

Способ осуществляется следующим образом

Для лечения ОПН, развившейся после моделирования обширной и субтотальной резекции печени, применяют оРНК из активированных моноклеарных ККМ, предварительно подвергнутых процессу аутофагии в охлажденном консервирующем растворе «Кустодиол».

В результате аутофагии в моноклеарных ККМ происходит адаптивная структурно-функциональная перестройка, обеспечивающая повышение устойчивости этих клеток

к действию стрессорных факторов. В обзоре литературы показано, что медикаментозная индукция процессов аутофагии в печени повышает эффективность регенерации печени и выживаемость мышей после частичной гепатэктомии [Lin C.W., Chen Y.S., Lin C.C. et al. / Amiodarone as an autophagy promoter reduces liver injury and enhances liver regeneration and survival in mice after partial hepatectomy // Sci. Rep., 2015 Oct 30; 5: 15807]. оРНК, полученная из этих ККМ, становится активированной, так как содержат в своем составе именно тот спектр готовых вновь образовавшихся молекул РНК, который отсутствует или недостаточен в поврежденном органе, но который при введении в организм ускоренно и более мощно адаптирует поврежденные органы (печень), индуцируя в них приспособительные (аутофагию клеток печени) и восстановительные процессы (восстановительную регенерацию).

Комплекс активированных молекул оРНК содержит все необходимые типы РНК, в том числе все типы регуляторных РНК (прежде всего микро РНК), обеспечивающих перенос «регенерационной и сигнальной информации» клеткам костного мозга и клеткам поврежденной печени пациента для ускоренной и мощной индукции восстановительных процессов в печени, а также для индукции адаптивно-приспособительных процессов в органах (почки, легкие), поддерживающих детоксикационную функцию печени.

Выполнение способа начинают с получения моноклеарной фракции клеток из аспирата костного мозга животного. Для этого под эфирным наркозом из костномозгового канала большеберцовых и бедренных костей крысы-донора получали ККМ путем аспирации их шприцом с иглой 18G, содержащим среду для забора (0.5 мл фосфатно-буферного раствора с 50 ЕД/мл гепарина и 0.25 мг/л гентамицина).

Суспензию ККМ центрифугировали при 1500 об/мин (350g) 5 минут, осадок клеток ресуспендировали в растворе для лизиса эритроцитов и тромбоцитов (114 мМ NH₄Cl, 7,5 мМ KHCO₃, 100 мкМ EDTA) в течение 3 минут и повторно центрифугировали.

Гемолизированный супернатант удаляли отсасыванием, а клеточный осадок ресуспендировали в среде DMEM (ПанЭко, Россия), содержащей 10% телячью эмбриональную сыворотку («HyClonegold», USA), инсулин 0.4 мкМ, 0.25 мг/л гентамицина.

Выделенные клетки представляли собой моноклеарную фракцию, преимущественно гемопоэтических ККМ, суммарный выход которых колебался от 0,8-1.5×10⁷ клеток. Далее удаляли среду DMEM, а выделенные моноклеарные ККМ помещали в охлажденный до 4-6°C консервирующий раствор «Кустодиол» (Др. Франц Келер Хеми ГмбХ, Германия) сроком от 3 до 18 часов, в течение которого моноклеарные клетки сохраняют жизнеспособность, поддерживая свой гомеостаз за счет эволюционно выработанного механизма адаптивной структурно-функциональной и энергетической перестройки собственных резервов в ответ на стрессорное воздействие гипотермии и ион сбалансированного консервирующего раствора. Этот процесс структурно-функциональной и энергетической перестройки, обеспечивающий сохранение жизнеспособности ККМ, сопровождается процессом аутофагии и развитием обратимого апоптоза клеток в процессе хранения, что контролировали путем измерения и объективной оценки количества жизнеспособных клеток с помощью витального красителя 7-AAD (7 аминоактиномицин D, фирмы Beckman Coulter, США), который проникает в ядра только нежизнеспособных клеток и интерколирует в двойную спираль ДНК. Позитивно окрашенные, то есть нежизнеспособные моноклеарные клетки при использовании 7-AAD, составляли не более 7-10% после хранения в растворе «Кустодиол» в сроках от 3 до 18 часов.

Жизнеспособность свежевыделенных мононуклеарных ККМ, то есть без холодового хранения, составляла 97-99%. Рецептuru консервирующего раствора «Кустодиол», предназначенного для осуществления противоишемической защиты донорских органов при трансплантации и использованного нами для получения активированных мононуклеарных ККМ представлена в таблице №1.

Таблица №1

Л-гистидин	27,9289 г	180 мМ/л
Л-гистидина гидро-хлорид моногидрат	3,7733 г	18 мМ/л
Натрия хлорид	0,8766 г	15 мМ/л
Магния гидрохлорид гексагидрат	0,8132 г	4,0 мМ/л
Калия хлорид	0,6710 г	9,0 мМ/л
маннитол	5,4651 г	30 мМ/л
Л-триптофан	0,4085 г	2,0 мМ/л
Кетоглутарат калия, что соответствует α - кетоглутаровой кислоте	0,1842 г	-
	0,1760 г	1,0 мМ/л
Кальция хлорид дигидрат	2,2 мг	0,015 мМ/л
Вода для инъекций до 1 л. 2 М раствор калия гидроксида до pH=7.0-7.2. Осмоляльность 290 мосмоль/кг. Хранить при 2-8°C в защищенном от света месте.		

Далее приступали к выделению активированной оРНК из выделенных и подвергнутых аутофагии мононуклеарных ККМ по методике «Extract RNA», разработанной фирмой «ЕВРОГЕН» (Россия).

К полученной фракции мононуклеарных клеток добавляли реагент Extract RNA из расчета 1 мл реагента на 1×10^6 клеток (в камере Горяева предварительно подсчитывали количество клеток), инкубировали смесь 15 минут, периодически пипетируя, и центрифугировали при 13400 об/мин 10 минут для удаления нерастворенных фрагментов. Супернатант переносили в новую пробирку и приступали к разделению фаз. Для этого добавляли 0.2 мл хлороформа на каждый 1 мл реагента Extract RNA, инкубировали смесь в течение 5 мин при комнатной температуре, периодически встряхивая образец; затем образец центрифугировали при 13400 об/мин в течение 15 минут при комнатной температуре. В ходе центрифугирования происходило разделение смесей на три фазы: нижнюю-органическую фенол хлороформную фазу желтоватого оттенка, интерфазу белого цвета и верхнюю бесцветную водную фазу. РНК находится в верхней водной фазе, которую аккуратно собирали и переносили в чистую пробирку.

Затем приступали к непосредственному выделению оРНК. Для этого в водную фазу добавляли 0.5 мл 100% изопропанола на каждый 1 мл использованного реагента (Extract RNA). Полученную смесь инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут и центрифугировали при 13400 об/мин в течение 10 минут при комнатной температуре. Затем аккуратно, по стенке пробирки, добавляли 2 мл 75% этанола на каждый 1 мл изопропанола, использованного ранее. Полученный образец центрифугировали на максимальной скорости (13400 об/мин) в течение 5 минут. Удаляли этанол пипеткой и осадок, выделенной оРНК, растворяли в 1 мл воды и определяли концентрацию оРНК

в 100 мкл образца на спектрофотометре при длине волны 260 нм. Из каждых 4-6 млн исходно использованных моноклеарных клеток КМ в 1 мл определялось 380-500 мкг оРНК. Далее из этого концентрированного раствора оРНК готовили рабочие растворы оРНК, требуемой концентрации для введения в организм животного с целью 5 лечения ОПН. Активированная оРНК, выделенная из моноклеарных КМ, представляет собой биотехнологический продукт высокой степени очистки, который вводят парентерально (внутрибрюшинно) и интраоперационно животным (крысы) на этапе завершения хирургического моделирования ОПН.

Рабочий раствор активированной оРНК содержал 76-100 мкг РНК/мл (к 1.0 мл концентрированного раствора оРНК добавляли 4 мл дистиллированной воды). Введение 10 оРНК осуществляли в дозе 90-110 мкг на 100 г веса животного. У животных с моделью ОПН активированную оРНК вводили однократно интраоперационно, сразу после выполнения обширной (70-75%) или субтотальной (85-90%) резекции печени внутрибрюшинно, то есть крысе массой 300 г однократно вводят по 300 ± 30 мкг (270- 15 330 мкг) оРНК в виде 2,7 - 3,3 мл рабочего раствора оРНК при содержании в нем 100 мкг оРНК/мл или 3,5 - 4,3 мл рабочего раствора оРНК при содержании в нем 76 мкг оРНК/мл.

Приводим примеры осуществления предлагаемого способа лечения ОПН после обширной (70-75%) и субтотальной (85-90%) резекции печени.

20 Все исследования с использованием лабораторных животных проводили в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации (в соответствии с Правилами лабораторной практики, утвержденными приказом Минздрава России №708 от 23.08.2010 г, а также стандартам ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к условиям 25 содержания животных») и с соблюдением биотических принципов, утвержденных Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, 2005 г.

Эффективность предлагаемого способа лечения ОПН, возникшей в результате снижения функционирующей массы печени до критического уровня, изучали на моделях обширной и субтотальной резекции печени у крыс.

30 При создании модели обширной резекции печени (резекция 70-75% общей массы печени) у крыс под внутримышечной анестезией раствором золетила из расчета 15 мг/кг с соблюдением правил асептики и антисептики вскрывали брюшную полость, выводили печень в рану и последовательно накладывали лигатуры на основания срединной, левой боковой и правой передней долей печени, после чего их резецировали.

35 Модель субтотальной резекции печени создавали, путем резекции (85-90% общей массы печени) за счет иссечения не только срединной, левой боковой и правой передней долей печени, но также правой задней доли печени. Под внутримышечной анестезией раствором золетила из расчета 15 мг/кг веса выполняли верхнюю срединную лапаротомию длиной 3-4 см. Срединную (40%) и левую латеральную (30%) доли печени 40 выводили в рану, долевые сосуды перевязывали у основания, после чего доли удаляли. Далее, выделяли обе правые доли печени: переднюю и заднюю (20%), перевязывали долевые сосуды у основания и удаляли. После резекции печени в брюшную полость вводили раствор антибиотика. Лапаротомный разрез ушивали наглухо непрерывным швом. [Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, Dahmen U. Marginal hepatectomy in the rat: from 45 anatomy to surgery. //Ann Surg. 2006; - Vol. 244. - p. 89-98.]

Операцию проводили всегда в утренние часы (в период с 10 до 12 часов), когда суточный ритм митотической активности клеток печени минимален).

Всего было прооперировано 135 крыс, у 105 из которых выполняли обширную

резекцию печени (n=105) и у 30 выполняли субтотальную резекцию печени (n=30).

Всех животных с обширной резекцией печени разделили на 3 группы: группа 1 (n=25, контроль с введением физ. раствора); группа 2 (n=40), группа сравнения, в которой выполняли интраоперационное однократное внутрибрюшинное введение неактивированной оРНК из свежеразделенных ККМ. Группа сравнения состояла из 2 подгрупп: А (n=20), в которой вводили оРНК в дозе 90 мкг/100 г веса животного; подгруппа Б (n=20), в которой вводили оРНК в дозе 110 мкг/100 г веса животного. Группа 3 (n=40) -опытная, в которой выполняли интраоперационное однократное внутрибрюшинное введение активированной оРНК, выделенной из мононуклеарных ККМ, активированных хранением в охлажденном консервирующем растворе «Кустодиол». Опытная группа состояла из 2 подгрупп: А (n=20), в которой оРНК выделяли из ККМ, хранившихся в растворе «Кустодиол» при температуре 4°C в течение 3 часов и вводили животному в дозе 90 мкг/100 г веса; подгруппа Б (n=20), в которой оРНК, выделяли из мононуклеарных ККМ, хранившихся в охлажденном растворе «Кустодиол» при 6°C в течение 18 часов и вводили животному в дозе 110 мкг/100 грамм веса.

Результаты 3-х групп экспериментов оценивали по летальности животных, по динамике восстановления функциональных (биохимических) показателей, гистологической структуры (по уровню митотической активности гепатоцитов) и массы резецированной печени.

Всего из 105 крыс, у которых моделировали ОПН путем обширной резекции печени, погибло 10 животных в течение 5-ти первых суток после резекции печени, (общая летальность составила 9,5%). Однако все животные, погибшие после обширной резекции, относились к 1- контрольной группе без терапии, (n=25) и внутри этой группы летальность составила 40%. У выживших животных в группах 1, 2 и 3 функциональное состояние печени исследовали в динамике параллельно с оценкой степени развития восстановительных процессов в печени в течение первых 28 суток после выполнения обширной резекции печени. Для этого животных выводили из эксперимента путем внутрибрюшинного введения раствора тиопентала натрия в дозировке, вызывающей остановку дыхания, и проводили биохимические исследования крови, а также морфологическое исследование остатка печени через 24 ч, 48 ч, 72 ч, на 5, 7,10, 14, 18, 21 и 28-е сутки после выполнения обширной резекции печени.

Биохимическими методами исследовали кровь на содержание аланин-аминотрансферазы (АлАТ), аспарагин - аминотрансферазы (АсАТ) и щелочной фосфатазы (ЩФ). Для этого у крысы забрали 28-32 мкл крови, наносили на специальные тест-полоски Reflotron™, которые сразу же устанавливали в биохимический анализатор Reflotron™, («Roche», Швейцария) (Принцип измерения - рефлекссионная фотометрия, точность измерения - $\pm 0,5\%$, воспроизводимость - $\leq 0,2\%$, линейность: $\pm 0,05\%$).

Затем вскрывали брюшную полость, эксплантировали печень и взвешивали ее. Для гистологического исследования печени извлекали фрагмент оставшейся доли печени, разрезали его на кусочки размерами 3x4x5 мм и помещали в раствор Буэна (через 24 часа раствор Буэна заменяли на 70% этанол) для фиксации. После завершения фиксации кусочки промывали в проточной воде в течение 3 ч, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и заливали в парафин. Парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм наклеивали влажным способом на стекла с поли-L-лизиновым покрытием («Thermo», США). Затем препараты высушивали в течение 48 ч в термостате при 37°C, депарафинировали, регидратировали и окрашивали срезы гематоксилином и эозином. В гистологических препаратах срезов ткани печени в 30 полях зрения определяли количество митотически

делящихся клеток (в ‰ - промилле), а так же рассчитывали митотический индекс (МИ). Достоверность различия исследуемых показателей в сравниваемых группах оценивали с помощью параметрического критерия t-Стьюдента при $p < 0.05$.

Приводим результаты сравнительного изучения эффективности применения неактивированной оРНК, выделенной из свежесыводенных ККМ, и из активированной оРНК, выделенной из ККМ после их гипотермического хранения в растворе «Кустодиол» для ускорения темпа индукции восстановительных процессов в печени в соответствии с предлагаемым способом при ОПН после обширной (70-75%) резекции печени. Для контроля восстановления функциональных показателей печени проводили динамические исследования активности цитолитических ферментов в сыворотке крови крыс 1, 2 и 3 группы. В таблице 2, представлена динамика восстановления уровня активности цитолитических ферментов после обширной резекции печени в 1 - контрольной группе - введение физиологического раствора. В таблице 3 представлена динамика восстановления уровня активности цитолитических ферментов у крыс в группе 2, где после моделирования обширной резекции печени интраоперационно однократно внутрибрюшинно применяли неактивированную оРНК из свежесыводенных ККМ.

Так как в подгруппах А и Б у крыс 2 группы опытов, где применялись разные дозы оРНК (90 и 110 мкг/100 г веса животного), не было выявлено достоверных различий исследуемых показателей по срокам, результаты в подгруппах А и Б были объединены и составили цифровые значения исследуемых показателей в таблице 3.

Таблица №2

Сроки наблюдения (сутки)	контрольная группа 1 (n=25)		
	АсАТ	АлАТ	ЩФ
Исходные значения	58±8	40±6	240±24
1	190±10*	375±14*	285±18
3	210±16*	720±18*	320±25*
5	325±22*	650±10*	452±15*
7	240±18*	515±12*	410±15*
10	122±12*	250±15*	372±16*
14	92±10*	150±10*	310±14*
18	60±10	72±12*	264±8

*- $p < 0,05$ по сравнению с исходным уровнем аналогичного показателя

Таблица №3

Сроки наблюдения (сутки)	группа 2 (n=40)		
	АсАТ	АлАТ	ЩФ
Исходные значения	62±6	38±10	248±20
1	210±15	384±15	283±22
3	250±16	672±14*	320±25
5	205±12*	228±18*	305±14*
7	95±9,0*	182±12*	272±16*
10	76±5,0*	65±10*	251±16*
14	62±6*	47±8*	248±16*
18	58±4,0	44±5*	242±17

*-p<0,05 по сравнению с аналогичным показателем в контроле на том же сроке

В таблице 4 представлены результаты изучения динамики восстановления активности цитолитических ферментов в сыворотке крови крыс группы 3, где после моделирования обширной резекции печени интраоперационно однократно внутрибрюшинно применяли активированную оРНК в дозе 90 и 110 мкг/100 г веса животного из ККМ, подвергнутых аутофагии путем гипотермического хранения при 4-6°С в растворе «Кустодиол» в течение 3-18 часов. Так как в подгруппах А и Б у крыс группы 3, где применялись разные дозы активированной оРНК (90 и 110 мкг/100 г веса животного), выделенные из ККМ, подвергнутых разным режимам гипотермической консервации в растворе «Кустодиол» в пределах указанного диапазона значений (см. выше), не было выявлено достоверных различий уровня активности цитолитических ферментов на одних и тех же исследуемых сроках, полученные результаты были объединены и составили цифровые значения исследуемых показателей представленных в таблице 4.

Таблица №4

Сроки наблюдения (сутки)	группа 3 (n=40)		
	АсАТ	АлАТ	ЩФ
Исходные значения	66±5,0	45±8	254±15
1	220±12	562±12*	495±21*
3	190±16	210±18*	308±14
5	94±10*#	105±14*#	289±14*
7	68±6*#	58±7*#	260±13*
10	62±8*	51±8*	252±10*
14	60±10*	44±10*	244±12*
18	62±5,0	46±9	242±8

*-p<0,05 по сравнению с аналогичным показателем в контроле (1 группа) на том же

сроке

#-p<0,05 по сравнению с аналогичным показателем в группе 2 на том же сроке

Сравнительный анализ результатов, представленных в таблицах 2, 3 и 4, позволил установить, что в таблице 2 (контрольная 1 группа) показатели цитолиза (АлАТ, АсАТ и ЩФ) у выживших животных резко и неуклонно нарастают в течение первых 5 суток, затем стабилизируются и начиная с 10-14 суток возникает отчетливая тенденция их нормализации. В группе 2 (таблица №3) показатели цитолиза нарастают лишь в течение 1 и 3-х суток; к 5-м суткам намечалась отчетливая тенденция к снижению цитолитической активности. На 5-е сутки снижение цитолитической активности становилось для всех исследованных печеночных ферментов АлАТ, АсАТ и ЩФ достоверным по сравнению с контролем.

В группе 3 - опытной (таблица 4) ферменты цитолиза также нарастают в течение 1 и 2 суток, но уже на 3 сутки снижение цитолитической активности АлАТ, АсАТ в сыворотке крови становилось достоверным по сравнению с контролем (таблица 2), а на 5 сутки снижение уровня ферментов цитолиза было более выраженным и достоверным по сравнению с показателями в группе 2 (таблица 3). В результате нормализация исследуемых показателей в сыворотке крови наступала в группе 1 к 18 суткам, в группе 2 к 10-12 суткам, а в группе 3, к 6-8 суткам.

Исследование митотической активности гепатоцитов из резецированной печени позволило установить ее активацию через 48 часов во всех трех исследуемых группах (достоверные различия в митотической активности гепатоцитов печени крыс в подгруппах А и Б в группах 2 и 3 отсутствовали и поэтому результаты их подгрупп были объединены) по сравнению с исходным уровнем: исходный уровень митотической активности, оцениваемый до резекции печени по МИ, составил 0,2-0,3 промилле - ‰ (1-2 митоза на 30 полей зрения), тогда как в 1 (контрольной) группе МИ через 48 час после обширной резекции печени составил 5,181‰ (на 7334 клетки определялось 38 митозов), а в группе 2 с введением неактивированных оРНК из моноклеарной фракции ККМ на этом же сроке МИ составил 21,7‰ (на 9526 клеток определялось 207 митозов), т.е. во второй группе МИ был приблизительно в 4 раза выше, чем в первой контрольной группе, в 3 опытной группе МИ составил 31,8‰ (10564 клеток определялось 335 митозов), то есть в группе 3 МИ был выше, чем в группе 1 более чем в 6 раз и почти в 1,5 раза выше по сравнению с группой 2. Приведенные изменения митотической активности гепатоцитов в печени крыс 1, 2 и 3 групп через 48 часов после резекции печени были установлены на основании подсчета количества митотически делящихся гепатоцитов в 30 полях зрения, однако уже в каждом поле зрения гистологических препаратов во 2, но особенно в 3 группе выявлялось существенно большее количество митотически делящихся гепатоцитов, чем в 1 - контрольной группе.

Анализируя полученные результаты, мы установили, что в группе 2 повышенный уровень митотической активности гепатоцитов сохраняется в течение 5 суток, тогда как в группе 3 повышенный уровень митотической активности снижается уже к 3 суткам после моделирования обширной резекции печени. В контроле слегка повышенный уровень митотической активности по сравнению с исходным уровнем сохраняется в сроках до 10 суток. Эти данные представлены на рис. 1, который отражает динамику сравнительного изучения митотической активности гепатоцитов (МИ) в 1, 2 и 3 группах опытов в течение 14 суток после обширной резекции печени. (*- $p < 0,05$ по сравнению с группами 1 и 3; #- $p < 0,05$ по сравнению с группами 2 и 3).

Достоверно более высокий уровень митотической активности гепатоцитов в группе 3 по сравнению с 1 и 2 группами на 2 сутки способствует достоверно более раннему восстановлению исходной массы печени после обширной резекции у животных группы 3.

Достоверно более высокий уровень митотической активности гепатоцитов на 2 сутки после моделирования обширной резекции печени и достоверно более резкое и раннее снижение этого показателя на 3 сутки в печени крыс группы 3 находятся в соответствии с более ранним (к 6-8 суткам) восстановлением функции печени у крыс в этой группе, так как известно, что митотически делящиеся клетки не способны одновременно эффективно выполнять свои регенераторные и тканеспецифические функции.

На рис. 2 представлена динамика восстановления массы печени после обширной резекции в 3х группах опытов: в 1 - контрольной (введение физиологического раствора), в группе 2 с интраоперационным введением неактивированной оРНК из ККМ в дозе 90 и 110 мкг/100 г веса животного и в группе 3 с интраоперационным введением активированной оРНК из ККМ в дозе 90 и ПО мкг/100 г веса животного, предварительно подвергнутых аутофагии, что соответствует их предварительной активации. (*- $p < 0,05$ по сравнению с группами 1 и 3; #- $p < 0,05$ по сравнению с группами 3 и 2).

Из рисунка 2 видно, что в группах 2 и 3 темп восстановления массы печени до исходных значений был выше, чем в контроле, причем в группе 3 темп восстановления массы печени до исходных значений был выше, чем в группе 2. В 1-контрольной группе восстановление массы печени происходило в более медленном темпе, особенно в первые две недели после резекции, в результате масса печени только к 18-20 суткам приближалась к исходным значениям и полностью восстанавливалась лишь на 22-24 сутки наблюдения. Нами отмечено также, что более высокий темп восстановления массы печени в группе 2 коррелировал с более высоким темпом восстановления функциональных показателей печени (АлАТ, АсАТ, ЩФ) в этой группе по сравнению с контролем.

В группе 3 восстановление массы печени до исходного уровня происходило быстрее, чем в группе 2 - к 8-10 суткам наблюдения и это соответствовало еще более раннему восстановлению функциональных показателей в группе 3 (таблицы 2-4) по сравнению с группами 1 и 2.

Подтверждением того, что процесс регенерации печени (подобно другим органам) начинается с усиления аутофагии, могут служить результаты динамического измерения массы остатка печени в опытах с применением оРНК. Из рисунка 2 видно, что, несмотря на иссечение одинаковой массы печени (70-75%) во всех 3 группах опытов в течение первых 2 суток наблюдается процесс более резкого снижения массы печени во 2 и 3-ей группах опытов, причем достоверным это снижение было в группе 3 на сроке 48 часов, по сравнению с контролем, где более резкое снижение массы остатка печени ко 2-м суткам наблюдения сменялось более резким повышением скорости восстановления массы печени с достижением исходных значений к 8-10 суткам.

В 30 опытах на крысах с субтотальной резекцией (85-90%) печени, у которых по данным литературы уровень летальности достигает 90% [Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, Dahmen U. Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery. //Ann Surg. 2006; - Vol. 244. - p. 89-98; Рудаков В.С., Астрелина Т.А., Губарев К.К., Журбин А.С., Светлакова Д.С., Восканян С.Э. Влияние трансплантации аллогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга на летальность и продолжительность жизни после обширных резекций печени: экспериментальное исследование // Клини. и эксперимент.хир. Журн. им. акад. Б.В. Петровского. 2019. Т. 7, No 2. С. 31-37], была изучена возможность снижения летальности после применения активированной оРНК. Было выполнено 2 группы опытов: 1 -контроль (n=10) - моделирование субтотальной резекции печени с введением физиологического раствора и 2 - опыт (n=20), где однократное интраоперационное внутрибрюшинное введение

активированной оРНК в дозе 90 мкг/100 г (n=10) и 110 мкг/100 г веса животного (n=10) выполняли у животных с субтотальной резекцией печени. Исследование летальности крыс в течение 10 суток, показало, что в контроле летальность составила 8 крыс из 10, когда как в опытах с введением оРНК в дозе 90 мкг/100 г веса погибло 4 из 10, а с введением 110 мкг/100 г веса погибло 5 из 10, то есть активированная оРНК способствовала снижению летальности у крыс с субтотальной резекцией печени практически в 2 раза.

В совокупности полученные результаты позволяют заключить, что однократное интраоперационное введение активированной оРНК в дозе 90-110 мкг/100 грамм веса животного по предлагаемому способу лечения ОПН обеспечивает более быстрый темп нормализации показателей функции печени, исключает возникновение летальных исходов после обширной резекции и существенно снижает летальность при субтотальной резекции печени за счет индукции раннего и более высокого уровня митотической и пролиферативной активности клеток печени, позволяющей в более короткие сроки превысить критические значения массы печени и достигнуть адекватных значений функционирующей массы печени, способной обеспечить ускоренное восстановление печеночного гомеостаза в организме.

(57) Формула изобретения

1. Способ лечения острой печеночной недостаточности в эксперименте, после хирургической операции, в результате которой формируется критический дефицит функционирующей ткани печени, отличающийся тем, что получают несортированную фракцию моноклеарных клеток костного мозга от крысы-донора и хранят в растворе «Кустодиол» при температуре 4-6°C в течение 3-18 часов, после чего из нее получают общую РНК и вводят однократно внутривентриально интраоперационно экспериментальному животному - крысе после выполнения хирургической операции, в результате которой формируется критический дефицит функционирующей ткани печени, в дозе 90-110 мкг/100 г веса животного.

2. Способ по п. 1, отличающийся тем, что хирургической операцией, в результате которой формируется критический дефицит функционирующей ткани печени, является обширная или субтотальная резекция печени.

35

40

45

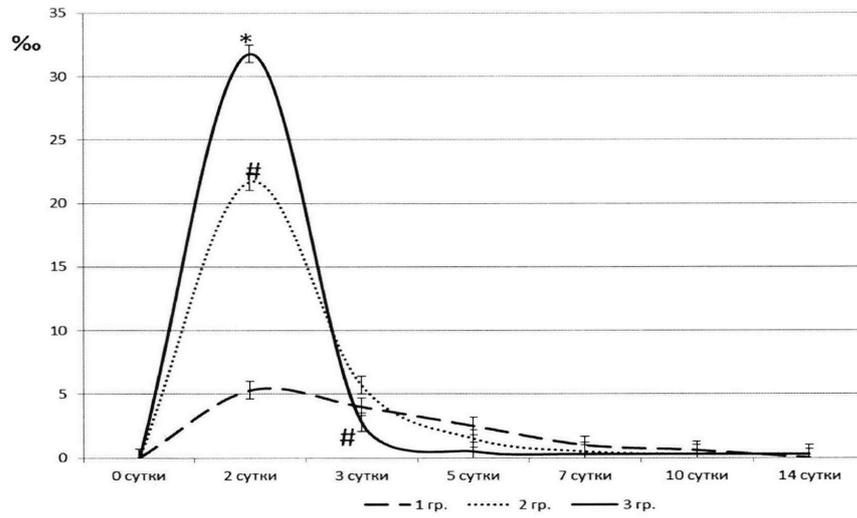


Рис. 1

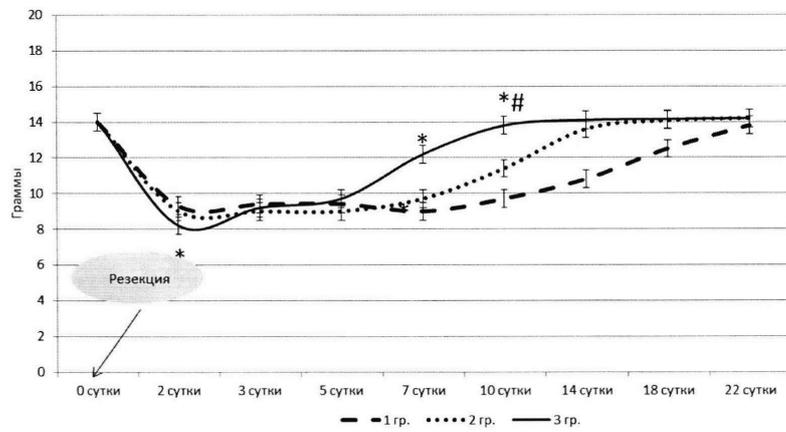


Рис. 2