



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2021.09.21

(21) Номер заявки

201792307

(22) Дата подачи заявки

2016.04.08

(51) Int. Cl. *A61K 33/34* (2006.01)

A61K 33/24 (2006.01)

A61P 17/02 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ РЕПАРАЦИИ И РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ

(31) PCT/CN2015/077136

(32) 2015.04.22

(33) CN

(43) 2018.06.29

(86) PCT/CN2016/078873

(87) WO 2016/169416 2016.10.27

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ИННОЛАЙФ КО., ЛТД. (CN)

(72) Изобретатель:

Кан Юйцзянь Джеймс (CN)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(56) ZHENG Lily et al.: "Recovery of Mesenchymal Stem Cells Homing to Rabbit Myocardial Ischemic Infarct Area by Cu-microbubble Treatment." *FASEB JOURNAL*, vol. 29, No. s1, 01 April 2015 (2015-04-01), pages 670.3.

ZHENG Lily et al.: "Recovery of Mesenchymal Stem Cells Homing to Rabbit Myocardial Ischemic Infarct Area by Cu-microbubble Treatment." *FASEB JOURNAL*, vol. 29, No. s1, 01 April 2015 (2015-04-01), pages 670.3.

DIMARINO A. M. et al.: "Mesenchymal stem cells in tissue repair." *FRONTIERS IN IMMUNOLOGY*, vol. 4, 04 September 2013 (2013-09-04), article 201, pages 1-9.

RODRIGUEZ J. Pablo et al.: "Modulation of the proliferation and differentiation of human mesenchymal stem cells by copper." *JOURNAL OF CELLULAR BIOCHEMISTRY*, vol. 85, 31 December 2002 (2002-12-31), pages 92-100.

LI Shun et al.: "Copper stimulates growth of human umbilical vein endothelial cells in a vascular endothelial growth factor-independent pathway." *EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE*, vol. 237, 31 December 2012 (2012-12-31), pages 77-82.

SUN Xiaotang et al.: "The role of hypoxia-inducible factor in osteogenesis and chondrogenesis." *CYTOTHERAPY*, vol. 11, No. 3, 31 December 2009 (2009-12-31), pages 261-267.

MENG Lili et al.: "Recovery of Mesenchymal Stem Cells Homing to Rabbit Myocardial Ischemic Infarct Area by Cu-microbubble Treatment." *JOURNAL OF THE AMERICAN COLLEGE OF CARDIOLOGY*, vol. 66, No. s16, 20 October 2015 (2015-10-20), pages C76

US-A1-20150064164

(57) Изобретение относится к локальной доставке микроэлемента в участок повреждения ткани, где такая доставка запускает природный механизм репарации ткани в организме. Локальная доставка меди в участок повреждения индуцирует миграцию (то есть, хоминг) стволовых клеток в участок повреждения; запускает дифференцировку стволовых клеток в участке повреждения; индуцирует регенерацию ткани в участке повреждения; индуцирует сигнал-передающие молекулы, которые запускают регенерацию ткани; устраняет поражение в участке повреждения и/или восстанавливает микроокружение нейрофибриллярных клеток и нейросекреторных клеток в участке повреждения. В другом аспекте изобретения описаны доставка микроэлемента (например, меди) непосредственно в участок повреждения и способы такой доставки.

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способам репарации и регенерации тканей посредством доставки микроэлементов, таких как медь.

Уровень техники

Регенеративная медицина представляет собой важную область терапии, включающую способ создания "живых" функциональных тканей для репарации или замены функциональных тканей или органов, функция которых была потеряна в результате старения, заболевания, повреждения или наследственных дефектов. Биологическая система снабжена механизмом саморепарации, которая осуществляется благодаря системе передачи сигнала о повреждении ткани, что гарантирует спасение этой ткани, если повреждение возникает в органе данного организма. При повреждении ткани происходит передача сигналов различных видов, таких как сигналы хемокинов и цитокинов, которые всегда передаются из участка повреждения для сообщения о повреждении по природному механизму репарации органа тела. Такое сообщение опосредуется рядом систем трансдукции, таких как сосудистая транспортная система. После распознавания сигнала о повреждении по механизму репарации, репарирующие материалы, включая стволовые клетки, цитокины, факторы роста и/или хемокины, мобилизуются, а затем направляются в участок повреждения. Таким образом, хорошо функционирующие сосудистая и/или лимфатическая системы переноса не только обеспечивают сообщение между участком повреждения и механизмом репарации, но также служат в качестве главным каналом для доставки репарирующих материалов в участок повреждения. Степень повреждения ткани и количество хоминг-факторов, высвобождаемых в кровоток, служат в качестве навигаторов транспорта репарирующих материалов. После хоминга в участок повреждения, стволовые клетки или клетки-предшественники дифференцируются в клетки-"мишени". Множество регуляторов, цитокинов, факторов роста и хемокинов, активируемых по механизму репарации, создают благоприятную среду для облегчения дифференцировки клеток, регенерации ткани и интеграции регенерированной ткани с имеющейся тканью. Следовательно, эти серии механизмов передачи сигнала и механизмов саморепарации или самообновления называются "системой передачи сигнала о повреждении ткани". См., например, Kang et al., 2013, Regen Med Res, 1, 7. Эта система требует наличия хорошо разветвленной сети, и повреждение любого механизма, такого как появление сигнала; передача сигнала; прием сигнала; рекрутинг репарирующих материалов; транспорт, опосредуемый повреждением; хоминг; дифференцировка; и регенерация будут приводить к подавлению саморепарации поврежденного органа. См., например, Kang et al., 2013, Regen Med. Res., 1, 7. Некоторые органы (такие как печень, кость, скелетная мышца и поджелудочная железа), при их повреждении, обнаруживают высокую способность к саморегенерации. Однако, в процессе старения и при хронических повреждениях, способность к саморепарации снижается, что обусловлено дисфункцией системы передачи сигнала о повреждении ткани.

Инфаркт миокарда (ИМ) представляет собой определенный тип ишемической болезни сердца (ИБС), которая возникает в результате нарушения баланса между подачей кислорода в миокард и потребностью миокарда в кислороде, что обусловлено неадекватным кровоснабжением. Главными причинами возникновения ИМ являются атеросклероз, тромбоз или эмболия коронарных артерий, которые приводят к снижению перфузии в области, снабжаемой пораженным сосудом. При постоянном нарушении кровоснабжения сердца, клетки сердца, присутствующие на участке закупоренной коронарной артерии, погибают, функция сердца нарушается, и в этом месте наблюдается образование коллагеновых рубцов, в результате чего у пациента возникает риск развития опасной для жизни аритмии, что может приводить к развитию аневризмы желудочка, к его разрыву и к катастрофическим последствиям.

В процессе сердечных сокращений, сердечный насос потребляет большое количество энергии, генерируемой в результате аэробного метаболизма для поддержания кровотока, и достаточное кровоснабжение тканей сердца играет важную роль в поддержании сердечных функций. См., например, Essop, 2007, J. Physiol, 584, 715-726; Dyson et al., 2007, Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol., 293, H526-533. Главной причиной нарушения сердечной функции является ишемия миокарда. Вредные эффекты, возникающие в результате дисрупции локальной коронарной артерии миокарда не только приводят к инициации ишемического повреждения на участке закупоренной коронарной артерии, но также и к блокированию пути хоминга материалов в ишемический участок для самовосстановления, которое запускается посредством природного механизма репарации ткани человеческого организма. Решение проблемы, связанной со стимуляцией восстановления кровоснабжения, является крайне важным для регенерации миокарда.

При ишемии, начальный и первичный молекулярный ответ на снижение кровоснабжения заключается в аккумуляции факторов, индуцируемых гипоксией. Факторы, индуцируемые гипоксией (HIF-1, HIF-2 и HIF-3), играют ключевую роль в транскрипционном ответе на гипоксию. HIF представляют собой гетеродимеры, содержащие уникальную кислородзависимую α -субъединицу и общую конститутивно экспрессируемую β -субъединицу. У человека и млекопитающих существуют три HIF α . Сигналы гипоксии играют важную роль в поддержании гомеостаза кислорода и выживания клеток. Индуцируемые гипоксией факторы транскрипции HIF-1 и HIF-2 представляют собой центральные медиаторы клеточного ответа на гипоксию благодаря регуляции экспрессии генов, регулирующих метаболическую адаптацию, доставку кислорода и выживание в ответ на кислородное голодание.

Фактор транскрипции HIF-1 включает HIF-1 α и HIF-1 β или ARNT (ядерный транслокатор арил-содержащих углеводов). См., например, Wang et al., 1995, PNAS, 92, 5510-5514. Аккумуляция HIF-1 α представляет собой скорость-ограничивающую стадию активации HIF-1, и таким образом, основная регуляция HIF-1 α находится на посттрансляционном уровне. См., например, Wang et al., 1993, PNAS, 90, 4304-4308; Huang et al., 1998, PNAS, 95, 7987-7992. Уровень экспрессии HIF-1 α не детектируется в клетках большинства типов в нормальных условиях благодаря его деградации по убихитин-протеосомному пути. В этом процессе, один или оба консервативных пролиновых остатков (Pro402 и Pro564) в HIF-1 α распознаются членами белков, содержащих пролилгидроксилазный домен (PHD), которые катализируют реакцию гидроксирования пролина. См., например, Huang et al., 1998, PNAS, 95, 7987-7992; Jaakkola et al., 2001, Science, 292, 468-472; Ivan et al., 2001, Science, 292, 464-468. Гидроксированный HIF-1 α распознается белком фон Хиппеля-Линдау (pVHL), который является компонентом убихитин-лигазного комплекса, нацеленного на субъединицу HIF-1 α для деградации посредством протеосомы в цитозоле. См., например, Maxwell et al., 1999, Nature, 399, 271-275; Masson et al., 2001, EMBO J, 20, 5197-5206; Ohh et al., 2000, Nat Cell Biol, 2, 423-427; Tanimoto et al., 2000, EMBO J, 19, 4298-4309. При гипоксии, HIF-1 α покидает путь деградации, аккумулируется и доставляется в ядро, где он димеризуется с HIF-1 β и взаимодействует с кофакторами, что обеспечивает сборку транскрипционного комплекса HIF-1 и тем самым активацию множества генов, участвующих в ответе на повреждение. См., например, Shohet et al., 2007, J. Mol. Med. (Berl), 85, 1309-1315; Kim et al., 2006, Cell Metab, 3, 177-185. Генами, регулируемые HIF, являются гены, участвующие в васкулогенезе, такие как гены васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF), фактора стволовых клеток (SCF), фактора-1, происходящего от клеток стромы (SDF-1), рецептора васкулярного эндотелиального фактора роста 1 (VEGFR-1), фактора роста плаценты (PLGF), ангиопозтина 1 (ANGPT1) и 2 (ANGPT2) и тромбоцитарного фактора роста B (PDGFB). См., например, Rey et al., 2010, Cardiovasc. Res, 86, 236-242. При острой ишемии, HIF-1-индуцируемый ангиогенез значительно усиливается. Активация HIF-1 играет важную роль в ангиогенезе и приводит к адаптации ишемической ткани к условиям гипоксии. См., например, Lee et al., 2000, N. Engl. J. Med., 342, 626-633.

Однако при хронической ишемии поврежденный миокард обычно характеризуется не повышением, а снижением плотности капилляров, а также ослаблением ангиогенеза. Защитная функция, активируемая посредством аккумуляции HIF-1 α при остром ишемическом инсульте, не осуществляется даже при постоянном увеличении уровней HIF-1 α в образцах ишемического миокарда, взятых у пациентов с хронической ишемической кардиомиопатией. Однако экспрессия последующего гена, такого как ген VEGF, снижается. См., например, Lee et al., 2000, N Engl J Med, 342, 626-33; Moslehi et al., 2010, Circulation, 122, 1004-1016.

Описание всех публикаций, патентов и патентных заявок во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Краткое описание сущности изобретения

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу индуцирования по меньшей мере двух событий репарации тканей у индивидуума с повреждением ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одно событие репарации ткани включает индуцирование миграции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одно событие репарации ткани включает индуцирование дифференцировки стволовых клеток на участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одно событие репарации ткани включает индуцирование регенерации ткани на участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одно событие репарации ткани включает передачу сигнала молекулы, которая запускает регенерацию ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одно событие репарации ткани включает устранение поражения на участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одно событие репарации ткани включает реконструирование микроокружения нейрофибриллярных клеток и нейросекреторных клеток на участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одно событие репарации ткани включает восстановление и/или усиление сигнала о повреждении. В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одно событие репарации ткани включает передачу и/или прием сигнала о повреждении. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одно событие репарации ткани включает восстановление и/или усиление рекрутинга репарирующего материала в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одно событие репарации ткани включает восстановление и/или усиление транспорта и/или хоминга репарирующего материала, направленного на участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, репарирующий материал включает клетку, такую как стволовая клетка; цитокин; фактор роста и/или хемикин. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одно событие репарации ткани включает восстановление и/или усиление дифференцировки стволовых клеток или клеток-предшественников и регенерации ткани на участке повреждения. В некоторых вариантах осуществ-

ления изобретения, индивидуумом является человек. В некоторых вариантах осуществления изобретения у индивидуума имеется система репарации поврежденной ткани.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу индуцирования миграции стволовых клеток (таких как мезенхимальные стволовые клетки, например, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга) в участок повреждения ткани у индивидуума с повреждением ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуумом является человек. В некоторых вариантах осуществления изобретения у индивидуума имеется система репарации поврежденной ткани.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу индуцирования репарации поврежденной ткани у индивидуума с повреждением ткани, включающему: а) доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения и б) введение индивидууму эффективного количества стволовых клеток (таких как мезенхимальные стволовые клетки, например, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга). В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуумом является человек. В некоторых вариантах осуществления изобретения у индивидуума имеется система репарации поврежденной ткани.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу индуцирования репарации ткани у индивидуума с системой репарации поврежденной ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуумом является человек.

В некоторых вариантах любого из вышеописанных способов индивидуум имеет хроническое повреждение ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения, возраст индивидуума составляет по меньшей мере 60 лет. В некоторых вариантах осуществления изобретения, у индивидуума наблюдается дефицит мезенхимальных стволовых клеток костного мозга.

В некоторых вариантах любого из вышеописанных способов, микроэлемент выбран из группы, состоящей из меди, железа, цинка и селена. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлементом является медь (такая как CuSO_4 или CuCl_2). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует комплекс с молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент не образует комплекса с любой молекулой, которая связывается с микроэлементом.

В некоторых вариантах любого из вышеописанных способов микроэлемент доставляют посредством микропузырьков. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микропузырьки, содержащие микроэлемент, вводят внутривенно, и этот микроэлемент высвобождается посредством сайт-направленного разрыва микропузырьков в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт-направленный разрыв микропузырьков осуществляют под действием ультразвука. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют путем введения микроэлемента непосредственно в участок повреждения.

В некоторых вариантах любого из вышеописанных способов тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца.

В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к способу индуцирования репарации ткани у индивидуума с повреждением ткани, включающему доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения. В другом своем аспекте, настоящее изобретение относится к способу индуцирования роста кровеносных сосудов в участки повреждения у индивидуума с поврежденной тканью, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения.

В некоторых вариантах любого из вышеописанных способов микроэлемент доставляют путем инъекции и оставляют в этом участке после инъекции (например, инъекции с помощью катетера). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют с помощью имплантата, содержащего этот микроэлемент (например, имплантата, покрытого микроэлементом, например имплантата, выбранного из группы, состоящей из стента, пластины и мембраны).

В некоторых вариантах любого из вышеописанных способов указанный способ также включает введение индивидууму эффективного количества стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный способ также включает введение индивидууму эффективного количества индуктора стволовых клеток.

В некоторых вариантах любого из вышеописанных способов индивидуум имеет систему репарации поврежденной ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения, индивидуумом, имеющим систему репарации поврежденной ткани, является индивидуум, имеющий хроническое повреждение ткани или острое повреждение ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения, возраст индивидуума, имеющего систему репарации поврежденной ткани, составляет по меньшей мере 60 лет. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуумом, имеющим систему репарации поврежденной ткани, является индивидуум с дефицитом стволовых клеток.

В некоторых вариантах любого из вышеописанных способов микроэлемент выбран из группы, со-

стоящей из меди, железа, цинка и селена. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь. В некоторых вариантах любого из вышеописанных способов тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца.

Настоящее изобретение также относится к наборам и промышленным изделиям, используемым для осуществления описанных здесь способов.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1A-1D показаны результаты Cu-MB-обработки новозеландских кроликов с моделью хронического инфаркта миокарда. На фиг. 1A показано снижение площади инфаркта миокарда. На фиг. 1B показано снижение площади инфаркта миокарда. На фиг. 1C показано увеличение фракции выброса левого желудочка. На фиг. 1D показано увеличение плотности капилляров в области инфаркта.

На фиг. 2 показан хоминг BMSC в большинстве областей инфаркта при остром инфаркте миокарда.

На фиг. 3 показан хоминг BMSC в области инфаркта, но не в пораженной инфарктом области.

На фиг. 4 показаны сильные сигналы хоминга BMSC в области острого инфаркта миокарда.

На фиг. 5 показано отсутствие сигнала хоминга BMSC, детектируемого при хроническом инфаркте миокарда.

На фиг. 6 показано, что обработка только Cu-MB не может мобилизовать хоминг BMSC в отсутствие инфаркта миокарда.

На фиг. 7 показано восстановление сигнала хоминга BMSC после Cu-MB-лечения хронического инфаркта миокарда.

На фиг. 8 показано восстановление хоминга BMSC после Cu-MB-лечения хронического инфаркта миокарда.

На фиг. 9 показана количественная оценка сигналов хоминга у групп с острым инфарктом миокарда, хроническим инфарктом миокарда и хроническим инфарктом миокарда, подвергнутым лечению с использованием Cu-MB.

На фиг. 10 показано значительное снижение сигналов хоминга BMSC после обработки AMD3100 в течение месяца после острого инфаркта миокарда.

На фиг. 11 показано отсутствие сигнала хоминга в AMD3100-обработанных BMSC при остром инфаркте миокарда.

На фиг. 12 представлена количественная оценка сигналов хоминга при остром инфаркте миокарда и сигналов хоминга AMD3100-обработанных BMSC при остром инфаркте миокарда.

На фиг. 13 показано отсутствие сигнала хоминга BMSC после AMD3100-обработки BMSC у группы с хроническим инфарктом миокарда, подвергнутой лечению с использованием Cu-MB.

На фиг. 14 показано отсутствие сигнала хоминга BMSC после AMD3100-обработки BMSC при остром инфаркте миокарда, и отсутствие сигнала хоминга BMSC после AMD3100-обработки BMSC у группы с хроническим инфарктом миокарда, подвергнутой лечению с использованием Cu-MB.

На фиг. 15 представлена количественная оценка сигналов хоминга BMSC при хроническом инфаркте миокарда; при хроническом инфаркте миокарда, подвергнутом лечению с использованием Cu-MB, и при хроническом инфаркте миокарда, подвергнутом лечению с использованием AMD3100-обработанных Cu-MB у группы с инфарктом миокарда.

На фиг. 16A показаны детектируемые с помощью эхокардиографии изменения фракции выброса левого желудочка у макак-резусов после Cu-MB-обработки.

На фиг. 16B показаны детектируемые с помощью МРТ изменения фракции выброса левого желудочка у макак-резусов после Cu-MB-обработки.

На фиг. 17 показаны детектируемые с помощью эхокардиографии изменения объема концевой систолы левого желудочка у макак-резусов после Cu-MB-обработки.

На фиг. 18A показана максимальная величина dP/dt , детектируемая путем измерения инвазивной сердечной гемодинамики у макак-резусов после Cu-MB-обработки. Увеличение максимальной величины dP/dt указывает на усиление функции сердечной систолы.

На фиг. 18B показана минимальная величина dP/dt , детектируемая путем измерения инвазивной сердечной гемодинамики у макак-резусов после Cu-MB-обработки. Увеличение абсолютной минимальной величины dP/dt указывает на усиление функции сердечной диастолы.

На фиг. 19 показано давление открытия левого желудочка (LVDP), детектируемое путем измерения инвазивной сердечной гемодинамики у макак-резусов после Cu-MB-обработки. Увеличение LVDP указывает на усиление функции сердечной систолы.

На фиг. 20 показаны детектируемые с помощью МРТ изменения размера инфаркта у макак-резусов после Cu-MB-обработки.

На фиг. 21 показана плотность CD31-меченных капилляров на границе области инфаркта.

На фиг. 22 показана плотность CD31-меченных капилляров в области инфаркта у макак-резусов.

На фиг. 23 показано Ki67-мечение пролиферирующих клеток в области инфаркта после проведения у макак-резусов целевой терапии с использованием контрастных микропузырьков, обработанных

ультразвуком и медью-альбумином.

На фиг. 24 показано увеличение уровней белка HIF-1 α в области инфаркта, детектируемое с помощью иммуногистохимического окрашивания, указывающего на экспрессию HIF-1 α в цитоплазме и в ядре клеток миокарда и в цитоплазме эндотелиальных клеток.

На фиг. 25 проиллюстрирован вестерн-блот-анализ, указывающий на экспрессию белка HIF-1 α в различных областях сердца у различных групп.

На фиг. 26 проиллюстрирован вестерн-блот-анализ, указывающий на экспрессию белка HIF-1 α в области инфаркта у различных групп.

На фиг. 27 проиллюстрированы результаты ОТ-ПЦР-анализа, указывающие на изменения уровней мРНК сердечного VEGF в различных областях сердца у различных групп.

На фиг. 28 проиллюстрированы результаты ОТ-ПЦР-анализа, указывающие на изменения уровней мРНК сердечного VEGF в области инфаркта у различных групп.

На фиг. 29 проиллюстрированы результаты ОТ-ПЦР-анализа, указывающие на изменения уровней мРНК сердечного VEGFR1 в различных областях сердца у различных групп.

На фиг. 30 проиллюстрированы результаты ОТ-ПЦР-анализа, указывающие на изменения уровней мРНК сердечного VEGFR1 в области инфаркта у различных групп.

На фиг. 31 проиллюстрированы результаты ОТ-ПЦР-анализа, указывающие на изменения уровней мРНК сердечного HIF-1 α в различных областях сердца у различных групп.

На фиг. 32 проиллюстрированы результаты ОТ-ПЦР-анализа, указывающие на изменения уровней мРНК сердечного HIF-1 α в области инфаркта у различных групп.

На фиг. 33 показано содержание меди в дистальной неинфарктной области и в области инфаркта у различных групп обработки.

На фиг. 34 показан механизм потери меди, индуцирующий снижение активности HIF-1.

На фиг. 35 проиллюстрирован количественный анализ оценки нервной функции у крыс с ишемией головного мозга через 14 дней после обработки медьсодержащими наноматериалами.

На фиг. 36 проиллюстрировано TTC-окрашивание, указывающее на изменения размера инфаркта головного мозга (фиг. 36A), и показано сравнение размеров инфаркта головного мозга у различных групп (фиг. 36B).

На фиг. 37 проиллюстрировано общее наблюдение всего головного мозга и атрофии головного мозга (фиг. 37A) и показано сравнение крыс с атрофией головного мозга и с ишемией головного мозга для различных групп через 14 дней после обработки (фиг. 37B).

На фиг. 38 проиллюстрировано окрашивание гематоксилином и эозином нормальной области, центра инфаркта и пограничной области инфаркта головного мозга.

На фиг. 39 показана площадь детектируемого ангиогенеза, а в рамке показана пограничная область ишемии.

На фиг. 40 проиллюстрирован иммуногистохимический анализ, указывающий на присутствие CD31-меченных клеток в пограничной области ишемии.

На фиг. 41 проиллюстрирован количественный анализ оценки повреждения нервной функции у макак-резусов с церебральным инфарктом, указывающий на улучшение нервной функции через 7 дней после обработки группы, обработанной соединением меди, по сравнению с необработанной группой.

На фиг. 42 показано влияние различных концентраций сульфида меди на ангиогенез колец аорты, выделенных у крыс и культивированных в EBM-2 с 1% FBS.

На фиг. 43 показано влияние ТЕРА, образующего хелатный комплекс с медью, на индуцируемую медью стимуляцию ангиогенеза.

На фиг. 44 проиллюстрирован вестерн-блот-анализ уровней белка VEGF в кольцах аорты, выделенных у крыс. На фиг. 44A показано влияние различных концентраций меди на уровни белка VEGF. На фиг. 44B показано влияние ТЕРА на уровни белка VEGF.

На фиг. 45 показано влияние анти-VEGF антитела на индуцируемую медью стимуляцию ангиогенеза.

На фиг. 46 показано влияние анти-VEGF антитела на уровни белка VEGF в кольцах аорты, выделенных у крыс.

На фиг. 47 показано значительное увеличение концентрации меди в крови после инъекции медьсодержащих микропузырьков.

На фиг. 48 показано значительное увеличение отношения концентрации меди в сердце к концентрации меди в крови у групп, обработанных медьсодержащими микропузырьками посредством ультразвука, по сравнению с группой, обработанной медьсодержащими микропузырьками, но без ультразвука.

Подробное описание изобретения

Ранее было показано, что для транскрипционной активности HIF-1 требуется участие микроэлемента меди. См., например, Jiang et al., 2007, J. Exp. Med, 04, 657-666; Feng et al., 2009, Mol. Pharmacol., 75, 174-182; Qiu et al., J. Pharmacol. 2012, Exp. Ther., 342, 561-567. Истощение меди в клетках приводит к снижению уровня связывания HIF-1 α с последовательностью HRE генов-мишеней и с P300, то есть с

компонентом транскрипционного комплекса HIF-1, и к подавлению экспрессии VEGF и других генов, регулируемых HIF-1, хотя такое истощение не влияет на продуцирование и стабилизацию HIF-1 α . Важно отметить, что концентрация меди в сердце людей, умерших от хронической болезни сердца, была более низкой. Известно, что мобилизация меди из миокарда запускается при длительной ишемии. См., например, Chevion et al., PNAS, 90, 1102-1106. Потеря меди четко коррелирует со степенью дисфункции сердца.

Поэтому резкое снижение содержания меди в миокарде, очевидно, является главной причиной подавления транскрипционной активности аккумулярованного HIF-1 α , сопровождающегося длительным течением ишемии миокарда. В соответствии с этим, даже в условиях увеличения уровней белка HIF-1, активации HIF-1-регулируемых генов не происходит из-за потери меди в сердце. Таким образом, предполагается, что поступление меди в участок повреждения способствует эффективному восстановлению транскрипционной активности HIF-1 и, фактически, предотвращает ишемический инфаркт миокарда. Микроэлементы, такие как медь, при их поступлении в участок повреждения ткани для активации транскрипционной активности HIF-1, будут особенно эффективными для индуцирования репарации и саморегенерации ткани.

Таким образом, в одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу индуцирования по меньшей мере двух событий репарации тканей у индивидуума с повреждением ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения. Этот способ основан на обнаружении авторами того факта, что доставка микроэлемента, такого как медь, в участок повреждения ткани запускает природный механизм репарации ткани в организме, состоящий из серии событий, приводящих к репарации ткани. Очевидно, что локальная доставка меди в участок повреждения посредством микропузырьков будет индуцировать миграцию (то есть, хоминг) мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (BMSC) в участок повреждения, даже если ткань индивидуума будет терять свою природную способность к спонтанному рекрутингу клеток BMSC. Локальная доставка меди в участок повреждения также будет запускать серию других событий, приводящих к репарации ткани, включая, например, индуцирование дифференцировки стволовых клеток в участке повреждения; индуцирование передающей сигнал молекулы, которая запускает регенерацию ткани; индуцирование регенерации в участке повреждения; устранение поражения в участке повреждения; и реконструирование микроокружения нейрофибриллярных клеток и нейросекреторных клеток в участке повреждения. Очевидно, что медь и другие микроэлементы играют центральную роль в репарации ткани, и настоящее изобретение открывает новые терапевтические перспективы для эффективного лечения заболеваний, ассоциированных с повреждением ткани.

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способам индуцирования репарации ткани у индивидуума с повреждением ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения. Этот способ основан на обнаружении авторами того факта, что микроэлементы, такие как медь, при их доставке непосредственно в участок повреждения ткани являются особенно эффективными для индуцирования репарации ткани. Так, например, очевидно, что микроэлементы, присутствующие в участке повреждения, могут стимулировать рост кровеносных сосудов в участке повреждения, что, тем самым, будет облегчать регенерацию окружения кровеносных микрососудов и, следовательно, регенерацию ткани. Также очевидно, что влияние меди (или других микроэлементов) на репарацию ткани и образование кровеносных сосудов зависит от конкретной концентрации меди (или других микроэлементов) в локальном участке повреждения.

Непосредственная доставка меди (или других микроэлементов) в участок повреждения может лучше регулировать нужную концентрацию меди в локальном участке повреждения, что, тем самым, позволит более эффективно проводить лечение и терапию.

В соответствии с этим, в некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способу индуцирования по меньшей мере двух событий репарации тканей у индивидуума с повреждением ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования миграции стволовых клеток (таких как мезенхимальные стволовые клетки (MSC), например, мезенхимальные клетки костного мозга (BMSC)) в участок повреждения ткани у индивидуума с повреждением ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования репарации ткани у индивидуума с повреждением ткани, включающему доставку в участок повреждения эффективного количества микроэлемента и эффективного количества стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) или индуктора стволовых клеток (таких как MSC, например BMSC).

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования репарации ткани у индивидуума, имеющего систему репарации поврежденной ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлементов в участок повреждения.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования репара-

ции ткани у индивидуума, имеющего повреждение ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования роста кровеносных сосудов в участке повреждения у индивидуума, имеющего повреждение ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения.

Настоящее изобретение также относится к наборам и к промышленным изделиям, применяемым в описанных здесь способах.

Следует отметить, что описанные здесь аспекты и вариантах осуществления изобретения "состоят" и/или "по существу, состоят" из аспектов и вариантов осуществления изобретения.

Слово "приблизительно", относящееся к используемым здесь величинам или параметрам, включает (и описывает) варианты, которые относятся к данной величине или данному параметру per se. Так, например, если в описании указано "приблизительно X", то в это определение входит описание "X".

Используемый здесь термин "приблизительно X-Y", имеет такое же значение как "приблизительно от X до Y".

Используемые в настоящем описании, а также в прилагаемой формуле изобретения артикли "a", "an" и "the", употребляемые с существительными в единственном числе, могут относиться и к существительным во множественном числе, если из контекста описания не следует обратное.

Как очевидно для специалиста, индивидуумом обследуемым, отобранным для лечения и/или проходящим лечение, является индивидуум, нуждающийся в таком лечебном мероприятии.

Способы индуцирования одного или более событий репарации ткани

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу индуцирования по меньшей мере одного события (включая, например, по меньшей мере любых 2, 3, 4, 5, 6 или более событий) репарации тканей у индивидуума с повреждением ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах любого из вышеописанных способов микроэлемент доставляют посредством микропузырьков. В некоторых вариантах осуществления изобретения микропузырьки, содержащие микроэлемент, вводят внутривенно, и этот микроэлемент высвобождается посредством сайт-направленного разрыва микропузырьков в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт-направленный разрыв микропузырьков осуществляют под воздействием ультразвука. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент вводят путем его введения непосредственно в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент или его комплекс вводят путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент выбран из группы, состоящей из меди, железа, цинка и селена. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлементом является медь (такая как CuSO_4 или CuCl_2). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует комплекс с молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлемент не образует комплекса с любой молекулой, которая связывается с микроэлементом.

Описанный здесь термин "индивидуум" означает млекопитающее, такое как мыши, крысы, кролики, кошки, собаки, свиньи, коровы, быки, овцы, козы, лошади, обезьяны и другие приматы, не являющиеся человеком, и человек; позвоночные, такие как рыбы и птицы, например куры. Млекопитающими могут быть сельскохозяйственные животные; животные, участвующие в спортивных состязаниях; грызуны и домашние питомцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуумом является человек.

В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одно событие репарации ткани включает индуцирование миграции стволовых клеток в участок повреждения, включая, но не ограничиваясь ими, мезенхимальные стволовые клетки (MSC), мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (BMSC), мультипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS) или стволовые клетки, происходящие от различных тканей. В некоторых аспектах изобретения, стволовыми клетками, происходящими от ткани, являются стволовые клетки, происходящие от жировой ткани, стволовые клетки, происходящие от ткани сердца, или стволовые клетки, происходящие от ткани пупочного канатика. В других вариантах осуществления изобретения, описанными здесь стволовыми клетками являются стволовые клетки взрослых. В конкретных аспектах изобретения стволовыми клетками взрослых являются гемопоэтические стволовые клетки, стволовые клетки молочной железы, стволовые клетки кишечника, мезенхимальные стволовые клетки плаценты, жировой ткани, легких, костного мозга, крови, вартонового студня пупочного канатика, или зубов (таких как периваскулярная ниша зубной пульпы и связки периодонта), эндотелиальные стволовые клетки, нервные стволовые клетки, обонятельные стволовые клетки взрослых, стволовые клетки нервного сплетения или стволовые клетки зародышевой линии (например, стволовые клетки яичек).

В некоторых вариантах осуществления изобретения по меньшей мере одно событие репарации ткани включает индуцирование дифференцировки стволовых клеток в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одно событие репарации ткани включает инду-

цирование регенерации ткани в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одно событие репарации ткани включает индуцирование передающей сигнал молекулы, которая запускает регенерацию ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одно событие репарации ткани включает устранение поражения в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, по меньшей мере одно событие репарации ткани включает реконструирование микроокружения нейрофибриллярных клеток и нейросекреторных клеток в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлементом является медь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, тканью является ткань сердца.

Индивидуумом, имеющим повреждение ткани, описанное в настоящей заявке, является, но не ограничиваются ими, индивидуум, имеющий одно или более повреждений, таких как повреждение миокарда, повреждение головного мозга, повреждение спинного мозга, повреждение мышц, повреждение скелета, острый тубулярный некроз, повреждение кишечника, повреждение легких, повреждение печени, повреждение почек, повреждение кости, повреждение кожи, вправление грыжи, васкулярный анастомоз, атеросклеротические бляшки, гемангиома и другие закрытые или проникающие травматические повреждения.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способу индуцирования миграции (то есть, хоминга) стволовых клеток в участок повреждения ткани у индивидуума, имеющего повреждение ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлемент доставляют посредством микропузырьков. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микропузырьки, содержащие микроэлемент, вводят внутривенно, и этот микроэлемент высвобождается посредством сайт-направленного разрыва этих микропузырьков в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сайт-направленный разрыв этих микропузырьков осуществляют под воздействием ультразвука. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлемент доставляют путем непосредственного введения микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент и/или его комплекс вводят путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент выбран из группы, состоящей из меди, железа, цинка и селена. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь (такая как CuSO_4 или CuCl_2). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует комплекс с молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент не образует комплекса с любой молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца.

В некоторых вариантах осуществления изобретения стволовыми клетками являются мезенхимальные стволовые клетки (MSC), мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (BMSC), мультипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS) или стволовые клетки, происходящие от ткани. В некоторых аспектах изобретения стволовыми клетками, происходящими от ткани, являются стволовые клетки, происходящие от жировой ткани, стволовые клетки, происходящие от ткани сердца, или стволовые клетки, происходящие от ткани пупочного канатика. В других вариантах осуществления изобретения описанными здесь стволовыми клетками являются стволовые клетки взрослых. В конкретных аспектах изобретения стволовыми клетками взрослых являются гемопоэтические стволовые клетки, стволовые клетки молочной железы, стволовые клетки кишечника, мезенхимальные стволовые клетки плаценты, жировой ткани, легких, костного мозга, крови, вартонового студня пупочного канатика, или зубов (таких как периваскулярная ниша зубной пульпы и связки периодонта), эндотелиальные стволовые клетки, нервные стволовые клетки, обонятельные стволовые клетки взрослых, стволовые клетки нервного сплетения или стволовые клетки зародышевой линии (например, стволовые клетки яичек).

В некоторых вариантах осуществления изобретения стволовые клетки мигрируют *in vivo* из компартмента органа или ткани в участок повреждения другого компартмента органа или ткани индивидуума с повреждением ткани. Так, например, MSC могут мигрировать из костного мозга (КМ), крови пупочного канатика (КПК), стромы пупочного канатика (вартонового студня), плаценты и жировой ткани (ЖТ). В других вариантах осуществления изобретения, MSC могут быть выделены из компартмента органа или ткани, обогащены и/или обработаны *in vitro*, а затем использованы *in vivo* для миграции в участок повреждения ткани или органа.

В других вариантах осуществления изобретения используемыми здесь анализами на миграцию клеток являются анализы с использованием биомаркеров, биоломинесцентный анализ, флуоресцентный анализ, позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ)/КТ и визуализация методом магнитного резонанса (МРТ) *in vivo*. Анализы *in vivo* могут быть подтверждены и проверены с применением других методов, например, ИГХ на срезах тканей.

In vivo, методы неинвазивной визуализации для анализа миграции стволовых клеток включают визуализацию частиц, покрытых золотом-декстраном, которые загружают в MSC, а затем они могут быть визуализированы методами рентгенографии, Рамановской спектроскопии, компьютерной томографии (КТ) или ультразвуковыми методами (УЗИ). В некоторых вариантах осуществления изобретения, биосовместимые конструкции наночастиц, метки или сверхпарамагнитные частицы загружают в стволовые клетки, такие как MSC, свойства которых позволяют визуализировать клетки с помощью рентгенографии, КТ, УЗИ, ПЭТ или МРТ. В некоторых вариантах осуществления изобретения, миграция стволовых клеток может быть проанализирована такими методами, как лигирование и пункция тощей кишки (CLP). Так, например, осуществление CLP у химерных GFP-мышей позволяет наблюдать поведение BMSC при развитии абдоминального сепсиса. FACS, проточная цитометрия и иммуногистохимический анализ могут быть проведены для наблюдения миграции BMSC в периферическую кровь, легкие, печень, рану на коже и первичный участок повреждения. Поведение BMSC может зависеть от времени повреждения, а также от участка повреждения (по оценке с помощью ОТ-ПЦР) и системных уровней цитокинов и хемокинов. Мониторинг миграции стволовых клеток может облегчить оценку вклада BMSC в репарацию и регенерацию локальных и дистальных органов и тканей после повреждения ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения мониторинг миграции стволовых клеток может быть осуществлен с использованием меченных клеток, введенных индивидууму. Для мечения стволовых клеток применяются такие методы, как мечение изотопами и окрашивание. В некоторых вариантах осуществления изобретения методы мечения включают перенос стволовых клеток от самцов животных самкам, а поэтому хромосома Y может служить в качестве метки; перенос стволовых клеток от вида A к виду B, а поэтому специфические гены вида A могут представлять собой помеченные клетки; мечение стволовых клеток rKН26, BrdU или другими красителями, а поэтому стволовые клетки могут быть помечены красителями, либо могут быть проведены специфические ферментативные реакции с этой меткой.

Наиболее распространенным методом мечения *in vivo* является мечение изотопами. Стволовые клетки могут быть помечены изотопами, которые используются для мечения клеток. Однако в этой связи следует отметить, что необходимо соблюдать меры предосторожности и учитывать время полужизни радиоактивных веществ. Другие методы мечения *in vivo* включают окрашивание клеток такими красителями, как DID; визуализацию поверхности живых клеток организма с помощью флуоресцентной микроскопии с двухфотонным возбуждением; визуализацию поверхности живых клеток трансгенных животных с помощью флуоресцентной микроскопии с двухфотонным возбуждением; мечение клеток SPIO и мечение клеток с помощью МРТ и т.п. Стволовые клетки могут быть помечены различными флуоресцентными красителями, а затем введены животным. При достижении сверочной точки органы-мишени могут быть разрезаны на кусочки в замороженном виде с последующим их непосредственным наблюдением с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Этот метод мечения не позволяет проанализировать слишком большое количество меченных клеток (10^6 клеток/кролика), а поэтому в качестве индикатора природного состояния органов и клеток могут быть использованы аутологичные клетки.

Мечение стволовых клеток может быть достигнуто, например, с помощью одной единственной метки, такой как rKН26. rKН26 представляет собой жирорастворимый краситель, который при мечении не проникает в клеточную мембрану, а следовательно, он подходит для мечения живых клеток. Вышеупомянутый процесс мечения представляет собой множественное мечение 2 или 3 красителями. Одним из выбранных методов мечения является мечение ядра (DAPI, Hoechst) плюс мечение мембраны. Метка ядра подтверждает наличие ядра клетки, а метка rKН26 в то же время дает отраженный от мембраны эхо-сигнал. Другим методом является множественное мечение 2 мембранными метками, например, Dio(3) и rKН26. Эти метки метят клетки по аналогичным механизмам, но имеют различные длины волн возбуждения и излучения. Таким образом, сигналы хоминга включают 2 различных флуоресцентных сигнала, и два эти сигнала одновременно подтверждают хоминг BMSC. В этом методе мечения в качестве сигналов хоминга рассматриваются только перекрывающиеся сигналы с различными длинами волн (такие как сигналы на красных и зеленых волнах).

Ткани многих видов животных являются аутофлуоресцентными, а наиболее распространенной аутофлуоресценцией природной ткани является флуоресценция в зеленом диапазоне спектра. Сердце является относительно менее флуоресцентным, но его флуоресценции достаточно для получения интерференции при наблюдении. Для предотвращения помех, в качестве сигналов мечения могут служить только красные и зеленые перекрывающиеся сигналы. Флуоресценция в красном диапазоне является особенно подходящей для статистического анализа с величиной IOD для его специфичности (за исключением очевидных неточностей для красный флуоресцентных сигналов).

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способу индуцирования дифференцировки стволовых клеток и/или индуцирования регенерации тканей в участке повреждения, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют посредством микропузырьков. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют посредством микропузырьков, вводят внутривенно, и микроэлемент высвобождается посредством сайт-направленного разрыва этих

микропузырьков в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт-направленный разрыв этих микропузырьков осуществляют под воздействием ультразвука. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют путем непосредственного введения микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент и/или его комплекс вводят путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент выбран из группы, состоящей из меди, железа, цинка и селена. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь (такая как CuSO_4 или CuCl_2). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует комплекс с молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент не образует комплекса с любой молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца. В некоторых аспектах изобретения стволовая клетка способна дифференцироваться в клетку мезенхимального типа, включая остеообласты, адипоциты, хондроциты, эндотелиальные клетки, эпителиальные клетки, энтероциты, остеоциты, нейтроциты, гепатоциты, нефроциты, миоциты (скелетной мышцы и гладкой мышцы) и кардиомиоциты. В других аспектах изобретения стволовая клетка способна дифференцироваться в клетку немезодермального происхождения, включая бета-клетки, гепатоциты и нейроны.

Для выявления процесса дифференцировки стволовых клеток и фенотипов дифференцированных стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) могут быть осуществлены известные анализы, включая окрашивание щелочной фосфатазой и ализариновым красным S на остеообласты, масляным красным O на адипоциты и альциановым синим на хондрогенез. Дифференцировка стволовых клеток, таких как MSC, в клетки различных типов может быть также проанализирована путем определения профиля экспрессии генов. Так, например, профили транскрипции определяют для идентифицированных специфических генов, участвующих в дифференцировке остеогенных клеток (FHL2, ITGA5, Fgf18), хондрогенезе (FOXO1A) и в теногенезе (Smad8). В некоторых вариантах осуществления изобретения, MSC могут быть подвергнуты крупномасштабному размножению с получением большого числа клеток. В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования регенерации тканей в участке повреждения у индивидуума, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют посредством микропузырьков. В некоторых вариантах осуществления изобретения микропузырьки, содержащие микроэлемент, вводят внутривенно, и микроэлемент высвобождается посредством сайт-направленного разрыва этих микропузырьков в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт-направленный разрыв этих микропузырьков осуществляют под воздействием ультразвука. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют путем непосредственного введения микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент и/или его комплекс вводят путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент выбран из группы, состоящей из меди, железа, цинка и селена. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь (такая как CuSO_4 или CuCl_2). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует комплекс с молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлемент не образует комплекса с любой молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот способ индуцирует пролиферацию клеток в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот способ индуцирует ангиогенез в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот способ индуцирует созревание кровеносных сосудов в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот способ дает два или более эффектов, описанных выше.

Описанная здесь регенерация ткани может быть проанализирована, например, в организме, в котором часть ткани является пораженной или удаленной. Описанный здесь микроэлемент, содержащий или не содержащий стволовые клетки, затем вводят в организм и определяют скорость регенерации ткани. Скорость регенерации ткани можно сравнить со скоростью, наблюдаемой в организме при введении контроля или в отсутствие обработки. Другими параметрами, которые могут быть определены при проведении анализа на регенерацию ткани, являются, но не ограничиваются ими, симптомы или последствия, такие как боль или источники боли, признаки или симптомы воспаления, конечная степень регенерации и качество регенерации. В других вариантах осуществления изобретения описанный здесь анализ на регенерацию ткани включает оценку одного или более функциональных параметров органа, таких как один или более функциональных маркеров сердца, один или более функциональных маркеров почек и один или более функциональных маркеров печени.

В некоторых вариантах осуществления изобретения для оценки описанными здесь методами, при-

меняемыми в анализе на регенерацию и репарацию сердца, могут быть использованы один или более из нижеследующих параметров: (1) количество восстановленной ткани или масса миокарда и коронарных сосудов; (2) число и размер восстановленных миоцитов и сосудов; (3) интеграция новообразованных миоцитов и сосудов с окружающим их миокардом и (4) происхождение регенерированных структур миокарда. В одном из аспектов изобретения может быть осуществлена магнитная резонансная томография (МРТ) для исследования площади рубцов, общей функции левого желудочка, региональной функции (подвижности и толщины стенок) и региональной вентрикулярной перфузии. В другом аспекте изобретения МРТ проводят для детектирования и/или подтверждения присутствия новых сосудов, тканей или клеток, которые улучшают вентрикулярную функцию. В еще одном аспекте изобретения может быть проведен гистопатологический анализ для определения площади рубцов и для идентификации и количественной оценки c-kit-позитивных стволовых клеток сердца. Гистопатологический анализ также позволяет получить данные о распределении, размере и плотности новых сосудов и кардиомиоцитов. Гистопатологический анализ позволяет документально подтвердить процесс репарации на тканевом и клеточном уровне. Так, например, осуществляют тесты для оценки, в поврежденных инфарктом срезах, плотности микрососудов (vWF-позитивных сосудов/мм²), BrdU-позитивных клеток и c-kit-позитивных клеток. Количественная оценка плотности микрососудов с использованием фактора фон Виллебранда (vWF) позволяет определить количество новых кровеносных сосудов, образовавшихся в зоне инфаркта. BrdU-позитивные клетки указывают на пролиферацию клеток, включая клетки сердца. Тесты на c-kit-позитивные клетки позволяют определить количество стволовых клеток в выбранных поврежденных инфарктом срезах.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования передающей сигнал молекулы, которая запускает регенерацию тканей у индивидуума с повреждением ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют посредством микропузырьков. В некоторых вариантах осуществления изобретения микропузырьки, содержащие микроэлемент, вводят внутривенно, и этот микроэлемент высвобождается посредством сайт-направленного разрыва микропузырьков в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт-направленный разрыв микропузырьков осуществляют под воздействием ультразвука. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют путем непосредственного введения микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент и/или его комплекс вводят путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент выбран из группы, состоящей из меди, железа, цинка и селена. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь (такая как CuSO₄ или CuCl₂). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует комплекс с молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент не образует комплекса с любой молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца.

Подходящими описанными здесь передающими сигнал молекулами являются, но не ограничиваются ими, HIF-1, VEGF, SDF-1, CXCR4, CXCL12 (также обозначаемый SDF-1 α), MMPs, HGF/c-met, TGF- β 1, IL-1 β , TNF- α , CCR1, CCR4, CCR7, CCR10, CCR9, CXCR5, CXCR6, CD44, CD54, CD56, CD106, Е-кадгерин, Р-селектин, интегрины, такие как интегрин-бета 1 и CD49a, b, c, e, f (интегрины α 1, 2, 3, 4, 6) и лианды интегринов, такие как VCAM и ICAM.

Ось SDF-1/CXCR4 представляет собой один из самых важных механизмов хоминга стволовых клеток. SDF-1 (происходящий от стромальных клеток фактор 1 или CXCL12), принадлежащий к семейству СХС-хемокинов, представляет собой вид низкомолекулярного секретированного белка. Экспрессия SDF-1 регулируется HIF-1 (индуцируемым гипоксией фактором-1). HIF-1 состоит из HIF-1 α и HIF-1 β /ARNT (ядерного транслокатора арил-содержащих углеводов, ARNT). HIF-1 β является стабильным в цитоплазме, а поэтому активность HIF-1 определяется экспрессией и аккумуляцией HIF-1 α . В нормальном состоянии белок HIF-1 α синтезируется и быстро разлагается под действием убихитин-протеасомной системы. Проллигидроксилаза (PHD), гидроксилат HIF-1 α и гидроксильированный HIF-1 α распознаются белком супрессии опухоли Хиппеля-Линдау (pVHL), который является компонентом убихитин-протеинлигазы, нацеленной на деградацию белка HIF-1 α . При повреждении в пораженной области наблюдается гипоксия, приводящая к ингибированию активности PHD, и тем самым к аккумуляции и транслокации HIF-1 α в ядре, где он димеризуется с HIF-1 β с образованием HIF-1, и в комбинации с другими факторами инициирует транскрипцию гена-мишени. В поврежденных тканях наблюдается экспрессия высоких уровней SDF-1 и этот SDF-1 высвобождается в кровотоке с образованием градиента концентрации между поврежденной областью и кровотоком в дистальной области. Таким образом, этот градиент направляет CXCR4-экспрессируемые стволовые клетки, включая BMSC, в поврежденные ткани.

Если в сердце наблюдается хроническая гипоксия, то кровь в коронарных артериях не может удов-

лстворять потребностям миокарда. Следовательно, при хронической ишемии будет индуцироваться фиброз миокарда, что будет приводить к снижению микроартерий, препятствовать поступлению крови и, наконец, к ишемическому инфаркту миокарда. При хронической ишемии наблюдается ограничение активности HIF-1, что приводит к ингибированию экспрессии ангиогенных факторов, регулируемых HIF-1. Таким образом, кровоснабжение не будет восстанавливаться, что может приводить к инфаркту.

Обычно активность HIF-1 в поврежденных тканях ограничена по времени. Эксперименты на животных и клинические испытания показали, что при ишемии сердца, HIF-1 α в поврежденных тканях аккумулируется сразу после повреждения, но затем его количество постепенно снижается. Активность HIF-1 снижается даже еще быстрее, чем его содержание, что приводит к снижению уровня экспрессии HIF-1-регулируемых факторов, таких как VEGF и SDF-1, после временного увеличения. Благодаря HIF-1-регуляции, максимальный уровень экспрессии SDF-1 наблюдается на первый или второй день после инфаркта миокарда. Затем этот уровень постепенно снижается и достигает своего базового уровня приблизительно через один месяц. Поскольку SDF-1 является одним из активаторов хоминга стволовых клеток, то снижение уровня SDF-1 приводит к замедлению и даже к прекращению хоминга стволовых клеток.

Важно отметить, что защитная функция, индуцируемая HIF-1 α , активируемого при острой ишемии, отличается от функции, наблюдаемой при хронической ишемии. При хронической ишемии наблюдается повышение уровней белка HIF, но при этом происходит супрессия генов, регулируемых HIF (таким как VEGF), что приводит к снижению реваскуляризации и к нарушению регенерации. Истощение меди приводит к снижению уровня связывания HIF-1 α с последовательностью HRE генов-мишеней и с P300, то есть, компонентом транскрипционного комплекса HIF-1 α . Кроме того, медь поступает, главным образом, из миокарда в кровь сразу после развития ишемии. Такая мобилизация меди в коронарном кровотоке особенно заметна после развития хронической, но не кратковременной ишемии сердца. Потеря меди миокардом коррелирует со степенью потери сердечной функции. Поэтому, даже в условиях повышения уровня белка HIF, активация HIF-регулируемых генов не наблюдается из-за потери меди миокардом. Микроэлементы, такие как медь, могут инициировать активацию HIF-1, включая синтез HIF-1, стабилизацию, транслокацию из цитозоля в ядро, связывание с последовательностью HRE генов-мишеней и образование транскрипционного комплекса HIF-1. Описанные здесь методы применяются для индуцирования одной или более передающих сигнал молекул, таких как HIF-1 α .

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу устранения повреждения в участке повреждения ткани у индивидуума, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлемент доставляют посредством микропузырьков. В некоторых вариантах осуществления изобретения микропузырьки, содержащие микроэлемент, вводят внутривенно, и этот микроэлемент высвобождается посредством сайт-направленного разрыва микропузырьков в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт-направленный разрыв этих микропузырьков осуществляют под воздействием ультразвука. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют путем непосредственного введения микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент и/или его комплекс вводят путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент выбран из группы, состоящей из меди, железа, цинка и селена. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь (такая как CuSO₄ или CuCl₂). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует комплекс с молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент не образует комплекса с любой молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца.

Устранение повреждения ткани может быть проанализировано любым подходящим методом, например, путем детектирования клеточных маркеров нормального гомеостаза ткани и/или персистентного повреждения ткани (например, с помощью иммуногистохимического анализа или измерения уровней ДНК и транскриптов), измерения площади повреждения или объема повреждения, или оценки каких-либо клинически релевантных индикаторов. Так, например, устранение повреждения ткани сердца в поврежденной инфарктом ткани может быть определено путем количественной оценки числа клеток, например, числа миоцитов, фибробластов или рубцов, или путем проведения функциональных анализов на конечные или структурные аспекты функции сердца, включая LVEDP, LVDP, максимальную величину dP/dt, минимальную величину dP/dt, массу левого желудочка (LV), объем камеры и диастолическую нагрузку на стенки. Вообще говоря, считается, что описанный здесь способ позволяет устранять повреждение ткани, если он дает значительное (например, по меньшей мере 2-кратное) изменение любых клинических параметров или любых их комбинаций. В некоторых вариантах осуществления изобретения этот способ способствует устранению фиброза в участке повреждения ткани. Фиброз представляет собой

аномальную аккумуляцию фиброзной ткани, которая может рассматриваться как часть процесса заживления ран в поврежденной ткани. Такое повреждение ткани может возникать в результате физического повреждения, воспаления, инфекции, действия токсинов и другими факторами. Фиброз печени (печеночный фиброз), например, рассматривается как часть реакции заживления ран на хроническое повреждение печени. Фиброз рассматривается как осложнение при гемохроматозе, болезни Вильсона, алкоголизме, шистосомозе, вирусном гепатите, обструкции желчных протоков, воздействии токсинов и метаболических расстройствах. Такое образование тканевых рубцов, вероятно, представляет собой попытку организма инкапсулировать поврежденную ткань. Фиброз печени характеризуется аккумуляцией внеклеточного матрикса, который может качественно отличаться от матрикса нормальной печени. Неизлеченный фиброз печени прогрессирует с развитием цирроза (определяемого по присутствию инкапсулированных белков) и печеночной недостаточности и имеет плохой прогноз. Как было систематизировано в публикациях Li и Friedman (*Gastroenterol. Hepatol.* 14:618-633, 1999), фактические и предлагаемые терапевтические стратегии лечения фиброза печени включают удаление этиологического фактора (например, токсина или инфекционного агента), подавление воспаления (например, с использованием кортикостероидов, антагонистов рецептора IL-1 или других агентов), ингибирование активации звездчатых клеток (например, с использованием интерферона-гамма или антиоксидантов), стимуляцию деградации матрикса или стимуляцию апоптоза звездчатых клеток.

Фиброзные ткани аккумулируются в сердце и кровеносных сосудах в результате гипертензии, гипертонической болезни сердца, атеросклероза и инфаркта миокарда. Повышенное кровяное давление или гипертензия могут возникать из-за ряда факторов и часто приводят к развитию гипертонической болезни сердца (ГБС), которая может прогрессировать и приводить к остановке сердца и к инфаркту миокарда. Аналогичным образом, атеросклероз и другие ишемические болезни сердца также часто приводят к остановке сердца. Все эти сердечно-сосудистые заболевания характеризуются аккумуляцией внеклеточного матрикса или фиброзными отложениями, что приводит к тугоподвижности сосудистой системы и самой ткани сердца. Такое отложение фиброзного материала является ответом на повреждение, индуцируемое гипертензией или склерозом, но эффекты такого ответа также приводят к негативным последствиям, таким как тугоподвижность сосудов и ткани сердца, а также к увеличению желудочка. В некоторых случаях, прогрессирование фиброза сердца при сердечно-сосудистом заболевании приводит к блокаде или модификации сигналов, передаваемых кардиомиоцитами посредством скелетизации сердца, также приводящей к дизрупции эффективной функции сердца и к стимуляции остановки сердца и инфаркта миокарда.

В соответствии с настоящим изобретением, профили экспрессии генов, дифференциально регулируемых в процессе повреждения ткани, могут быть использованы для оценки устранения повреждения ткани в описанном здесь способе лечения. Так, например, анализ экспрессии генов на основе микромассивов может быть проведен на основе анализа человеческих клеток (таких как фибробласты и кардиомиоциты), подвергнутых воздействию выбранных раздражителей, что будет приводить к изменениям аккумуляции и пролиферации внеклеточного коллагена, которые являются индикаторами фиброза. Раздражители могут быть выбраны для имитации тканеспецифического фиброза. Профили экспрессии генов, ассоциированные с фиброзом (например, с фиброзом печени, фиброзом легких, фиброзом ткани сердца, диабетической нефропатией и фиброзом почек), могут быть затем использованы для анализа на фиброз и устранения фиброзных повреждений в ткани. В других вариантах осуществления изобретения, профили экспрессии генов, ассоциированных с устранением фиброза (например, при лечении, которое, как известно, по меньшей мере частично устраняет фиброз), могут быть использованы для анализа фиброза и устранения фиброзных повреждений в ткани.

В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способу реконструирования микроокружения нейрофибриллярных клеток и нейросекреторных клеток в участке повреждения ткани у индивидуума, имеющего повреждение ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют посредством микропузырьков. В некоторых вариантах осуществления изобретения микропузырьки, содержащие микроэлемент, вводят внутривенно, и этот микроэлемент высвобождается посредством сайт-направленного разрыва микропузырьков в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, сайт-направленный разрыв этих микропузырьков осуществляют под воздействием ультразвука. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют путем введения микроэлемента непосредственно в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент и/или его комплекс вводят путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлемент выбран из группы, состоящей из меди, железа, цинка и селена. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь (такая как CuSO_4 или CuCl_2). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует комплекс с молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент не образует комплекса с любой молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости

или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца.

Микроокружение представляет собой плотную сеть структурных и воспалительных клеток, цитокинов, белков и факторов роста. В случае фиброзных заболеваний или состояний сердца, сердце содержит резидентные структурные клетки, такие как кардиомиоциты, эндотелиальные клетки, фибробласты и резидентные предшественники кардиомиоцитов и цитокин-секретирующие клетки. Эти клетки взаимодействуют с факторами фиброза в процессе патогенеза фиброза. В некоторых аспектах изобретения фибробласты и миофибробласты играют важную роль в создании фиброзного окружения, поскольку они секретируют избыточное количество коллагена и матриксных продуктов, приводящих к необратимому образованию рубцов. Молекулы клеточной адгезии и лиганды внеклеточного матрикса являются важными факторами фиброзного микроокружения и стимулируют фиброз и дифференцировку фибробластов. В некоторых вариантах осуществления изобретения опосредуемую адгезией передачу сигнала анализируют в микроокружении ткани. Так, например, дифференцировка и миграция клеток происходит в ответ на механические процессы в микроокружении, такие как тугоподвижность окружения матрикса. В одном из аспектов изобретения эластичность матрикса ткани или культуры мезенхимальных стволовых клеток (MSC) анализируют и модулируют для инициации хоминга стволовых клеток в поврежденную ткань, дифференцировки стволовых клеток в участке повреждения, репарации ткани и/или устранения повреждения ткани. В одном из вариантов осуществления изобретения, мягкий матрикс способствует дифференцировке MSC в нейрон-подобные клетки, а жесткий матрикс способствует дифференцировке MSC в миогенные клетки. В одном из аспектов изобретения внеклеточный матрикс и его компоненты в участке повреждения анализируют для того, чтобы определить, может ли микроокружение иницировать миграцию стволовых клеток в участок повреждения, дифференцировку стволовых клеток в участке повреждения, репарацию ткани и/или устранение повреждений ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения изменения в клетках в их природном окружении оценивают для анализа эффективности и/или токсичности описанной здесь терапии. В некоторых аспектах изобретения микроокружение стволовых клеток донорной ткани или органа (такого как костный мозг) и участка повреждения анализируют и/или модулируют для инициации миграции стволовых клеток в участок повреждения, дифференцировки стволовых клеток в участке повреждения, репарации ткани и/или устранения повреждения ткани. Локальное микроокружение ткани может быть проанализировано путем окрашивания на белок (ИНС и IF) и окрашивания на РНК с использованием хромогенных и флуоресцентных ISH. Так, например, микроокружение при гипоксии может быть идентифицировано по окрашиванию маркерами гипоксии, окрашиванию маркерами эндотелиальных клеток, с помощью анализа на плотность микрососудов и анализа на их проксимальное расположение. Микроокружение ткани может быть также исследовано с использованием культур органов или органотипических культур, описанных Benbrook, 2006, *Drug Discovery Today: Disease Models*, 3 (2): 143-148.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования по меньшей мере двух событий (включая, например, по меньшей мере любых 3, 4, 5, 6 или более событий) репарации тканей у индивидуума с повреждением ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения, где по меньшей мере два события репарации ткани выбраны из группы, состоящей из индуцирования миграции стволовых клеток, таких как мезенхимальные стволовые клетки костного мозга в участок повреждения; индуцирования дифференцировки стволовых клеток в участке повреждения; индуцирования регенерации ткани в участке повреждения; индуцирования передающей сигнал молекулы, которая запускает регенерацию ткани, устранения повреждения в участке повреждения и реконструирования микроокружения нейрофибриллярных клеток и нейросекреторных клеток в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют посредством микропузырьков. В некоторых вариантах осуществления изобретения микропузырьки, содержащие микроэлемент, вводят внутривенно, и этот микроэлемент высвобождается посредством сайт-направленного разрыва микропузырьков в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт-направленный разрыв микропузырьков осуществляют под воздействием ультразвука. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют путем введения микроэлемента непосредственно в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент или его комплекс вводят путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент выбран из группы, состоящей из меди, железа, цинка и селена. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь (такая как CuSO_4 или CuCl_2). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует комплекс с молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент не образует комплекса с любой молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования мигра-

ции стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) в участок повреждения и индуцирования дифференцировки стволовых клеток в участке повреждения, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способу индуцирования миграции стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) в участок повреждения и индуцирования регенерации ткани в участке повреждения, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения. В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования миграции стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) в участок повреждения; индуцирования дифференцировки стволовых клеток в участке повреждения и индуцирования регенерации ткани в участке повреждения, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют посредством микропузырьков. В некоторых вариантах осуществления изобретения микропузырьки, содержащие микроэлемент, вводят внутривенно, и этот микроэлемент высвобождается посредством сайт-направленного разрыва микропузырьков в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт-направленный разрыв этих микропузырьков осуществляют под воздействием ультразвука. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют путем введения микроэлемента непосредственно в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент или его комплекс вводят путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент выбран из группы, состоящей из меди, железа, цинка и селена. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь (такая как CuSO_4 или CuCl_2). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует комплекс с молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент не образует комплекса с любой молекулой, которая связывается с микроэлементом.

Способы индуцирования репарации ткани и роста кровеносных сосудов путем непосредственной доставки

В одном из своих аспектов настоящее изобретение относится к способу индуцирования репарации ткани у индивидуума с повреждением ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования репарации ткани у индивидуума с повреждением ткани, но без увеличения уровня экспрессии VEGF в участке повреждения, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования роста кровеносных сосудов в участке повреждения у индивидуума, имеющего повреждение ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлементом является медь. В некоторых вариантах осуществления изобретения, тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения, тканью является ткань сердца.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования роста кровеносных сосудов в участке повреждения у индивидуума, имеющего повреждение ткани, но без увеличения уровня экспрессии VEGF в участке повреждения, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца.

Образование и рост кровеносных сосудов в ткани может осуществляться посредством ангиогенеза и/или васкулогенеза. В одном из аспектов изобретения кровеносные сосуды включают капилляроподобные структуры, которые являются полностью функциональными и поддерживают транспорт крови. В некоторых вариантах осуществления изобретения ангиогенез включает процесс роста новых кровеносных сосудов из уже имеющихся сосудов, разрастание кровеносных сосудов, образование новых кровеносных сосудов посредством разрастания уже имеющихся сосудов или разделение кровеносных сосудов (инвагинацию), разрастание новых кровеносных сосудов посредством разделения уже имеющихся сосу-

дов. В некоторых вариантах осуществления изобретения васкулогенез включает процесс *de novo* продуцирования новых кровеносных сосудов благодаря пролиферации эндотелиальных стволовых клеток, например, образование новых кровеносных сосудов в том участке, где они раньше отсутствовали.

В некоторых вариантах осуществления изобретения для образования и роста кровеносных сосудов требуются сигналы, поступающие от факторов роста и других белков, которые непосредственно регулируют такой процесс, например, ангиопоэтины (такие как Ang-1 и Ang-2), эфрин (Eph), васкулярные эндотелиальные факторы роста (такие как VEGF-A и VEGF-C), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), факторы роста фибробластов (такие как FGF-1 и FGF-2), фактор некроза опухоли- α (TNF- α), интерлейкин (IL), белок хемотаксиса моноцитов-1 (MCP-1) (также известный как CCL-2), трансформирующий фактор роста- α (TGF- α), трансформирующие факторы роста- β (такие как TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3 и TGF- β 4), эндостатин, вазохибин, хемокины, тромбоспондин, ангиостатин, молекулы адгезии клеток сосудов (такие как VCAM-1), металлопротеиназы матрикса (такие как MMP-2 и MMP-9), интегрины, кадгеринины, активаторы плазминогена и ингибиторы активатора плазминогена.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рост кровеносных сосудов анализируют путем оценки пролиферации эндотелиальных клеток, необходимых для развития капилляров у здорового животного. В некоторых вариантах осуществления изобретения действие микроэлемента, доставленного в участок повреждения, на пролиферацию эндотелия, может быть оценено путем прямого подсчета клеток, путем синтеза ДНК и/или определения метаболической активности. Так, например, эндотелиальные клетки могут быть выделены из участка повреждения и проанализированы на скорость пролиферации после обработки микроэлементом. В других вариантах осуществления изобретения мониторинг пролиферации эндотелиальных клеток в участке повреждения может быть осуществлен путем меченя клеток и подсчета числа клеток, синтеза ДНК и/или оценки метаболической активности *in situ*. В других вариантах осуществления изобретения меченные эндотелиальные клетки могут быть введены индивидууму, а затем может быть проведен мониторинг пролиферации меченных эндотелиальных клеток в участке повреждения *in situ*. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндотелиальные клетки метят радиоизотопом, флуоресцентной молекулой или маркером, который может быть специфически детектирован, например, антителом. В конкретных вариантах осуществления изобретения клетки метят [³H]тимидином или бромдезоксипридином (BrdU).

В некоторых вариантах осуществления изобретения рост кровеносных сосудов анализируют путем оценки миграции эндотелиальных клеток, которые разрушают базальную мембрану и мигрируют по химическому градиенту, устанавливаемому проангиогенными факторами роста, например, в процессе разрастания кровеносных сосудов. В некоторых вариантах осуществления изобретения осуществляют мечение эндотелиальных клеток в участке повреждения и проводят мониторинг миграции клеток *in vivo*. В других аспектах изобретения меченные эндотелиальные клетки вводят индивидууму, а затем проводят мониторинг их миграции в участок повреждения *in vivo*. В других аспектах изобретения эндотелиальные клетки в участке повреждения могут быть выделены, а затем могут быть проанализированы их миграционные свойства с помощью ряда анализов *in vitro*, включая анализ в камере Бойдена, анализ в агарозе, анализ на заживление ран, анализ на тефлоновой решетке, анализ фагокинетического пути и другие анализы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения рост кровеносных сосудов анализируют путем оценки эндотелиальных клеток, образующих трубки с просветами для осуществления кровотока, то есть тубулогенеза. В некоторых вариантах осуществления изобретения рост кровеносных сосудов анализируют с помощью анализа на кольце аорты. Анализ на кольце аорты для оценки роста кровеносных сосудов описан в публикации Li et al., "Copper promotion of angiogenesis in isolated rat aortic ring: role of vascular endothelial growth factor", *Journal of Nutritional Biochemistry* 25(2014) 44-49, описание которой во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки. Микрососуды, разрастающиеся из кольца аорты, тесно взаимодействуют, в определенной последовательности, с резидентными макрофагами, перидитами и фибробластами, которые конкурируют за ангиогенез у здорового животного. В некоторых аспектах изобретения эндотелиальные клетки не были предварительно отобраны путем пассажа, и таким образом, находятся в покоящемся состоянии, аналогичном состоянию у здорового животного. Другими анализами на ангиогенез, которые включают анализ на ангиогенные функции (такие как разложение матрикса, миграция, пролиферация и образование трубочек), являются анализ эмбриоида, анализ на стопе мышей и другие анализы.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, анализ *in vitro* проводят для оценки роста кровеносных сосудов после непосредственной доставки микроэлемента в участок повреждения. Такими анализами являются, но не ограничиваются ими, анализ на ангиогенез роговицы, анализ на хориоаллантоисной мембране кур и анализ на слое Матригеля. Так, например, роговица представляет собой единственную ткань организма, которая лишена сосудов и является прозрачной, а поэтому роговица представляет собой идеальное средство для наблюдения ангиогенеза. В одном из аспектов изобретения осадок или губки, содержащие проангиогенные молекулы (например, описанный здесь микроэлемент), могут быть хирургически имплантированы в стромальные карманы. Мониторинг разрастания новых сосудов из

периферической сосудистой системы конечностей может быть проведен ежедневно для определения скорости ангиогенеза. В анализе на слое Матригеля, Матригель, содержащий описанный здесь микроэлемент, может быть имплантирован индивидууму в участок повреждения или вблизи этого участка, а затем слой Матригеля удаляют для визуализации кровеносных сосудов. В некоторых вариантах осуществления изобретения эндотелиальные клетки метят одним или более маркерами, а затем анализируют их пролиферацию, миграцию, тубогенез, образование кровеносных сосудов и/или рост кровеносных сосудов в участке повреждения *in vivo*, например, с применением подходящего метода визуализации.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования миграции (то есть, хоминга) стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) в участок повреждения ткани индивидуума, имеющего повреждение ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования дифференцировки стволовых клеток и/или индуцирования регенерации ткани в участке повреждения, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования регенерации ткани в участке повреждения у индивидуума, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу устранения поражения в участке повреждения ткани у индивидуума, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу реконструирования микроокружения нейрофибриллярных клеток и нейросекреторных клеток в участке повреждения ткани у индивидуума, имеющего повреждение ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования по меньшей мере двух (включая, например, по меньшей мере любых 3, 4, 5, 6 или более) событий репарации тканей у индивидуума, имеющего повреждение ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения, где по меньшей мере два события репарации ткани выбраны из группы, состоящей из индуцирования миграции стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) в участок повреждения; индуцирования дифференцировки стволовых клеток в участке повреждения; индуцирования регенерации ткани в участке повреждения; индуцирования передающей сигнал молекулы, которая запускает регенерацию ткани; устранения повреждения в участке повреждения и реконструирования микроокружения нейрофибриллярных клеток и нейросекреторных клеток в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца, печени или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования миграции стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) в участок повреждения и индуцирования дифференцировки стволовых клеток в участке повреждения, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения. В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования миграции стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) в участок повреждения и индуцирования регенерации ткани в участке повреждения, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения. В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования миграции стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) в участок повреждения; индуцирования дифференцировки стволовых клеток в участке повреждения и индуцирования регенерации ткани в участке повреждения, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения.

Комбинированная терапия с использованием стволовых клеток или индукторов

В другом своем аспекте настоящее изобретение относится к способу индуцирования репарации ткани (или улучшения функции ткани) у индивидуума, имеющего повреждение ткани, где указанный способ включает: а) доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения и б) введение индивидууму эффективного количества стволовых клеток (таких как мезенхимальные стволовые клетки (MSC), например, мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (BMSC)) или индуктора стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC). В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества индуктора стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют посредством микропузырьков. В некоторых вариантах осуществления изобретения микропузырьки, содержащие микроэлемент, вводят внутривенно и этот микроэлемент вы-

свободается посредством сайт-направленного разрыва микропузырьков в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт-направленный разрыв этих микропузырьков осуществляют под воздействием ультразвука. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлемент доставляют путем введения микроэлемента непосредственно в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлемент или его комплекс вводят путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлемент выбран из группы, состоящей из меди, железа, цинка и селена. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь (такая как CuSO_4 или CuCl_2). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует комплекс с молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент не образует комплекса с любой молекулой, которая связывается с микроэлементом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанными здесь стволовыми клетками являются мезенхимальные стволовые клетки (MSC), мезенхимальные стволовые клетки костного мозга (BMSC), мультипотентные стволовые клетки, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS) или стволовые клетки, происходящие от ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения стволовыми клетками, происходящими от ткани, являются стволовые клетки, происходящие от жировой ткани, стволовые клетки, происходящие от ткани сердца, или стволовые клетки, происходящие от ткани пупочного канатика. В некоторых вариантах осуществления изобретения, стволовыми клетками является индуктор стволовых клеток взрослых. В некоторых вариантах осуществления изобретения стволовыми клетками взрослых являются гемопоэтические стволовые клетки, стволовые клетки молочной железы, стволовые клетки кишечника, мезенхимальные стволовые клетки плаценты, жировой ткани, легких, костного мозга, крови, вартоновского студня пупочного канатика или зубов (таких как периваскулярная ниша зубной пульпы и связки периодонта), эндотелиальные стволовые клетки, нервные стволовые клетки, обонятельные стволовые клетки взрослых, стволовые клетки нервного сплетения или стволовые клетки зародышевой линии (например, стволовые клетки яичек).

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанным здесь индуктором стволовых клеток является индуктор мезенхимальных стволовых клеток (MSC), мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (BMSC), мультипотентных стволовых клеток, индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPS) или стволовых клеток, происходящих от ткани, таких как стволовые клетки, происходящие от жировой ткани, стволовые клетки, происходящие от ткани сердца, или стволовые клетки, происходящие от ткани пупочного канатика. В некоторых вариантах осуществления изобретения индуктором стволовых клеток является индуктор стволовых клеток взрослых, таких как гемопоэтические стволовые клетки, стволовые клетки молочной железы, стволовые клетки кишечника, мезенхимальные стволовые клетки плаценты, жировой ткани, легких, костного мозга, крови, вартоновского студня пупочного канатика или зубов (таких как периваскулярная ниша зубной пульпы и связки периодонта), эндотелиальные стволовые клетки, нервные стволовые клетки, обонятельные стволовые клетки взрослых, стволовые клетки нервного сплетения или стволовые клетки зародышевой линии (например, стволовые клетки яичек).

В некоторых вариантах осуществления изобретения индуктором мезенхимальных стволовых клеток согласно изобретению является агент, который индуцирует образование мезенхимальных стволовых клеток в ткани, например, в костном мозге. В некоторых аспектах изобретения индуктор мезенхимальных стволовых клеток индуцирует образование мезенхимальных стволовых клеток из недифференцированных стволовых клеток или плюрипотентных стволовых клеток. В некоторых аспектах изобретения стволовыми клетками являются эмбриональные стволовые клетки или индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPS). Стволовыми клетками могут быть стволовые клетки *in vivo*, *in vitro* или *ex vivo*. В других аспектах изобретения стволовыми клетками являются человеческие эмбриональные стволовые клетки или человеческие индуцированные плюрипотентные стволовые клетки.

В некоторых аспектах изобретения индуктор мезенхимальных стволовых клеток согласно изобретению выбран из группы, состоящей из белка BMP, основного фактора роста фибробластов (bFGF), BMP 4, BMP 2, активина А, антагониста BMP 4, Ногина, Хордина, Tsg, растворимого рецептора BMP, BMPRIA, BMPRII, небольшой молекулы, которая действует или функционирует как антагонист BMP, дорсоморфина, ингибитора пути передачи сигнала ретиноевой кислоты, антагониста всех рецепторов ретиноевой кислоты, антагониста ретиноевой кислоты, антагониста рецептора ретиноевой кислоты, антагониста рецептора ретиноевой кислоты X, Wnt-3a, гомолога Диккопфа 1 (DKK1), и небольшой молекулы, которая действует или функционирует как Wnt-3a, такая как Bio или CHIR99021. В одном из аспектов изобретения, индуктор мезенхимальных стволовых клеток включает один или более описанных здесь индукторов. В одном из аспектов изобретения индуктор мезенхимальных стволовых клеток увеличивает число мезенхимальных стволовых клеток в крови.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования репарации ткани (или улучшения функции ткани) у индивидуума, который имеет повреждение ткани, и которому вводят стволовые клетки (такие как MSC, например, BMSC), где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения. В некоторых своих вариантах

настоящее изобретение относится к способу индуцирования миграции стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) в участок повреждения у индивидуума, имеющего повреждение ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения, и где стволовые клетки вводят индивидууму. В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования дифференцировки стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) в участок повреждения у индивидуума, имеющего повреждение ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения, и где стволовые клетки вводят индивидууму. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный способ также включает введение индивидууму эффективного количества индуктора стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования репарации ткани (или улучшения функции ткани) у индивидуума, который имеет повреждение ткани, и которому вводят индуктор стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC), где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения. В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования миграции стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) в участок повреждения у индивидуума, имеющего повреждение ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения, и где индуктор стволовых клеток вводят индивидууму. В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования дифференцировки стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) в участок повреждения у индивидуума, имеющего повреждение ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения, и где индуктор стволовых клеток вводят индивидууму. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный способ также включает введение индивидууму эффективного количества стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца.

Описанные здесь способы, по существу, являются подходящими для индуцирования хоминга стволовых клеток в участок повреждения, и эти способы могут включать миграцию эндогенных стволовых клеток в участок повреждения, миграцию экзогенных стволовых клеток в участок повреждения или то и другое.

В некоторых вариантах осуществления изобретения используемые здесь стволовые клетки модифицируют для усиления их хоминг-ответа. В одном из вариантов осуществления изобретения стволовые клетки мигрируют в участок повреждения через кровеносные сосуды и/или посредством локальной миграции. Так, например, стволовые клетки (такие как MSC) могут химически, ферментативно и/или генетически модифицированы для усиления их миграции и хоминг-ответов. В одном из аспектов изобретения молекулу сиалил-Льюиса^x (SLeX), то есть, лиганд катящихся клеток, ковалентно присоединяют к поверхности стволовых клеток посредством химических модификаций биотином-стрептавидином. В некоторых вариантах осуществления изобретения, MSC, сконструированные на основе SLeX, обладают "катящимся" эффектом *in vitro* в ответ на действие субстратов, покрытых P-селектином. Sarkar et al., 2008, *Bioconjugate Chemistry* 19, 2105-2109. Следует отметить, что для усиления миграции стволовых клеток и их хоминга в участки поврежденной ткани могут быть проведены и другие подходящие химические, ферментативные и/или генетические модификации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения стволовые клетки происходят от множества различных тканей, имеющих клетки с различными фенотипами. Эти различия могут быть частично обусловлены различиями в природном микроокружении, из которого они выделены. На свойства стволовых клеток, помимо источника происхождения, включая их хоминг-потенциал, в значительной степени влияют методы культивирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения, хоминг свежeweделенных стволовых клеток осуществляется лучше, чем хоминг их культивированных аналогов. В одном из аспектов изобретения хемокиновый рецептор CXCR4, который распознает SDF-1 α , в высокой степени экспрессируется на BMSC, но удаляется после культивирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения стволовые клетки культивируют с цитокинами (такими как HGF, SCF, IL-3 и IL-6) и/или в условиях гипоксии, что приводит к восстановлению экспрессии CXCR4. В других вариантах осуществления изобретения сигнал, передаваемый металлопротеазой матрикса (MMP), регулируют описанным здесь методом для регуляции миграции клеток. На экспрессию MMP в MSC влияют такие факторы, как гипоксия и повышенная конfluence культуры. Кроме того, воспалительные цитокины TGF- β 1, IL-1 β и TNF- α также усиливают миграцию посредством активации MMP (MMP), влияющей на хоминг MSC.

Репарация ткани может быть оценена, например, по площади поражения или по объему поражения. Репарация поврежденной ткани у пациента может быть оценена с помощью любого клинически релевантного стандарта. Так, например, репарация поврежденной инфарктом ткани может быть определена путем количественной оценки числа клеток, например, числа миоцитов, фибробластов или количества рубцов, или путем проведения функциональных анализов на конечные или структурные аспекты функции сердца, включая LVEDP, LVDP, максимальную величину dP/dt , минимальную величину dP/dt , массу левого желудочка (LV), объем камеры и диастолическую нагрузку на стенки. Вообще говоря, считается, что описанный здесь способ позволяет устранять повреждение ткани, если он дает значительное (например, по меньшей мере 2-кратное) изменение любых клинических параметров или любых их комбинаций.

Анализ на репарацию ткани может быть осуществлен любым(и) подходящим(и) методом (методами). Так, например, эти методы могут быть осуществлены для оценки заживления ткани, для анализа функциональных свойств репарированной ткани и для оценки роста клеток в ткани. Для определения степени заживления ткани может быть проведен гистологический анализ и анализ по окрашиванию клеток в целях детектирования размножения посеянных клеток и/или улучшения гистологического внешнего вида. В некоторых случаях части ткани могут быть собраны и обработаны фиксирующим агентом, таким как, например, нейтрально забуференный формалин. Такие части ткани могут быть дегидратированы, залиты в парафин и разрезаны с помощью микротомы с получением срезов для гистологического анализа. Срезы могут быть окрашены гематоксилином и эозином (H&E), а затем помещены на предметные стекла для оценки морфологии и числа клеток под микроскопом. В некоторых случаях могут быть проведены физиологические тесты для оценки подвижности ткани и ее функциональных свойств после обработки с применением описанных здесь методов и материалов. Так, например, могут быть проведены механические анализы *in vitro* для измерения рабочей величины сгибания (WOF) или угла сгибания репарированной ткани сухожилия или репарированного сустава. *In vivo* анализы могут включать оценку функции органов, определение симптомов или методы визуализации.

В некоторых вариантах осуществления изобретения функции тканей и/или органа до, во время или после проведения описанных здесь способов терапии могут быть оценены с применением любого одного или более из нижеследующих методов, таких как биохимический анализ по меньшей мере одного биомаркера, указывающий на улучшение функции ткани и проводимый такими методами, как проточная цитометрия, иммунофлуоресценция, ELISA, мечение фосфором, гибридизация, амплификация нуклеиновых кислот или вестерн-блот-анализ; анализы на функцию клеток, такие как анализы на клеточный апоптоз, анализы на некроз и анализы на жизнеспособность клеток, включая окрашивание аннексином V посредством иммунофлуоресценции или проточной цитометрии, детектирование каспазной активности, анализы на гипоксию; анализ TUNEL, образование ДНК-лэддера в клетках, определение числа палочкообразных клеток в ответ на H_2O_2 , кол.ПЦР-анализ экспрессии генов и определение площади некроза по окрашиванию H&E; анализы на образование рубцов, включая оценку числа фибробластов в пораженной области или в области инфаркта, определение уровня отложения коллагена и уровня других белков матрикса, ассоциированных с образованием рубцов; оценку миграции стволовых клеток или клеток-предшественников в пораженную область и любые другие тесты на определение клинически релевантных функций органов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения сердечная функция может быть оценена по любому одному или более из таких параметров, как механические свойства миоцитов и слияние клеток, например, частота распределения миоцитов по размерам, укорочение пика, скорость укорочения и повторного удлинения, и оценка слияния клеток (по числу хромосом X); конечные или структурные аспекты функции сердца, включая LVEDP, LVDP, $+dP/dt$, массу левого желудочка (LV), объем камеры и диастолическую нагрузку на стенки, и сравнение MI-обработанных и MI-необработанных индивидуумов; регенерация миокарда, например, состав регенерированного миокарда, оценка BrdU-позитивных клеток в области инфаркта у обработанных и необработанных индивидуумов, и позитивных по миозину клеток в области инфаркта у обработанных и необработанных индивидуумов; оценка структуры сердца, например, размер зоны инфаркта, уровень фиброза и гипертрофия кардиомиоцитов. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный здесь способ также включает измерение одного или более индексов сердечной функции, где указанными индексами сердечной функции являются минутный сердечный выброс в грудной клетке (CO), сердечный индекс (CI), давление заклинивания в легочной артерии (PAWP), (CI), % укорочения фракций (% FS), фракция выброса (EF), фракция выброса левого желудочка (LVEF); диаметр диастолического конца левого желудочка (LVEDD), диаметр систолического конца левого желудочка (LVESD), сократимость (dP/dt), снижение функции предсердия или желудочка, повышение эффективности накачивания, снижение скорости потери эффективности накачивания, снижение потери гемодинамической функции или уменьшение осложнений, ассоциированных с кардиомиопатией по сравнению с контролем.

В некоторых вариантах осуществления изобретения функция головного мозга до, во время или после проведения описанного здесь метода терапии может быть оценена путем неврологического тестирования или электрофизиологического тестирования, например, по снижению отношения сигнал:шум, или биохимического тестирования, например, с помощью анализа с использованием по меньшей мере одного

биомаркера, указывающего на функцию органа, функцию ткани и/или клеточную функцию центральной или периферической нервной системы.

Репрезентативными электрофизиологическими методами являются электроэнцефалография (ЭЭГ), электрокардиография (ЭКГ), электромиография (ЭМГ), зависимые от событий потенциалы (ERP), индуцированные потенциалы (EP), магнитоэнцефалография (МЭГ) и исследование по проводимости нервов (NCS). В других вариантах осуществления изобретения функция головного мозга может быть оценена любым одним или более из нижеследующих методов или параметров, таких как общая интеллектуальная функция, оцениваемая, например, по сокращенной шкале теста Векслера на интеллектуальное развитие и по шкале III теста Векслера на интеллектуальное развитие взрослых; основное внимание, такое как расположение цифр, оцениваемое в субтестах на пространственное расположение цифр по памяти по шкале III Векслера; комплексное внимание (рабочая память), например, расположение цифр, последовательность ряда букв и арифметические упражнения, оцениваемые по шкале III теста Векслера на интеллектуальное развитие взрослых; функции исполнения указаний, оцениваемые в тесте Висконсин по сортировке карт, в тесте по прокладыванию пути В, в тесте Струпа, в тесте "Лондонская башня", в тесте с азартными играми, в тесте на функционирование системы передней доли и в тесте Айова на функционирование передней доли; память (визуальная и вербальная), оцениваемая в тесте Векслера на память по шкале III, в слуховом тесте Рэя, в тесте на вербальное обучение, в Калифорнийском вербальном тесте, в обучающем тесте II, и в кратком пересмотренном тесте на визуальную память; регуляция аффективного поведения, оцениваемая, например, в исследовательском персональном тесте Миннесота на мультиречевые функции, в тесте Струпа на аффективное поведение, в тесте на функционирование системы передней доли, и в тесте Айова на функционирование передней доли; интерпретация эмоциональных раздражителей, оцениваемая в тесте DANVA (в диагностическом анализе невербального поведения); скорость обработки информации, оцениваемая по индексу скорости обработки информации (поиск, кодирование символов) по шкале III теста Векслера на интеллектуальное развитие взрослых, в тесте по прокладыванию пути В и в тесте на узнавание цифр и символов; речь, оцениваемая в Бостонском тесте с названиями, в тесте на контролируемую речевую ассоциацию, в семантическом тесте на запоминание слов за определенный период времени и в тесте на мультилингвальную афазию, в тестах на визуально-конструктивные ассоциации, например, в тесте на запоминание сложных цифр Рэя-Ойстраха, в тесте на построение блоков и в субтестах на сборку объекта по шкале III теста Векслера на интеллектуальное развитие взрослых, а также в тестах на визуально-пространственную ориентацию, например, в тесте WAIS-III на распознавание матрицы и в тесте на ориентацию линий.

В некоторых вариантах осуществления изобретения оценивают функцию скелетной мышцы до, во время или после осуществления описанного здесь метода терапии. В некоторых вариантах осуществления изобретения, оценка функции скелетной мышцы включает заболевание мышц, повреждение мышц, метаболические изменения в мышцах после физической нагрузки и реорганизацию цитоскелета. Функциями скелетной мышцы могут быть мышечная сила, мышечная прочность, адаптация к тренировкам, нормальное состояние мышцы, обеспечивающее подвижность суставов, или стандартный физиологический метаболизм и функция скелетной мышцы у здорового млекопитающего. Может быть проведена оценка любой функциональной величины скелетной мышцы, включая мышечную силу (максимальную силу, генерируемую при определенных движениях), мышечную прочность (максимальное число сокращений, которые может происходить с определенной частотой и силой) и работоспособность мышцы (сила/время, максимальный эффект, генерируемый мышцей). Типичными мышцеспецифическими функциями являются, но не ограничиваются ими, дифференцировка миобластов, определение числа миобластов, развитие мышцы, сократительная способность мышцы, изменения в составе саркомеры, слияние миобластов, развитие соматической мышцы и миогенез.

В некоторых вариантах осуществления изобретения оценивают фиброз скелетной мышцы у пациента. Для определения статуса фиброза скелетной мышцы существует ряд методов, включающих биопсию мышечной ткани у пациента и оценку биоптата путем гистохимического или иммуногистохимического окрашивания, чувствительного к детектированию фиброзной ткани. Примерами гистохимических красителей являются, например, гематоксилин и эозин (H&E), трихром и АТФаза (например, при pH 4,3, 4,65 и 10,4). Репрезентативными антителами, которые могут быть использованы для мечения мышечных волокон при иммуногистохимическом окрашивании, являются, например, антитела против миозина, коллагена типа IV, ламинина, фибронектина и дистрофина. Альтернативно, может быть осуществлен функциональный метод определения степени фиброзного поражения скелетной мышцы у пациента. Такой функциональный метод включает проведение у пациента одного или более из ряда тестов и физических измерений. Такие тесты и измерения обычно включают тесты на нервное напряжение, мышечную силу, равновесие, походку, осанку, сенсорную координацию и легочную функцию, например функцию жизненно важных органов и форсированную емкость при выдохе, и все эти тесты могут быть осуществлены известными методами. В некоторых вариантах осуществления изобретения, репарация ткани может быть оценена исходя из уровня (уровней) экспрессии одной или более из описанных здесь передающих сигнал молекул.

Подходящими биомаркерами, служащими в качестве индикаторов репарации ткани, являются, но

не ограничиваются ими, биомаркер повреждения ДНК, биомаркер воспалительного ответа, биомаркер повреждения ткани, биомаркер репарации поврежденной ткани, или суррогатный гематологический маркер, такой как p53, p21, GADD45a, ATM, фосфорилированный гистон H2AX, IL-6, CRP, SAA, IL-1, IL-5, IL-10, KC/GRO, IFN, IL-2, IL-4, TNF-альфа, IL-12, IL-3, IL-7, IL-6, бета-амилаза слюнных желез, цитрулинированные белки, S100B, SP-D, BPI, TSP, CA15-3, CDBB, СКМВ, СКММ, FABP2, GFAP, NSE, CD5, CD-16b, CD20, CD177, CD26, CD27, CD40, CD45, Flt-3L, G-CSF, KFG, EPO, TPO, GM-CSF или SDF-1 α .

В некоторых вариантах осуществления изобретения, описанный здесь микроэлемент представляет собой регулятор одного или более факторов (например, факторов транскрипции), участвующих в репарации повреждения ткани и/или в регенерации ткани. Факторами, регулирующими уровень меди, являются, но не ограничиваются ими, белки гомеостаза Cu, такие как Ctr 1, Ctr 3, DMT1, Atox 1, ATP7A/7B, Cox 17, CCS, Sco 1/2, Cox 11, глутаматергические рецепторы N-метил-D-аспартата (NMDAR), белок-предшественник амилоида (APP), домен MURR1 гена метаболизма меди (COMMD1), X-сцепленный ингибитор апоптоза (XIAP), гомоцистеин (Hcy), субъединица II цитохром С-оксидазы (COX II), субъединица I цитохром С-оксидазы (COX I), FGF-1, VEGF, ангиопоэтин (такой как ANG1 или ANG2), фибронектин, коллагеназа, MMP-TIMP, эластин, PDGF и eNOS; внутриклеточные Cu-связывающие белки, такие как цитохром С-оксидаза (CCO), супероксид-дисмутаза (SOD), металлотионеин (MT), глутатион (GSH), допамин- β -монооксигеназа (DBH), пептидилглицин- α -амидирующая монооксигеназа (PAM), тирозиназа, фенилаланин-гидроксилаза, диамин-оксидаза, гефаэстин и гликопротеин матрикса хряща; внеклеточные Cu-связывающие белки, такие как церулоплазмин (CP), лизилоксидаза (LOX), альбумин (ALB), транскупреин, аминоксидаза, факторы свертывания крови V и VIII, ферроксидаза II, внеклеточная супероксид-дисмутаза и внеклеточный металлотионеин. Факторы, регулирующие уровень меди, описаны в публикации Zheng et al., Role of copper in regression of cardiac hypertrophy, Pharmacol. Ther. doi:10.1016/j.pharmthera.2014.11.014 (2014), которая вводится в настоящее описание посредством ссылки. В конкретных аспектах изобретения, микроэлемент регулирует транскрипционную активность одного или более из HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS и COMMD1, и сигнал-передающих сетей, регулируемых этими факторами транскрипции.

В некоторых аспектах изобретения уровень и/или активность одного или более факторов, регулируемых описанным здесь микроэлементом, анализируют у индивидуума после лечения описанной здесь терапевтической или профилактической композицией. В конкретных аспектах изобретения сначала определяют уровень и/или активность одного или более из HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS и COMMD1, а затем полученные данные коррелируют с ответом у индивидуума на терапевтическую или профилактическую композицию. В некоторых аспектах изобретения ответ детектируют путем оценки клеточных маркеров нормального гомеостаза ткани и/или персистентного повреждения ткани (например, путем иммуногистохимического анализа или измерения уровней ДНК и транскрипта), оценки площади повреждения или объема повреждения или оценки любых клинически релевантных индикаторов. Таким образом, в некоторых аспектах изобретения, уровень и/или активность одного или более факторов, регулируемых микроэлементом (таких как HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS и COMMD1), могут служить в качестве биомаркера конечной точки ответа у индивидуума на описанное здесь терапевтическое лечение или профилактику.

В некоторых вариантах осуществления изобретения один или более факторов, регулируемых описанным здесь микроэлементом, могут быть использованы для анализа и предсказания ответа на описанную здесь композицию или способ лечения или профилактики. Так, например, уровень и/или активность одного или более из HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS и COMMD1 могут указывать на вероятность положительного ответа у индивидуума на описанную композицию для лечения или профилактики, и такая композиция для лечения или профилактики может быть введена индивидууму. И наоборот, если уровень и/или активность одного или более из HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS и COMMD1 указывают на вероятное или полное отсутствие у индивидуума ответа на композицию для лечения или профилактики, то может быть назначен альтернативный курс лечения. Отрицательный ответ может быть определен как отсутствие эффективного ответа или наличие токсических побочных эффектов. Ответ на терапевтическое или профилактическое лечение может быть предсказано в базовых испытаниях, в которых может быть определен генотип индивидуума любой из нижеследующих групп: у группы, у которой наблюдается положительный ответ на проводимую схему лечения; у группы, у которой не наблюдается какого-либо значительно ответа на проводимую схему лечения; и у группы, у которой наблюдается отрицательный ответ на проводимую схему лечения (например, наблюдаются один или более побочных эффектов). Эти группы представлены как репрезентативные группы, но могут быть проанализированы и другие группы и подгруппы. Исходя из результатов этих анализов определяют генотип пациента для того, чтобы предсказать наличие у него положительного ответа на проводимую схему лечения, отсутствие какого-либо значительно ответа на проводимую схему лечения или полное отсутствие ответа на проводимую схему лечения. Таким образом, в некоторых аспектах изобретения, уровень и/или активность одного или более из HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS и COMMD1 могут быть использованы в качестве индикаторов ответа у индивидуума на описанные здесь схемы терапевтического или профилактического лечения. Индикаторы

ответа могут быть оценены до, во время и/или после проведения схемы терапии или профилактики. Так, например, один или более индикаторов ответа могут быть оценены в интервалах между непрерывным введением доз для того, чтобы определить, наблюдается ли у индивидуума эффект на непрерывное лечение, либо он нуждается в альтернативном лечении.

В клинических испытаниях могут быть также проведены описанные здесь прогностические тесты. Один или более индикаторов ответа (таких как HIF-1, SP1, MT, Atox 1, CCS и COMMD1) могут быть идентифицированы описанными здесь методами.

Затем может быть проведен скрининг потенциальных участников клинических испытаний с использованием композиции микроэлементов для идентификации индивидуумов, у которых ожидается наибольшая вероятность благоприятного ответа на композицию, и исключения индивидуумов, у которых могут наблюдаться побочные эффекты. В соответствии с этим эффективность лечения может быть оценена у индивидуумов, у которых наблюдается положительный ответ на композицию микроэлементов без снижения результатов измерений после включения индивидуумов, у которых существует небольшая вероятность положительного ответа в данном исследовании, и у которых отсутствует риск возникновения нежелательных проблем с безопасностью.

В некоторых вариантах осуществления изобретения стволовые клетки или индуктор стволовых клеток вводят системно. В некоторых вариантах осуществления изобретения, стволовые клетки или индуктор стволовых клеток вводят локально в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения стволовые клетки или индуктор стволовых клеток вводят локально в участок, не являющийся участком повреждения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения стволовые клетки (или индуктор стволовых клеток) и микроэлемент вводят одновременно. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь стволовые клетки (или индуктор стволовых клеток) и микроэлемент вводят последовательно в любом нужном порядке.

В конкретных вариантах осуществления изобретения стволовые клетки (такие как MSC, например, BMSC) вводят с другими стволовыми клетками (такими как стволовые клетки, не являющиеся BMSC), миообластами, миоцитами, кардиомиообластами, кардиомиоцитами или с предшественниками миообластов, миоцитов, кардиомиообластов и/или кардиомиоцитов.

В некоторых аспектах, после введения млекопитающему (например, человеку) описанных здесь стволовых клеток (или индуктора стволовых клеток) и микроэлементов проводят мониторинг на присутствие и/или биологическую активность клеток любыми различными известными методами. В других вариантах осуществления изобретения клеток мигрируют *in vivo* из тканей индивидуума в направлении к участку повреждения ткани, а поэтому проводится мониторинг и/или регуляция присутствия этих клеток и/или их биологической активности.

В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют непосредственно в участок повреждения. Так, например, в некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способу индуцирования репарации ткани (или улучшения функции ткани) у индивидуума, имеющего повреждение ткани, где указанный способ включает: а) доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения и б) введение индивидууму эффективного количества стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) или индуктора стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC). В некоторых вариантах осуществления изобретения описанными здесь стволовыми клетками являются мезенхимальные стволовые клетки (MSC), мультипотентные стволовые клетки или стволовые клетки, происходящие от ткани. В некоторых аспектах изобретения стволовыми клетками, происходящими от ткани, являются стволовые клетки, происходящие от жировой ткани, стволовые клетки, происходящие от ткани сердца, или стволовые клетки, происходящие от ткани пупочного канатика. В некоторых вариантах осуществления изобретения индуктором стволовых клеток является индуктор мезенхимальных стволовых клеток (MSC), мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (BMSC), мультипотентных стволовых клеток или стволовых клеток, происходящих от ткани, включая, но не ограничиваясь ими, стволовые клетки, происходящие от жировой ткани; стволовые клетки, происходящие от ткани сердца; и стволовые клетки, происходящие от ткани пупочного канатика. В других вариантах осуществления изобретения индуктором стволовых клеток является индуктор стволовых клеток взрослых. В конкретных аспектах изобретения стволовыми клетками взрослых являются гемопоэтические стволовые клетки, стволовые клетки молочной железы, стволовые клетки кишечника, стволовые клетки мезенхимы плаценты, жировой ткани, легких, костного мозга, крови, вартоновского студня пупочного канатика или зубов (таких как периваскулярная ниша зубной пульпы и связки периодонта), эндотелиальные стволовые клетки, нервные стволовые клетки, обонятельные стволовые клетки взрослых, стволовые клетки нервного сплетения или стволовые клетки зародышевой линии (например, стволовые клетки яичек). В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC). В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества индуктора мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью

является ткань сердца, печени или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования репарации ткани (или улучшения функции ткани) у индивидуума, имеющего повреждение ткани, и введения стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC), где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения. В некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способу индуцирования миграции стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) в участок повреждения у индивидуума, имеющего повреждение ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения, и где стволовые клетки (такие как MSC, например, BMSC) вводят индивидууму. В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования дифференцировки стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) в участок повреждения у индивидуума, имеющего повреждение ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента непосредственно в участок повреждения, и где стволовые клетки (такие как MSC, например, BMSC) вводят индивидууму. В некоторых вариантах осуществления изобретения указанный способ включает введение индивидууму эффективного количества индуктора мезенхимальных стволовых клеток костного мозга. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца, печени или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца.

Хотя описанные здесь способы применяются, в основном, во всех аспектах, относящихся к репарации ткани, однако, следует отметить, что способы комбинированной терапии могут быть применены с одной или более целями, а именно, для индуцирования миграции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга в участок повреждения; индуцирования дифференцировки стволовых клеток в участке повреждения; индуцирования регенерации ткани в участке повреждения; индуцирования передающей сигнал молекулы, которая запускает регенерацию ткани; устранения повреждения в участке повреждения и реконструирования микроокружения нейрофибриллярных клеток и нейросекреторных клеток в участке повреждения.

Кроме того, хотя описанные здесь способы относятся к комбинированной терапии, однако, следует отметить, что обсуждение репарации ткани в равной степени приводится и в других разделах настоящей заявки (например, в разделах, которые представлены непосредственно ниже).

Методы лечения индивидуума, имеющего систему репарации поврежденной ткани В других своих аспектах настоящее изобретение относится к способу индуцирования репарации ткани (или улучшения функции ткани) у индивидуума, имеющего систему репарации поврежденной ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца, печени или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют посредством микропузырьков. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент высвобождается посредством сайт-направленного разрыва микропузырьков в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт-направленный разрыв этих микропузырьков осуществляют под воздействием ультразвука. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют путем введения микроэлемента непосредственно в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлемент или его комплекс вводят путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент выбран из группы, состоящей из меди, железа, цинка и селена. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлементом является медь (такая как CuSO_4 или CuCl_2). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует комплекс с молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент не образует комплекса с любой молекулой, которая связывается с микроэлементом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения возраст индивидуума составляет более, чем приблизительно 30, приблизительно 35, приблизительно 40, приблизительно 45, приблизительно 50, приблизительно 55, приблизительно 60, приблизительно 65, приблизительно 70, приблизительно 75, приблизительно 80, приблизительно 85 или приблизительно 90 лет. В других вариантах осуществления изобретения возраст индивидуума составляет приблизительно менее, чем 30 лет. В некоторых вариантах осуществления изобретения возраст индивидуума составляет по меньшей мере приблизительно 60 (включая, например, возраст по меньшей мере приблизительно 65, 70, 75, 80, 85, 90 или более) лет. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуум имеет хроническое повреждение ткани, то есть, по меньшей мере приблизительно в течение 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 18 или 24 месяцев. В некоторых вариантах осуществления изобретения у индивидуума наблюдается дефицит стволовых клеток. В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуум имеет систему репарации дефектной ткани.

В некоторых вариантах осуществления изобретения индивидуум имеет два или более из описанных выше свойств. В некоторых аспектах изобретения индивидуум страдает одним или более нижеследую-

щими симптомами или состояниями, такими как потеря памяти, низкая или пониженная двигательная активность (включая, но не ограничиваясь ими, способность выполнять физические упражнения, переносимость скоростей, гибкость и подвижность суставов), гипостезия, мышечная слабость, потеря слуха и хроническое перенапряжение.

При повреждении биологической системы происходит активация ряда систем саморепарации. Различные органы обладают различной способностью к саморепарации: печень и мышцы восстанавливаются лучше, чем сердце и нервная система; при этом, чем моложе индивидуум, тем лучше система репарации. Однако, все биологические ткани имеют систему саморепарации. См., например, Kikuchi et al., *Annu Rev. Cell. Dev. Biol.*, 2012, 28: 719-41; Garrett et al., *J. Hand Surg. Am*, 1984, 9(5):683-92; Porrello et al., *Science*, 2011, 331(6020): 1078-80; Lin et al., *PNAS*, 2010, 107 (9):4194-9; Greco et al., *Cell. Stem Cell*, 2009, 4(2):155-69; Kajstura et al., *Circulation*, 2012, 126(15): 1869-81; Haubner et al., 2012, 4 (12):966-77; *J. Neuro. I Sci.*, 1988, 87(1):67-74; и Friedewald et al., *Am. J. Cardiol.*, 2012, 110 (6): 807-16. Одним из наиболее важных компонентов является хоминг стволовых клеток. Хоминг стволовых клеток представляет собой ориентированную миграцию в ткани-мишени и выживание эндогенных или экзогенных стволовых клеток в сложных, но организованных условиях. Хоминг стволовых клеток жизненно необходим для защиты поврежденных тканей.

При кратковременной ишемии сердца, поврежденные ткани инициируют хоминг стволовых клеток различных видов (включая мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, BMSC). Стволовые клетки репарируются и после их хоминга защищают ткани. Так, например, подвергнутые хомингу BMSC могут пролиферироваться и дифференцироваться в миокард, или репарировать поврежденную ткань по паракринному механизму. Известно несколько случаев, когда блокирование хоминга стволовых клеток приводило к ослаблению защиты сердца при его предварительном лечении. Cai et al., *Cardiovasc Res*, 2008, 77(3): 463-70. В отличие от тканей с острым повреждением, ткани с хроническими заболеваниями нуждаются в более быстрой репарации. Однако, их способность к саморепарации снижается или даже теряется. Хроническая ишемия, как и ишемия сердца, приводит к инфаркту. Функция сердца и кровоснабжение постоянно снижаются, что приводит к обострению заболевания и, в конечном счете, к сердечной недостаточности. Прогрессирование заболевания сопровождается дегенерацией структур ткани и физиологических функций. Очевидно, что при хронической ишемии сердца требуется структурная и функциональная репарация. Тем не менее, в случае обострения ишемии, спонтанный хоминг стволовых клеток снижается и сердце теряет свою способность к саморепарации.

При ишемии сердца происходит отток меди из сердца. Chevion et al., *PNAS*, 1993, 90 (3): 1102-6; Jiang et al., *J. Exp. Med.*, 2007, 204 (3): 657-6. Медь ингибирует HIF-1 (фактор, ингибирующий HIF-1) в ядре, и этот процесс является обязательным для транскрипционной активности HIF-1. Если медь отсутствует, то HIF-1 не может образовывать функциональные транскрипционные комплексы, что приводит к потере способности экспрессировать HIF-1-регулируемые гены, такие как гены хемокина SDF-1, ассоциированного с хомингом. Feng et al., *Mol. Pharmacol.*, 2009, 75 (1): 174-82; Xie et al., *Curr. Med. Chem.*, 2009, 16(10):1304-14; Ceradini et al., *Nat. Med.*, 2004, 10 (8):858-64; Ceradini et al., *Trends Cardiovasc Med.*, 2005, 15(2):57-63. В одном из своих аспектов, настоящее изобретение относится к взаимосвязи хоминга стволовых клеток и оттока меди, и было обнаружено, что при хронической ишемии сердца наблюдается снижение хоминга стволовых клеток, обусловленное оттоком меди. В одном из аспектов изобретения, пополнение меди приводит к устранению сердечной недостаточности. Jiang et al., *J. Exp. Med.*, 2007, 204 (3):657-6; Zhou et al., *J. Mol. Cell Cardiol.*, 2008, 45(1):106-17. В другом аспекте изобретения, доставка меди в сердце способствует восстановлению хоминга стволовых клеток в ишемическую область сердца, где эта медь повышает активность HIF-1 и стимулирует экспрессию SDF-1.

В одном из аспектов изобретения, для доставки меди в поврежденную ткань были сконструированы и использованы микропузырьки на основе Си-альбумина. После локализации микропузырьков и их обработки ультразвуком медь может высвободиться из пузырьков в нужную область сердца, что будет способствовать увеличению концентрации меди в области ишемии. Как показано в настоящем изобретении, обработка сердца Си-альбуминовыми микропузырьками может способствовать ослаблению симптомов, вызываемых хронической ишемией сердца (фиг. 1), то есть, снижению размера инфаркта (фиг. 1A, фиг. 1B), увеличению EF (фракции выброса) (фиг. 1C), а также повышению плотности сосудов (фиг. 1D).

Способы оценки репарации ткани описаны в приведенном выше разделе и для краткости изложения больше не повторяются.

Любые способы или способы комбинированной терапии, описанные в приведенном выше разделе, применяются в основном, для индивидуума, имеющего систему репарации поврежденной ткани. Так, например, в некоторых своих вариантах, настоящее изобретение относится к способу индуцирования репарации ткани у индивидуума, имеющего повреждение ткани и систему репарации поврежденной ткани, где указанный способ включает: а) доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения и б) введение индивидууму эффективного количества стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) или индуктора стволовых клеток. В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования миграции стволовых клеток (таких как MSC, например, BMSC) в

микроэлемент не образует комплекса с любой молекулой, которая связывается с микроэлементом.

В некоторых своих вариантах настоящее изобретение относится к способу индуцирования по меньшей мере двух событий (включая, например, по меньшей мере любых 3, 4, 5, 6 или более событий) репарации тканей у индивидуума, имеющего повреждение ткани и систему репарации поврежденной ткани, где указанный способ включает доставку эффективного количества микроэлемента в участок повреждения необязательно в комбинации с введением эффективного количества стволовых клеток, таких как BMSC или индуктора стволовых клеток, и где по меньшей мере два события репарации ткани выбраны из группы, состоящей из индуцирования миграции стволовых клеток в участок повреждения; индуцирования дифференцировки стволовых клеток в участке повреждения; индуцирования регенерации ткани в участке повреждения; индуцирования передающей сигнал молекулы, которая запускает регенерацию ткани; устранения повреждения в участке повреждения и реконструирования микроокружения нейрофибриллярных клеток и нейросекреторных клеток в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют посредством микропузырьков. В некоторых вариантах осуществления изобретения микропузырьки, содержащие микроэлемент, вводят внутривенно и этот микроэлемент высвобождается посредством сайт-направленного разрыва микропузырьков в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт-направленный разрыв этих микропузырьков осуществляют под воздействием ультразвука. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют путем введения микроэлемента непосредственно в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент или его комплекс вводят путем внутривенной инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлемент выбран из группы, состоящей из меди, железа, цинка и селена. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь (такая как CuSO_4 или CuCl_2). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует комплекс с молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент не образует комплекса с любой молекулой, которая связывается с микроэлементом.

Способы, применяемые для предупреждения и профилактики

Настоящее изобретение также относится к способам предупреждения повреждения ткани у индивидуума, включающим введение индивидууму эффективного количества микроэлемента. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца, печени, головного мозга, легких, почек, кожи, пищеварительного тракта, репродуктивных органов, кости или скелетной мышцы. В некоторых вариантах осуществления изобретения тканью является ткань сердца. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют посредством микропузырьков. В некоторых вариантах осуществления изобретения микропузырьки, содержащие микроэлемент, вводят внутривенно и этот микроэлемент высвобождается посредством сайт-направленного разрыва микропузырьков в участке повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения сайт-направленный разрыв этих микропузырьков осуществляют под воздействием ультразвука. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют путем непосредственного введения микроэлемента в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент выбран из группы, состоящей из меди, железа, цинка и селена. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь (такая как CuSO_4). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует комплекс с молекулой, которая связывается с микроэлементом. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент не образует комплекса с любой молекулой, которая связывается с микроэлементом.

Настоящее изобретение также относится к способам предупреждения повреждения ткани у индивидуума путем непосредственного введения микроэлемента в участок, который может быть поврежден.

Используемый здесь термин "предупреждения" включает профилактическую меру по предупреждению появления или рецидива заболевания у индивидуума, у которого имеется предрасположенность к такому заболеванию, но у которого оно еще не диагностировано. В некоторых вариантах осуществления изобретения полученные клетки и композиции используют для замедления развития заболевания или для замедления прогрессирования заболевания, такого как повреждение ткани.

Для предупреждения или лечения заболевания соответствующая доза или способ введения зависят от типа заболевания, подвергаемого лечению, тяжести и течения такого заболевания независимо от того, вводятся ли клетки в профилактических или терапевтических целях; от проводимой ранее терапии; от истории болезни индивидуума; от ответа на введение композиций и/или клеток; и от назначения лечащего врача. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции, содержащие микроэлементы и клетки, вводят индивидууму соответствующим образом за один или несколько курсов лечения.

В некоторых аспектах изобретения повреждение ткани вызывается истощением потенциально митотических клеток (например, истощением стволовых клеток), повреждением сосудов, вызывающим гипоксию и другие эффекты; ответами нормальной ткани хозяина на репарацию, включая индуцирование

преданных генов, таких как Jun и EGR1, индуцирование провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкины и TNF, индуцирование воспалительных цитокинов, таких как TGF β , PDGF, BFGF, и индуцирование вторичного(ых) каскада(ов) цитокинов; эффектами воспалительных ответов и/или взаимодействиями клеток многих типов, таких как воспалительные клетки, стромальные функциональные клетки и фибробласты. В других аспектах изобретения повреждение нормальной ткани является следствием воздействия цитотоксических агентов, таких как облучение и химиотерапия. Облучение может быть случайным, внешним, профессиональным, диагностическим и терапевтическим. Повреждение ткани также представляет собой общий побочный эффект при лечении рака, таком как лучевая терапия, химиотерапия и комбинация лучевой терапии и химиотерапии. В некоторых своих аспектах настоящее изобретение относится к композициям и способам, применяемым для лечения и предупреждения повреждения ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь композиции микроэлементов и/или клетки вводят до, во время и/или после лечения, которое будет или, вероятно, будет вызывать повреждение ткани у индивидуума, и такое введение будет способствовать предупреждению или ослаблению повреждения ткани, ассоциированному с лечением, таким как лучевая терапия и химиотерапия рака.

В некоторых аспектах изобретения описанные здесь композиции или способы применяют для предупреждения повреждения ткани или снижения площади, объема или времени повреждения ткани путем индуцирования миграции (например, хоминга) стволовых клеток в участок ткани даже после потери природной способности тканей индивидуума к спонтанному рекрутингу стволовых клеток. В других аспектах изобретения введение композиции и/или клеток согласно изобретению запускает серию других событий, приводящих к повышению резистентности к повреждению тканей, включая, например, индуцирование дифференцировки стволовых клеток в участок ткани, индуцирование регенерации ткани в участке ткани, индуцирование передающей сигнал молекулы, которая запускает регенерацию ткани, устранение повреждения в участке первичного повреждения еще до возникновения другого повреждения и/или реконструирование микроокружения нейрофибриллярных клеток и нейросекреторных клеток в участке ткани.

Так, например, ишемия или инфаркт миокарда могут приводить к необратимой потере функциональной ткани сердца с возможным нарушением функции накачки крови и к гибели этой ткани. Оклюзия коронарных сосудов приводит к прерыванию кровоснабжения зависимой капиллярной системы. В отсутствие питания и кислорода кардиомиоциты погибают и подвергаются некрозу. Воспаление окружающей ткани происходит одновременно с инвазией воспалительных клеток и фагоцитозом клеточного дебриса. В результате появляются фиброзные рубцы, и это приводит к потере вносимого ранее вклада этой части сердца в его сократительную способность. В отсутствие лечения единственным механизмом компенсации потери ткани сердечной мышцей является гипертрофия остаточных кардиомиоцитов (аккумуляция клеточного белка и сократительных элементов внутри клетки). Эндокринные и метаболические агенты (спирт) или инфекционные (вирусный миокардит) агенты и средства для лечения рака также способствуют гибели клеток и снижают функцию миокарда. В некоторых аспектах изобретения описанные здесь композиции или способы применяют для предупреждения повреждения ткани сердца или снижения площади, объема или времени повреждения ткани сердца. В одном из аспектов изобретения описанная здесь композиция микроэлементов индуцирует миграцию (например, хоминг) и/или удержание мезенхимальных стволовых клеток (например, BMSC) в ткани сердца. В одном из аспектов изобретения в случае ишемии или инфаркта миокарда, потеря ткани сердечной мышцей может компенсироваться посредством дифференцировки стволовых клеток в кардиомиоциты, что позволит избежать гипертрофии сердца или снизить ее уровень и предотвратить дальнейшее повреждение сердечной ткани.

Доставка микроэлементов

Используемый здесь термин "микроэлемент" означает химический элемент, который содержится в небольших количествах в растениях, у животных и/или в почве и который утилизируется организмами, включая растения и животные, и играет важную или полезную роль в их физиологии. Используемые здесь термины "следовые количества металлов", "микроэлементы" и "очень малые количества соединений" являются синонимами. Хотя во многих случаях, представляющий интерес микроэлемент присутствует в виде ионных комплексов, однако, он включает ионы различных видов, образующиеся после введения микроэлемента в клетку, ткани или организм согласно изобретению. Каждый из этих терминов включает продукты реакций, образующиеся в клетке, в ткани или в организме согласно изобретению. Подходящими микроэлементами являются, но не ограничиваются ими, B, Sc, Ti, V, Cr, Mn, Mg, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Ga, Ge, As, Se, Br, Al, Si, P, Y, Zr, Nb, Mo, Tc, Ru, Rh, Rb, Ce, Ag, Pd, Ag, Cd, In, Sn, Sb, F, Te, Au, Pt, Bi, Ir, Os, Re, W, Ta и Hf. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлемент выбран из группы, состоящей из Al, Cd, Rb, Zr, Co, Sn, Cr, Ni, F, Mn, Mg, Mo, Ge, V, Br, I, Ba, Ag, Ti, Se, Cu и Zn. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлементом является медь (например, в форме CuSO₄ или CuCl₂). В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент присутствует в виде соли. В других вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует соединение или комплекс с белком, пептидом, аминокислотой или моно-, ди- или полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует соединение или комплекс с одним или более полимерами. В других вариантах осуществления изобретения микроэлементом является металлооргани-

ческое соединение, такое как низкомолекулярное металлоорганическое соединение. В одном из вариантов осуществления изобретения описанный здесь микроэлемент регулирует транскрипционную активность HIF-1. В одном из аспектов изобретения, микроэлемент, такой как медь, представляет собой индуктор транскрипционной активности HIF-1. Описанный здесь индуктор транскрипционной активности HIF-1 может содержать один или более металлов, включая микроэлемент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент может быть доставлен посредством микропузырьков. Применение ультразвуковых контрастирующих агентов, служащих также в качестве носителей лекарственных средств для заполненных газом липосом, было также описано в патенте США 5580575. В систему кровообращения пациента вводят определенное количество липосом, содержащих лекарственное средство, а затем проводят мониторинг с использованием ультразвуковой энергии на диагностическом уровне до тех пор, пока в представляющей интерес области не будет обнаружено присутствие липосом. Затем в эту область подают ультразвуковую энергию на уровне, достаточном для разрыва липосом и высвобождения лекарственных средств в определенном участке в терапевтических целях. Ультразвуковая энергия, описанная в патенте США 5558082, подается посредством трансдуктора, который одновременно формирует диагностические и терапевтические ультразвуковые волны, исходящие от терапевтических элементов трансдуктора, расположенных в центральной части по отношению к диагностическим элементам трансдуктора.

Применение заполненных газом микрокапсул (или используемых здесь микропузырьков) для регулируемой доставки лекарственных средств в нужный участок организма также описано в патенте США 5190766, где акустическую резонансную частоту носителя лекарственного средства измеряют в области, в которую высвобождается лекарственное средство, а затем эту область обрабатывают соответствующими звуковыми волнами для регуляции высвобождения лекарственного средства. Отдельные ультразвуковые трансдукторы применяются для визуализации и запуска высвобождения лекарственного средства в область-мишень. В CN 102302507 В описаны композиции для прямого регулируемого высвобождения микроэлементов и способ их получения и применения, включая композиции, содержащие микропузырьки.

Используемыми здесь репрезентативными микропузырьками являются, например, стабилизированные микропузырьки, обработанный ультразвуком альбумин, заполненные газом микросферы, заполненные газом липосомы и газообразующие эмульсии. Для их получения были разработаны различные методы. Эти методы обычно включают методы сушки распылением, эмульсионную или межфазную полимеризацию. В результате этого обычно образуется популяция микропузырьков, имеющих диаметры в определенном диапазоне с фиксированной или произвольно изменяющейся толщиной стенки. Так, например, ультразвуковой контрастирующий агент, полученный одним из этих методов, может содержать микропузырьки, каждый из которых имеет стенку оболочки одной и той же толщины независимо от ее диаметра. Альтернативно, в другом методе получения микропузырьков может быть создана популяция микропузырьков с толщиной стенки, варьирующейся даже для микропузырьков, имеющих один и тот же диаметр. Микропузырьки могут быть получены любым из нижеследующих фармацевтических методов, таких как ультразвуковая акустическая вибрация, сушка вымораживанием, сушка распылением, "живая"/регулируемая радикальная полимеризация, осадительная полимеризация, суспензионная полимеризация, эмульсионная полимеризация, затравочная полимеризация, дисперсионная полимеризация и гетерогенная система полимеризации, включающая осадительную полимеризацию и дисперсионную полимеризацию; перекрестное связывание ионов, связывание геля с эмульгированным ионом, преципитация ионов и химическое перекрестное связывание, эмульсионное химическое перекрестное связывание, двойное эмульгирование и перекрестное связывание, тепловое перекрестное связывание, коацервация, эмульгирование-выпаривание растворителя или любые их комбинации. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь микропузырьки представляют собой носитель для терапевтических средств и имеют внутреннюю загрузку лекарственным средством. Затем микропузырьки внутривенно вводят для системного поступления в кровоток. Ультразвуковой сигнал с энергией, достаточной для разрыва микропузырьков, содержащих лекарственное средство, доставляют в область, необходимую для введения лекарственного средства. Звуковой луч разрушает микропузырьки и таким образом высвобождает их полезную нагрузку.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанные здесь микропузырьки имеют регулируемую хрупкость, то есть, способность разрываться только при подаче акустической энергии, равной или превышающей энергию предварительно определенной интенсивности. То есть, в условиях ниже порога акустической интенсивности, в основном, все микропузырьки остаются интактными, а в условиях выше порога акустической интенсивности микропузырьки разрываются. Агенты микропузырьков в их интактном состоянии могут быть обнаружены при ультразвуковой обработке в более крупном кровяном пуле, а поэтому, в представляющую интерес область может быть помещен сонограф и сканирующий трансдуктор с последующим повышением интенсивности ультразвука для инициации разрушения агента и одновременной доставки лекарственного средства. Таким образом, агент может быть "включен" или "выключен" посредством регуляции интенсивности звукового сигнала.

В одном из вариантов осуществления изобретения микропузырьки могут быть получены путем вы-

паривания растворителя из эмульсии. Сначала получают два раствора. Одним из этих растворов является водный раствор, содержащий соответствующее поверхностно-активное вещество, которое может представлять собой амфифильный биополимер, такой как желатин, коллаген, альбумин или глобулины. Могут быть дополнительно включены загустители. В результате этого образуется внешняя непрерывная фаза эмульсионной системы. Второй раствор получают путем растворения полимера, образующего стенку, в смеси двух не смешиваемых с водой органических жидкостей. Одной из органических жидкостей является относительно летучий растворитель для полимера, а другой жидкостью является относительно нелетучий агент для полимера, не являющийся растворителем. Относительно нелетучим нерастворителем обычно является C_6 - C_{20} -углеводород, такой как декан, ундекан, циклогексан, циклооктан и т.п. Относительно летучим растворителем обычно является сложный C_5 - C_7 -эфир, такой как изопропил-ацетат. При этом могут быть использованы и другие растворители для полимера, например, метиленхлорид, при условии, что они будут смешиваться с сопутствующим нерастворителем. Обычно приблизительно три части органического полимерного раствора, имеющего концентрацию приблизительно 0,5-10 процентов полимера, добавляют к одной части водного раствора биоматериала, имеющего концентрацию приблизительно 1-20%. Полимер, образующий стенку, может быть выбран по его модулю упругости и элонгации, определяющему механические свойства полимера.

Предпочтительными полимерами, используемыми для приготовления ультразвукового контрастирующего агента микропузырьков, несущих лекарственное средство, являются биологически разлагаемые полимеры, такие как поливиниловый спирт (ПВС), поликаролактон, полимолочная кислота, сополимеры полимолочной и полигликолевой кислоты, сополимеры лактидов и лактонов, такие как эпсилон-капролактон, дельта-валеролактон, полиамиды, полигидроксibuтираты, полидиоксаноны, поли-бета-аминокетоны, полиангидриды, поли(орто)эфиры и полиаминокислоты, такие как полиглутаминовая и полиаспарагиновая кислоты или их сложные эфиры, и любая подходящая их комбинация. Полимерный раствор (внутреннюю органическую фазу) добавляют к водному раствору (к внешней фазе) при перемешивании с образованием эмульсии. Для получения эмульсий могут быть использованы различные устройства, например, коллоидные мельницы, роторные/статорные гомогенизаторы, гомогенизаторы высокого давления и ультразвуковые гомогенизаторы. Стадию эмульгирования осуществляют до образования капелек внутренней фазы с нужным размером спектра. По размеру этих капелек определяют размер микропузырьков.

Микроэлемент (например, медь) может быть включен в микропузырьки различными методами. В одном из методов, например, лекарственные средства растворяют в органическом полимерном растворе или вводят каким-либо другим способом в процессе получения микропузырьков. Альтернативно, лекарственное средство может быть введено в микропузырьки посредством серии дополнительных стадий, где конечный продукт разводят раствором, содержащим лекарственное средство, а затем, полученные суспендированные микропузырьки заливают раствором, содержащим лекарственное средство, и полученный продукт сушат, обычно, путем лиофилизации. И, наконец, лекарственное средство может быть присоединено к поверхности микропузырьков химическими методами. Предпочтительные методы включения обеспечивают продуцирование микропузырьков, несущих лекарственное средство, которые, после их разрыва посредством звуковой обработки, будут способны доставлять активный агент в кровь или в другие необходимые физиологические жидкости. Могут быть также применены методы включения лекарственного средства в структуру стенки микропузырьков или его присоединения к поверхности. В этом случае механические свойства стенки должны быть выбраны так, чтобы они обеспечивали разрыв микропузырьков с последующим высвобождением очень небольших фрагментов стенки и доставку лекарственного средства в нужный участок. Дополнительное описание, относящееся к доставке лекарственных средств, запускаемой ультразвуком, с использованием полых микропузырьков, можно найти в патенте США 6896659.

В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляется посредством пептидных наночастиц, содержащих медь. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанная здесь пептидная наночастица содержит пептиды, подвергающиеся самосборке (например, ароматические дипептиды). Эти пептиды собирают в наночастицы, такие как гидрогелевые наночастицы, которые могут быть эффективно использованы, например, в терапевтических и диагностических целях в качестве носителей для доставки биоактивных агентов. В некоторых аспектах изобретения гидрофильные и гидрофобные биоактивные вещества, низкомолекулярные лекарственные средства, визуализирующие агенты, такие как магнитные или золотые наночастицы, а также высокомолекулярные биомолекулы, такие как пептиды, белки, кРНК и ДНК, могут быть доставлены посредством пептидных наночастиц согласно изобретению. В некоторых вариантах осуществления изобретения, наночастицы модифицируют биологической или синтетической молекулой для повышения стабильности, эффективности и/или биодоступности. В некоторых вариантах осуществления изобретения, средний диаметр наночастиц составляет в пределах от 10 до 1000 нм или от 10 до 500 нм. В некоторых вариантах осуществления изобретения наночастица имеет ультраструктуру с улучшенной доставкой и более длительной стабильностью *in vivo* и/или с другими функциональными свойствами. Дополнительное описание пептидных наночастиц можно найти в WO 2014132262 A1.

Носитель (такой как наночастицы), содержащий микроэлемент, может быть нацелен (например, посредством специфических химических взаимодействий, таких как связывание антиген-антитело и т.д.) или доставлен в участок повреждения. В некоторых аспектах изобретения обработка ткани может быть осуществлена путем нецелевой доставки, например путем погружения ткани в материал из наночастиц с помощью пипетки или микропипетки для введения материала из наночастиц в ткань, впрыскивания материала из наночастиц в ткань, нанесения материала из наночастиц на ткань, или объединения наночастиц с другими ингредиентами, такими как один или более полимеров и/или один или более белков или их комбинаций. Примерами являются, но не ограничиваются ими, альбумин, фибриноген, коллаген, эластин, фибронектин, ламинин, хитозан, основной фактор роста фибробластов или фактор роста васкулярных эндотелиальных клеток, тромбоцитарный фактор роста, эпидермальный фактор роста или инсулин-подобный фактор роста. В других аспектах изобретения одна или более других химических групп или молекул могут быть использованы в комбинации с наночастицами, содержащими микроэлементы. Эти молекулы могут иметь дополнительные или вспомогательные терапевтические или диагностические свойства. Наночастицы могут быть химически связаны с этими другими компонентами, или они могут быть доставлены просто в виде смеси с ними. Так, например, наночастицы могут быть связаны с антителом. Способ репарации может включать использование наночастиц только одого типа или наночастиц более чем одого типа. Наночастицы могут содержать один или более микроэлементов.

В одном из аспектов изобретения пассивное нацеливание или доставка могут быть реализованы с помощью физического эффекта, индуцирующего высвобождение или доставку в участок повреждения посредством наночастицы (или микросферы). Так, например, магнитные альбуминовые микросферы могут быть синтезированы путем включения микроэлементов и магнитного вещества в микросферу с альбуминовой оболочкой. Магнитные альбуминовые микросферы после их введения в организм могут быть доставлены в участок повреждения посредством внешних сил магнитного поля. Направленное замедленное высвобождение микроэлементов может быть достигнуто для повышения терапевтического эффекта и предотвращения токсического побочного эффекта. В другом аспекте изобретения позитивный таргетинг или доставка могут быть реализованы путем синтеза носителей, способных автоматически распознавать клетки органа-мишени или ткани-мишени. Так, например, реакция антиген-антитело опосредует автоматическое распознавание альбуминовых микросфер. Поверхность таких микросфер может быть снабжена специфическим антителом или полипептидом, который обладает способностью связывания с определенными клетками для целевой доставки микроэлементов. Помимо микросфер пассивная целевая доставка, опосредуемая липосомами и наночастицами, и позитивная целевая доставка, опосредуемая рецепторными или полипептидными структурами, может быть также использована для транспорта микроэлементов в целях достижения эффективной концентрации. В некоторых вариантах осуществления микроэлемент доставляется путем прямого введения микроэлемента в участок повреждения. Другие подходящие способы включают способы введения *in vitro*, *ex vivo* или *in vivo*. В некоторых аспектах изобретения, описанную здесь композицию микроэлементов перорально вводят в участок повреждения ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент или соединение, содержащее микроэлемент (например, ион меди, атом меди или хелатный комплекс меди), всасываются через пищеварительный тракт. В одном аспекте изобретения поглощенный микроэлемент доставляют (путем активного или пассивного нацеливания) в участок повреждения, и этот микроэлемент высвобождается локально в участок повреждения, в результате чего обеспечивается эффективная локальная концентрация микроэлемента для репарации ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения перорально введенный микроэлемент образует соединение или комплекс с белком, пептидом, аминокислотой или моно-, ди- или полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует соединение или комплекс с одним или более полимерами. В других вариантах осуществления изобретения микроэлемент присутствует в металлорганическом соединении, таком как низкомолекулярное металлорганическое соединение.

В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют в участок повреждения с помощью имплантата с покрытием, стента или пластинки, или имплантата, пропитанного микроэлементом. В одном из вариантов осуществления изобретения микроэлемент доставляют в участок повреждения путем медленного высвобождения микроэлемента из внутрисосудистого стента, к которому прикреплен микроэлемент. В других вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляют в участок повреждения посредством липосом для позитивной доставки или комплекса акцептор-донор. В некоторых аспектах изобретения микроэлемент доставляют в участок повреждения с помощью физикотерапевтических средств, ультразвука, ионтофореза, усиления проникновения под действием ультразвука, электропорации и/или применения губок. Композиция и/или клетки могут быть доставлены на участок повреждения местно (например, через кожу), и в определенное место в поврежденной ткани, которое находится на внутренней поверхности тела или в оба участка. Так, например, микроэлемент может быть доставлен с помощью ионтофореза через кровеносный сосуд, слой эндотелиальных клеток или другие внутренние ткани, на место повреждения, чтобы обеспечить эффективную локальную концентрацию микроэлемента для репарации тканей.

В одном аспекте изобретения описан аппликатор для доставки описанной здесь композиции микро-

элементов и/или клеток, в участок повреждения. Аппликатором может быть любое подходящее устройство для доставки описанных здесь композиций различных типов. Аппликатор может быть иметь конфигурацию, подходящую для контактирования поверхности тела с композицией посредством распыления, закапывания, нанесения, накачивания, увлажнения, аэрозольного распыления или инъекции, либо он может иметь конфигурацию, подходящую для нанесения композиции и/или клеток с применением любой комбинации таких методов. Композиция и/или клетки могут быть доставлены на участок повреждения местно, и в определенный участок в поврежденной ткани, который находится на внутренней поверхности тела или в оба участка, а поэтому аппликатор может иметь соответствующую конфигурацию. В некоторых вариантах осуществления изобретения аппликатор имеет конфигурацию, подходящую для доставки композиции, которая представляет собой жидкость, в участок повреждения. Сопла для закапывания, увлажнения, аэрозольного распыления или обработки потоком пара (например, в прямом или завихренном потоке) или жидкости хорошо известны специалистам. Аппликатор может быть сконструирован для "намазывания" композиции на поверхность тела, например, в виде щетки, валика или каландра. Аппликаторы для введения композиции в участок повреждения включают иглы, такие как иглы для нано- или микроинъекций. Аппликатор может быть сконструирован для нанесения композиции с помощью ионтофореза, усиления проникновения под действием ультразвука, электропорации, применения губки или любого другого подходящего способа. Предпочтительно аппликатор сконструирован таким образом, чтобы доставка композиции в участок повреждения была осуществлена пространственно точно в пределах терапевтически приемлемого предела погрешности.

В некоторых аспектах изобретения описанную здесь композицию микроэлементов перорально вводят в участок повреждения ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент или соединение, содержащее микроэлемент (например, ион меди, атом меди или хелатный комплекс меди) всасываются через пищеварительный тракт. В одном из аспектов изобретения поглощенный микроэлемент доставляют (путем активного или пассивного нацеливания) в участок повреждения, в результате чего обеспечивается эффективная локальная концентрация микроэлемента для репарации ткани. В некоторых вариантах осуществления изобретения перорально введенный микроэлемент образует соединение или комплекс с белком, пептидом, аминокислотой или моно-, ди- или полисахаридом. В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент образует соединение или комплекс с одним или более полимерами. В других вариантах осуществления изобретения микроэлемент присутствует в металлоорганическом соединении, таком как низкомолекулярное металлоорганическое соединение.

При использовании для терапии *in vivo* композицию микроэлемента и/или клетки вводят индивидууму в эффективных количествах (т.е. в количествах, которые дают желаемый терапевтический и/или профилактический эффект). Доза и схема приема доз будет зависеть от степени повреждения у индивидуума, свойств конкретно используемых композиций микроэлементов и/или клеток, например, их терапевтических индексов, от конкретного индивидуума и истории болезни индивидуума.

Эффективное количество может быть определено в ходе преклинических испытаний и клинических испытаний методами, известными врачам и клиницистам. Эффективное количество композиции микроэлементов и/или клеток, используемых в этих методах, можно вводить млекопитающему, нуждающемуся в этом, любым из ряда хорошо известных способов введения фармацевтических соединений, либо системно, либо местно.

Доставка микроэлементов непосредственно в участок повреждения

В одном из аспектов изобретения микроэлементы доставляются непосредственно в участок повреждения, либо путем прямой инъекции в поврежденную ткань или с помощью имплантата с покрытием, помещенным в физический контакт с участком повреждения. Это позволяет микроэлементу оставаться на участке доставки в течение длительного периода времени, в результате чего создается градиент микроэлемента с самой высокой концентрации в участке повреждения. Такой градиент микроэлемента обеспечивает рост кровеносных сосудов в участке повреждения, способствуя тем самым регенерации окружения кровеносных микрососудов в участке повреждения и, следовательно, регенерации ткани. В одном из вариантов осуществления изобретения, описанный здесь микроэлемент регулирует транскрипционную активность NIF-1. В одном из аспектов изобретения, микроэлемент, такой как медь, является индуктором транскрипционной активности NIF-1. Описанный здесь индуктор транскрипционной активности NIF-1 может содержать один или более металлов, включая микроэлемент.

В некоторых вариантах осуществления изобретения прямая доставка микроэлемента в поврежденную ткань предотвращает или уменьшает нежелательные побочные эффекты, связанные с системным введением. В некоторых аспектах изобретения прямая доставка в участок повреждения позволяет избежать системной токсичности, ассоциированной с лекарственным средством или агентом и/или индуцированием системных воспалительных ответов, таких как цитокиновый "шторм".

В некоторых вариантах осуществления изобретения микроэлемент доставляется в участок повреждения с помощью имплантата с покрытием, стента или пластинки или имплантата, пропитанного микроэлементом. В некоторых аспектах изобретения прямая доставка в участок повреждения включает локализованную доставку в обрабатываемый участок внутри кровеносного сосуда или ткани. Подходящие системы доставки включают, но не ограничиваются ими, двойные системы баллонной доставки, имею-

щие проксимальные и дистальные баллоны, которые одновременно накачивают для изоляции пространства обработки в просвете артерии. В этом случае катетер проходит между двумя баллонами для локальной доставки терапевтического средства. Другие системы локализованной баллонной доставки включают пористые баллонные системы, покрытые гидрогелем баллоны и пористые баллоны, которые имеют внутренний металлический стент. Другие системы включают локально размещенные металлические стенты с покрытием, нагруженные лекарственным средством, и полимерные стенты, заполненные лекарственным средством. Wilensky et al., *Methods and Devices for Local Drug Delivery in Coronary and Peripheral Arteries*, *Trend Cardiovasc Med*, vol. 3 (1993).

В одном из аспектов изобретения длительная доставка микроэлемента в участок повреждения обеспечивает введение относительно небольших количеств агента в поврежденную ткань в течение длительного периода времени. В одном из вариантов осуществления изобретения длительное лечение дает результаты, которые не могут быть достигнуты при экстренной терапии высокими дозами агента, меньшими дозами и менее токсичными дозами агента. В одном из аспектов изобретения длительная доставка микроэлемента в участок повреждения способствует высвобождению агента приблизительно в течение более чем 12 ч, приблизительно в течение одного дня, приблизительно в течение двух дней, приблизительно в течение одной недели, приблизительно в течение двух недель, приблизительно в течение одного месяца, приблизительно в течение двух месяцев, приблизительно в течение шести месяцев, приблизительно в течение девяти месяцев, приблизительно в течение одного года, приблизительно в течение полутора лет или приблизительно в течение двух лет.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанная здесь пролонгированная доставка композиции включает длительные инъекции (например, инъекции на масляной основе, инъекции суспензий, инъекции микросфер и инъекцируемые *in situ* системы), содержащие микроэлемент, агенты и полимеры для депо-инъекций, коммерчески доступные депо-инъекции и инъекцируемые системы доставки пролонгированного высвобождения. В некоторых вариантах осуществления изобретения описанная здесь композиция для пролонгированной доставки содержит полимерную матрицу, из которой агент высвобождается посредством диффузии и/или деградации полимерной матрицы. Следовательно, паттерн высвобождения агента определяется, главным образом, полимерной матрицей, а также процентом загрузки и способом изготовления. В некоторых вариантах осуществления изобретения в препаратах пролонгированного высвобождения используют биоразлагаемый полимер. В этом случае препараты пролонгированного высвобождения не требуют их хирургического удаления у индивидуума. Обычно такие препараты медленно разлагаются и поглощаются в организме пациента, и, в конечном счете, утилизируются вместе с другими растворимыми продуктами обмена веществ.

В одном из аспектов изобретения полимерная система для депо-инъекций используется в целях доставки образованного *in situ* имплантата, содержащего микроэлемент, в участок повреждения. Образующиеся *in situ* системы имплантатов обычно изготавливают из биоразлагаемых продуктов, которые могут быть инъекцированы с помощью шприца в организм, и после такой инъекции отверждаются с образованием твердого биоразлагаемого имплантата.

В некоторых вариантах осуществления изобретения имплантат получают из термопластичных паст, перекрестно связанных полимеров *in situ*, путем осаждения полимера *in situ*, термоиндуцированного гелеобразования или их отверждающихся *in situ* органических гелей. Механизм формирования депо-препарата из термопластичных паст позволяет получить полутвердое вещество при его охлаждении до температуры тела после инъекции в организм в расплавленном виде. Перекрестно-сшитые полимерные сети могут быть получены *in situ* различными способами с образованием твердых полимерных систем или гелей. Методы получения перекрестно-сшитых систем *in situ* включают свободнорадикальные реакции, обычно инициируемые путем нагревания или поглощения фотонов, или ионные взаимодействия между небольшими катионами и полимерными анионами. Продукты *in situ* могут быть получены путем осаждения полимера из раствора. Не растворимый в воде и биоразлагаемый полимер растворяют в биосовместимом органическом растворителе, к которому добавляют лекарственное средство с образованием раствора или суспензии после смешивания. При введении этого препарата в организм, смешиваемый с водой органический растворитель рассеивается и вода проникает в органическую фазу. Это приводит к разделению фаз и осаждению полимера, образующего депо в участке инъекции. Термоиндуцированные системы гелеобразования обнаруживают термообратимые переходы золь/гель и характеризуются более низкой критической температурой раствора. Они являются жидкими при комнатной температуре и образуют гель при температуре, равной и выше нижней критической температуры раствора. Отверждающиеся органические гели *in situ* содержат не растворимые в воде амфифильные липиды, которые набухают в воде и образуют лиотропные жидкие кристаллы различных типов.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанная здесь композиция с пролонгированным высвобождением содержит биоразлагаемый полимер для контролируемой доставки микроэлемента. Подходящими биоразлагаемыми полимерами обычно являются полилактиды (PLA), полигликолиды (PGA), сополимеры лактида и гликолида (PLGA), поли(ϵ -капролактон) (PCL), полигликонат, полиангидриды, полиортоэфир, полидиоксанон и полиалкилцианоакрилаты. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиция с пролонгированным высвобождением содержит инъекцируемые биоразла-

гаемые микросферы, такие как микросферы из PLGA, микросферы из PCL, микросферы из полиангидрида, микросферы из полиортоэфиров и микросферы из полиалкилцианоакрилата.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, прямую доставку осуществляют путем введения наночастиц, содержащих медь (или других микроэлементов) в участок повреждения. В некоторых аспектах изобретения, описанный здесь материал из наночастиц включает частицы, имеющие размеры приблизительно от 1 до приблизительно 5000 нм. В некоторых аспектах изобретения, размеры наночастиц могут варьироваться в широких пределах, от самых больших размеров (например, диаметром сферы, шириной пластинки, длиной палочки и т.д.) в пределах приблизительно от 1 до 1000 нм, и до самых меньших размеров (например, диаметром палочки, толщиной пластинки и т.д.) в пределах приблизительно от 0,1 до 100 нм.

Наночастицы могут иметь любую форму или морфологию. Так, например, они могут представлять собой металлические коллоиды, такие как коллоидное золото или коллоидное серебро. Наночастицы могут представлять собой фуллерены, которые являются доступными в виде наносферических и нанотрубчатых структур. В некоторых вариантах осуществления изобретения, наночастицы могут иметь структуру ядро/оболочка, такую как нанооболочка. В некоторых вариантах осуществления, наночастицы могут представлять собой сферы, плоские или изогнутые пластины и линейные или изогнутые удлиненные частицы, которые могут иметь любое поперечное сечение, включая круговое, кольцевое, многоугольное, нерегулярное и т.п. (например, удлиненные цилиндры, трубки, столбчатые формы с многоугольными поперечными сечениями, лентообразные частицы и т.п.), а также другие правильные или неправильные геометрические формы.

Материалы из наночастиц, содержащие микроэлемент, могут быть нацелены (например, посредством специфических химических взаимодействий, таких как связывание антиген-антитела и т.п.) или непосредственно доставлены в участок повреждения. В некоторых аспектах изобретения обработка поверхностей ткани может быть осуществлена путем нецелевой доставки, например, путем погружения ткани в материал из наночастиц с помощью пипетки или микропипетки для введения материала из наночастиц в ткань, впрыскивания материала из наночастиц в ткань, нанесения материала из наночастиц на ткань или объединения наночастиц с другими ингредиентами, такими как один или более полимеров и/или один или более белков или их комбинаций. Примерами являются, но не ограничиваются ими, альбумин, фибриноген, коллаген, эластин, фибронектин, ламинин, хитозан, основной фактор роста фибробластов или фактор роста васкулярных эндотелиальных клеток, тромбоцитарный фактор роста, эпидермальный фактор роста или инсулинподобный фактор роста. В других аспектах изобретения одна или более других химических групп или молекул могут быть использованы в комбинации с наночастицами, содержащими микроэлементы. Эти молекулы могут иметь дополнительные или вспомогательные терапевтические или диагностические свойства. Наночастицы могут быть химически связаны с этими другими компонентами, или они могут быть доставлены просто в виде смеси с ними. Например, наночастицы могут быть связаны с антителом. Способ репарации может включать использование наночастиц только одного типа или наночастиц более чем одного типа. Наночастицы могут содержать один или более микроэлементов.

Полимерами, из которых могут быть образованы наночастицы, являются полимеры, которые являются природными и синтетическими, биоразлагаемыми или биологически неразлагаемыми, гомополимерными или сополимерными, термопластичными или нетермопластичными и т.п. Подходящие полимеры для образования наночастиц могут быть выбраны, например, из таких полимеров, как полимеры поликарбонновых кислот и сополимеры, включая полиакриловые кислоты; полимеры и сополимеры ацетата; акрилатные и метакрилатные полимеры и сополимеры (например, н-бутилметакрилат), полимеры и сополимеры целлюлозы, включая ацетаты целлюлозы, нитраты целлюлозы, пропионаты целлюлозы, ацетат-бутираты целлюлозы, целлофаны, искусственные шелки, триацетаты искусственного шелка, и эфиры целлюлозы, такие как карбоксиметилцеллюлозы и гидроксилалкилцеллюлозы; полимеры и сополимеры полиоксиметилена; полимеры и сополимеры полиимида, такие как блоксополимеры эфира и имида, полиамидимиды, имиды сложного полиэфира и имиды полиэфира; полимеры и сополимеры полисульфона, включая полиарилсульфоны и полиэфирсульфоны; полимеры и сополимеры полиамида, включая поликапролактамы и полиакриламиды; смолы, включая алкидные смолы, феноловые смолы, мочевиновые смолы, меламиновые смолы, эпокисмолы, аллиловые смолы и эпоксидные смолы; поликарбонаты; полиакрилонитрилы; поливинилпирролидоны (перекрестносшитые и другие); полимеры и сополимеры виниловых мономеров, включая поливиниловые спирты, поливинилгалогениды, такие как поливинилхлориды, сополимеры этилена-винилацетата (EVA), поливинилиденхлориды, поливиниловые эфиры, такие как поливинилметилловые эфиры, полистиролы, сополимеры стирола и малеинового ангидрида, сополимеры стирола и бутадиена, сополимеры стирола-этилена-бутилена (например, сополимер полистирола-полиэтилена/бутилена-полистирола (SEBS), сополимеры стирола-изопрена (например, полистирола-полиизопрена-полистирола), сополимеры акрилонитрила-стирола, сополимеры акрилонитрила-бутадиена-стирола, сополимеры стирола-бутадиена и сополимеры стирола-изобутилена (например, блоксополимеры полиизобутилена-полистирола, такие как SIBS), поливинилкетоны, поливинилкарбазолы и поливиниловые сложные эфиры, такие как поливинилацетаты; полибензимидазолы; иономеры; полиме-

ры и сополимеры полиалкилоксида, включая полиэтиленоксида (PEO); гликозаминогликаны; сложные полиэфиры, включая полиэтилентерефталаты и алифатические полиэфиры, такие как полимеры и сополимеры лактида, эpsilon-капролактона, гликолида (включая гликолевую кислоту), гидроксипропирата, гидроксивалерата, пара-диоксанона, триметиленкарбоната (и его алкильных производных); полимеры и сополимеры полиэфира, включая полиарилловые эфиры, такие как полифениленовые эфиры, полиэфиркетоны, полиэфир-эфир кетона; полифениленсульфиды; полиизоцианаты; полимеры и сополимеры полиолефина; полиолефиновые эластомеры (например, сантопрен), каучуки на основе мономеров этилен-пропилен-диена (EPDM), фторированные полимеры и сополимеры, включая политетрафторэтилены (PTFE), сополимер тетрафторэтилена и гексафторпропена (FEP), модифицированные сополимеры этилена и тетрафторэтилена (ETFE) и поливинилиденфториды (PVDF); силиконовые полимеры и сополимеры; полиуретаны; полимеры п-ксилилена; полииминокarbonаты; сополимеры эфира и сложного эфира, такие как сополимеры полиэтиленоксида и полимолочной кислоты; полифосфазины; полиалкиленоксалаты; полиоксаамиды и полиоксаэфиры (включая соединения, содержащие аминоксигруппы и/или амидогруппы); полиортоэфиры; биополимеры, такие как полипептиды, белки, полисахариды и жирные кислоты (и их сложные эфиры), включая фибрин, фибриноген, коллаген, эластин, хитозан, желатин, крахмал, гликозаминогликаны, такие как гиалуроновая кислота; а также их смеси и другие сополимеры.

В других вариантах осуществления изобретения наночастицы могут быть образованы из одного или более металлов, например, выбранных, по существу, из нерадиоактивных металлов, таких как серебро, золото, платина, палладий, иридий, осмий, родий, титан, вольфрам и рутений, а также из сплавов металлов, таких как сплавы кобальта-хрома, сплавы никеля-титана, сплавы железа-хрома, сплавы кобальта-хрома-железа и сплавы никеля-хрома и т.п. В некоторых других аспектах изобретения наночастицы могут быть образованы из описанного здесь микроэлемента и могут быть использованы для доставки одного и того же микроэлемента или различных микроэлементов непосредственно в участок повреждения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, наночастицы могут быть образованы из одного или более подходящих неметаллических неорганических материалов, например, выбранных из таких материалов, как керамика на основе фосфата кальция (например, гидроксиапатита); кальций-фосфатное стекло, иногда называемое стеклокерамикой (например, биостекло); оксиды металлов, включая оксиды непереходных металлов (например, оксиды металлов Групп 13, 14 и 15 Периодической таблицы, включая, например, оксид алюминия) и оксиды переходных металлов (например, оксиды металлов из Группы 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 и 12 Периодической таблицы, включая, например, оксиды титана, циркония, гафния, тантала, молибдена, вольфрама, рения, иридия, и т.п.); углеродные материалы, такие как чистый и легированный углерод (например, фуллерены, углеродные нановолокна, одностенные волокна, так называемые углеродные нанотрубки, состоящие из "нескольких стенок" и из "множества стенок"), карбиды кремния и нитриды углерода; диоксид кремния, синтетические или природные силикаты, включая силикат алюминия, мономерные силикаты, такие как полиэдральные олигомерные силсеквиоксаны (POSS), включая различные функционализированные POSS и полимеризованные POSS, и филосиликаты, включая глины и слюды (которые, могут быть, но необязательно, интеркалированными и/или эксфолиативными), такие как монтмориллонит, гекторит, гидротальцит, вермикулит и лапонит.

В некоторых вариантах осуществления изобретения описанный здесь материал из наночастиц содержит один или более полимеров, один или более металлов или сплавов, и/или один или более подходящих неметаллических неорганических материалов.

В конкретных вариантах осуществления изобретения, медьсодержащие соединения различных типов могут быть использованы для местной доставки непосредственно в участок повреждения. Примерами подходящих растворов, содержащих ионы меди, являются растворы хлорида меди (I), хлорида меди (II), ацетата меди и сульфата меди. В других вариантах осуществления изобретения, подходящими используемыми цинк-содержащими растворами являются растворы хлорида цинка, ацетата цинка и сульфата цинка. В других вариантах осуществления изобретения, медь или цинк образуют соединение или комплекс с белком, пептидом, аминокислотой, моно-, ди- или полисахаридом, одним или более полимерами или с небольшой молекулой, и такое соединение или комплекс используют для прямой локализованной доставки в участок повреждения. В некоторых вариантах осуществления изобретения, металлоорганическое соединение, содержащее микроэлемент, используют для прямой локализованной доставки в участок повреждения.

В некоторых вариантах осуществления изобретения, концентрация ионов меди в медьсодержащей композиции, используемой для местной доставки непосредственно в участок повреждения, составляет приблизительно от 5 до 10 мкМ, приблизительно от 10 до 20 мкМ, приблизительно от 20 до 40 мкМ, приблизительно от 40 до 60 мкМ, приблизительно от 60 до 80 мкМ, приблизительно от 80 до 100 мкМ, приблизительно от 100 до 200 мкМ, приблизительно от 200 до 400 мкМ, приблизительно от 400 до 600 мкМ, приблизительно от 600 до 800 мкМ, приблизительно от 800 мкМ до 1 мМ, приблизительно от 1 до 5 мМ, приблизительно от 5 до 10 мМ, приблизительно от 10 до 20 мМ, приблизительно от 20 до 40 мМ или приблизительно от 40 до 60 мМ. Величины подходящих концентраций ионов цинка будут того же порядка, как и величины концентраций описанных выше медьсодержащих композиций. Концентрация микроэлемента может быть определена в ходе преclinical испытаний и clinical испытаний

методами, известными врачам и клиницистам.

В другом варианте осуществления изобретения микроэлемент вводят в участок повреждения, например, путем прямой чрезкожной пункции с помощью хирургического катетера, или путем внутривенозной инъекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, микроэлемент доставляют непосредственно в участок повреждения с помощью имплантата с покрытием, стента или пластинки или имплантата, пропитанного микроэлементом. В одном из вариантов осуществления изобретения, микроэлемент доставляют в участок повреждения путем медленного высвобождения микроэлемента из внутрисосудистого стента, к которому прикреплен микроэлемент. В одном из аспектов изобретения описан аппликатор для доставки описанной здесь композиции микроэлемента и/или клеток непосредственно в участок повреждения.

Повреждение ткани и ассоциированные с ним заболевания

Используемый здесь термин "повреждение ткани" относится к повреждению ткани, например сердечно-сосудистой системы, печени, головного мозга, скелетной мышцы и т.п. В некоторых вариантах осуществления изобретения, повреждением ткани является сердечно-сосудистая ишемия. В некоторых вариантах осуществления изобретения, повреждением ткани является фиброз печени. В некоторых вариантах осуществления изобретения, повреждением ткани является инсульт головного мозга. В некоторых вариантах осуществления изобретения повреждением тканей является ишемия нижних конечностей. В некоторых вариантах осуществления изобретения, повреждение тканей ассоциируется с диабетом, диабетической язвой стопы, некрозирующим энтероколитом, язвенным колитом, болезнью Крона, воспалительным заболеванием кишечника, рестенозом (после ангиопластики или имплантации стента), внутренними ранами, внешними ранами, хирургической операцией, случайной травмой, пролежнями, варикозными язвами, разрывом сухожилия, травмами голосовых связок, отитом среднего уха или панкреатитом.

В некоторых вариантах осуществления изобретения повреждение тканей ассоциируется с диабетом. В некоторых аспектах изобретения, повреждение тканей ассоциируется с диабетической стопой. Диабетическая стопа обычно вызывается сосудистыми и неврологическими осложнениями диабета в сочетании с персистентными условно-патогенными инфекциями и несоответствующим заживлением ран. В одном из аспектов изобретения, повреждением ткани является диабетическая язва стопы. В других аспектах изобретения повреждением ткани является диабетическая язва кожи.

Следовательно, описанные здесь способы, в основном, применимы ко многим заболеваниям, которые ассоциируются с повреждением тканей. Такими заболеваниями являются, но не ограничиваются ими, инфаркт миокарда, кардиомиопатия, аневризма, стенокардия, стеноз аорты, аортит, аритмии, артериосклероз, артериит, асимметричная гипертрофия перегородки (АГП), атеросклероз, фибрилляция и трепетание предсердий, бактериальный эндокардит, синдром Барлоу (пролапс митрального клапана), брадикардия, болезнь Бюргера (облитерирующий тромбангиит), кардиомегалия, кардит, болезнь сонной артерии, сужение аорты, врожденные пороки сердца, застойная сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца, синдром Айзенменгера, эмболия, эндокардит, эритромелалгия, аритмия, фиброзно-мышечная дисплазия, блокада сердца, шум в сердце, гипертензия, гипотензия, идиопатическая детская артериальная кальцификация, болезнь Кавасаки (синдром слизистой, кожи и лимфоузлов, заболевание слизистой, кожи и лимфоузлов, детский полиартерит), метаболический синдром, микрососудистая стенокардия, миокардит, пароксизмальная тахикардия предсердий (ППП), нодозный периартерит (полиартерит, нодозный полиартерит), перикардит, заболевание периферических сосудов, тяжелая ишемия конечностей, флебит, стеноз легочного клапана (пульмонарный стеноз), болезнь Рейно, стеноз почечной артерии, реноваскулярная гипертензия, ревматическая болезнь сердца, диабетическая васкулопатия, дефекты перегородки, бессимптомная ишемия, синдром Х, тахикардия, артерит Такаюсу, триада Фалло, транспозиция крупных сосудов, атрезия трехстворчатого клапана, артериоз туловища, заболевание сердечного клапана, варикозные язвы, варикозные вены, васкулит, дефект перегородки желудочка, синдром Вольфа-Паркинсона-Уайта, дефект эндокардиальной подушки, острая ревматическая лихорадка, острый ревматический перикардит, острый ревматический эндокардит, острый ревматический миокардит, хронические ревматические болезни сердца, заболевания митрального клапана, митральный стеноз, ревматическая недостаточность митрального клапана, заболевания клапана аорты, заболевания других эндокардиальных структур, ишемическая болезнь сердца (острая и подострая), грудная жаба, острое легочное сердце, эмболия легких, хроническое легочное сердце, кифосколиоз сердца, миокардит, эндокардит, эндомиокардиальный фиброз, эндокардиальный фиброэластоз, блокада предсердия и желудочка, аритмия сердца, дегенерация миокарда, сердечно-сосудистое заболевание, заболевание артерий, артериол и капилляров или заболевание вен и лимфатических сосудов; приобретенное повреждение головного мозга, травматическое повреждение головного мозга, инсульт (включая ишемию, интрацеребральную геморрагию, подпаутинную геморрагию), повреждение, вызываемое кислородным голоданием, нарушения обмена веществ, энцефалит и повреждение головного мозга из-за инфекции. В некоторых вариантах осуществления изобретения, заболеваниями, ассоциирующимися с повреждением тканей, являются системный саркоидоз, кожное заболевание или состояние, синдром Леффрена, легочное заболевание или состояние, сердечное заболевание или состояние, глазные заболевания или состояния, печеночное заболевание или состояние, скелетно-мышечное заболевание или состояние и почечное заболевание или со-

стояние. Таким образом, настоящая заявка также включает лечение любых заболеваний описанными здесь способами.

Наборы, композиции и промышленные изделия

В другом своем варианте, настоящее изобретение относится к наборам, содержащим по меньшей мере одну стволовую клетку и/или микроэлемент, описанные в настоящей заявке, и терапевтическую клеточную композицию, которая может быть получена в фармацевтически приемлемой форме, например, путем смешивания с фармацевтически приемлемым носителем, и аппликатор вместе с инструкциями по их применению. Наборы могут содержать контейнер отдельно от остальных компонентов набора. В некоторых вариантах осуществления изобретения, композиции и наборы могут содержать один или более из описанных здесь компонентов, таких как BMSC, микроэлемент, индуктор стволовых клеток и дополнительное терапевтическое средство.

В некоторых вариантах осуществления изобретения наборы содержат один или более компонентов, которые облегчают введение индивидууму BMSC, микроэлемента, индуктора стволовых клеток и/или дополнительного терапевтического средства. Так, например, в некоторых вариантах осуществления изобретения, набор содержит компоненты, которые облегчают введение индивидууму BMSC и/или микроэлемента и/или индуктора стволовых клеток в участок повреждения. В таких вариантах осуществления изобретения набор может содержать, например, шприцы и иглы, подходящие для доставки клеток индивидууму и т.п. В таких вариантах осуществления изобретения стволовые клетки или микроэлемент или индуктор стволовых клеток могут содержаться в наборе, в пакете или в одном или более флаконах. В некоторых других вариантах осуществления изобретения набор содержит компоненты, которые облегчают внутривенную или внутриартериальную доставку стволовых клеток или микроэлемента или индуктора стволовых клеток индивидууму. В таких вариантах осуществления изобретения стволовые клетки или микроэлемент или индуктор стволовых клеток могут содержаться, например, в бутылках или в пакете (например, в пакете для крови или в подобном пакете, который может вмещать приблизительно до 1,5 л раствора, содержащего клетки), и этот набор дополнительно содержит трубки и иглы, подходящие для введения стволовых клеток или микроэлемента или индуктора стволовых клеток индивидууму.

Кроме того, набор может включать одно или более соединений, которые ослабляют боль или воспаление у индивидуума (например, анальгетик, стероидное или нестероидное противовоспалительное соединение или т.п.). Набор может также содержать антибактериальное или противовирусное соединение (например, один или более антибиотиков), соединение, снижающее тревожное состояние у индивидуума; соединение, которое уменьшает иммунный ответ у индивидуума (например, циклоспорин А), и/или антигистамин (дифенгидрамин, лоратадин, дезлоратадин, кветиапин, фексофенадин, цетиризин, прометазин, хлорфенирамин, левоцетиризин, циметидин, фамотидин, ранитидин, низатидин, роксатидин, лафутидин или т.п.).

Кроме того, набор может содержать одноразовые, например, стерильные салфетки, одноразовые бумажные изделия, перчатки или т.п., которые облегчают приготовление препарата для введения индивидууму или снижают вероятность возникновения инфекции у индивидуума в результате введения стволовых клеток и/или микроэлемента, и/или индуктора стволовых клеток.

Нижеследующие неограничивающие примеры дополнительно иллюстрируют композиции и способы согласно изобретению. Специалистам в данной области техники будет понятно, что в настоящее изобретение могут быть внесены некоторые варианты, не выходящие за рамки существа и объема изобретения. Настоящее изобретение более подробно описано ниже со ссылкой на нижеследующие неограничивающие примеры. Представленные ниже примеры дополнительно иллюстрируют изобретение, но они не должны рассматриваться как ограничение объема изобретения.

Примеры

Пример 1ю Использование обработанных ультразвуком микропузырьков с Си-альбумином для улучшения хоминга BMSC при хронической ишемической болезни сердца

Для облегчения введения меди в этом эксперименте были использованы микропузырьки с Си-альбумином. После локализации и обработки ультразвуком медь высвобождалась из пузырьков в нужную область сердца с повышением концентрации меди в ишемической области. Пилотные эксперименты показали, что целевая добавка меди в сердце облегчает симптомы хронической ишемической болезни сердца. Кроме того, способы культивирования *in vitro* BMSC хорошо известны и BMSC являются подходящими клетками для мониторинга хоминга стволовых клеток.

Новозеландские белые кролики представляют собой одну из самых подходящих моделей в области исследования сердца. Кроме того, они идеально подходят для мониторинга хоминга аутологических BMSC. BMSC культивировали и метили, а затем вводили кроликам с инфарктом миокарда. После обработки микропузырьками с Си-альбумином проводили повторный хоминг BMSC в область, пораженную хронической ишемией сердца, с использованием флуоресцентной метки. Кроме того, в этом эксперименте использовали специфический блокатор оси SDF-1/CXCR4, AMD3100, для поиска механизмов хоминга BMSC при лечении ишемии сердца и при обработке микропузырьками, для выявления патогенеза инфаркта миокарда и получения теоретических данных для разработки новых методов терапии инфаркта миокарда.

Методы:

1. Экспериментальный ИМ (инфаркт миокарда) и обработка микропузырьками с Си-альбумином

(1) Взрослых самцов новозеландских белых кроликов выдерживали в условиях голодания за 12 ч до операции и перед проведением хирургической операции операционную стерилизовали в течение ночи путем облучения ультрафиолетом. (2) Кроликов анестезировали 3 мл/кг хлоралгидрата путем внутрибрюшинного введения, а затем помещали на операционный стол в положении лежа на спине. Шерсть, покрывающую грудную клетку и конечности в месте прикрепления электрода, выбривали. Хирургический участок тщательно обрабатывали повидоном-йодом 3 раза подряд. Лидокаин вводили в подкожную область вокруг разреза. (3) Electroды прикрепляли к конечностям и делали ЭКГ (электрокардиограмму) за 30 мин до хирургической операции и через 30 мин после операции. (4) Кроликов подвергали медианной стернотомии. Кожу вырезали и иссекали подкожную ткань и мышцы. После этого, грудину оттягивали и извлекали плевру, а затем открывали плевральную полость и извлекали перикард. (5) После осторожного разреза перикарда сердце извлекали и левую огибающую ветвь (ЛОВ) лигировали. Участок лигирования находился на уровне 75 от ЛОВ (конец эпикарда ЛОВ был определен как нулевой уровень, начало ЛОВ было определено как уровень 100). До лигирования проводили мониторинг состояния сердца и дыхания. (6) Изменение цвета передней стенки желудочка, различия движений стенок левого желудочка, в том числе и изменение сегмента ST, записанное с помощью электродов II, III и AVF на ЭКГ, наблюдали в течение 2 мин для гарантии успешного лигирования. (7) В течение 10 мин проводили тщательный мониторинг состояния сердца для того, чтобы в случае аритмии или нарушения дыхания снять лигирование и при необходимости провести реанимацию сердца и легких. После того, как гемодинамика сердца и функции жизненно важных органов стабилизировались, грудную клетку закрывали. При повреждении плевры во время хирургической операции, грудную клетку сразу закрывали и пневмоторакс предотвращали путем уделения воздуха. (8) Область разреза стерильно очищали, а затем кроликов оставляли для восстановления. Кроликам вводили 400000 единиц пенициллина в течение 3 дней для предотвращения инфекции. (9) Выжившие кролики были разделены на 3 группы: с острым заболеванием (через ≤ 1 месяц после операции); с хроническим заболеванием (через 6 после операции); с хроническим заболеванием и обработкой микропузырьками (через 6 месяцев после операции и обработки микропузырьками с Си-альбумином). Микропузырьки с Си-альбумином вводили i.v. через ушную вену через 6 месяцев после хирургической операции по поводу экспериментальной ИМ. Микропузырьки обрабатывали (5 мл/кролик/обработку) ультразвуком в левом желудочке сердца с помощью цветовой доплеровской диагностической ультразвуковой системы (частота: 1,3 МГц, энергия: 90-100%, механический индекс: 1,1-1,2, время облучения: 20 мин/обработку (5-секундное облучение с 5-секундным интервалом)). Каждого кролика обрабатывали 3 раза, обработку проводили через 2-3 дня, и все 3 обработки одного кролика проводили в течение одной недели.

2. Выделение и культивирование кроличьих BMSC

(1) Взрослых самцов новозеландских белых кроликов выдерживали в условиях голодания за 12 ч до операции, и перед проведением хирургической операции, операционную стерилизовали в течение ночи путем облучения ультрафиолетом. (2) Кроликов анестезировали 3 мл/кг хлоралгидрата путем внутрибрюшинного введения, а затем помещали на операционный стол в положении лежа на спине. Шерсть, покрывающую конечности в месте аспирации, выбривали. Хирургический участок тщательно обрабатывали повидоном-йодом 3 раза подряд, а затем обрабатывали 75% спиртом для деиодирования. Место аспирации обнажали и окружающую область покрывали операционным полотенцем. (3) Иглу(иглы) и шприц(ы) для биопсии кости подвергали стерильной обработке гепарином. (4) Из одного или обоих бедер кроликов-доноров брали биоптат с помощью гепаринизированной(ых) иглы(игл) и иглы(игл) со щеточкой и брали 1-2 мл биоптата костного мозга за одну пункцию. (5) Биоптаты сразу переносили в 15 мл-пробирку, содержащую 4-5 мл модифицированной по способу Дульбекко среды Игла (L-DMEM). Образец смешивали с DMEM путем осторожного вращения пробирки для предотвращения свертывания крови. (6) Смесь наносили поверх равного объема 1,077 г/мл раствора Percoll в другой конической 15 мл-пробирке. До выделения, раствор следует хранить при комнатной температуре, а смесь должна быть осторожно нанесена на раствор. (7) Затем смешанный раствор центрифугировали при 400×g в течение 15 мин при комнатной температуре. (8) Лейкоцитарную пленку (моноклеарные клетки) собирали в межфазном градиенте, два раза промывали DMEM и центрифугировали при 300×g. Клетки высевали в среду L-DMEM, к которую было добавлено 12% FBS при 37°C в увлажненной атмосфере 5% CO₂. (9) Первую замену среды проводили через 3 дня после посева. Затем культуральные среды заменяли через каждые 2 или 3 дня. При этом, может быть проведена замена половины среды или всей среды. Концентрацию FBS в среде модулировали в зависимости от состояния клеток. Неприкрепившиеся клетки удаляли при замене среды. При конfluence 80-90%, MSC гидролизировали 0,25% трипсином-ЭДТА и пассировали. Клетки культивировали в количестве 8-10×10⁶.

3. Мечение кроличьих BMSC

(1) BMSC, после их пролиферации приблизительно до 8-10×10⁶, собирали и промывали L-DMEM (без сыворотки) 2 раза, причем во второй раз их необходимо центрифугировать при 400×g для упаковки

клеток. (2) Собранные BMSC сначала метили рКН26 в соответствии с инструкциями производителей. Вкратце, DMEM по возможности полностью удаляли из упакованных клеток. Затем клетки суспендировали в одной части Dilute-C (разделенном на 2 равные части) при концентрации 1×10^7 клеток/2 мл. Краситель смешивали в другой части Dilute-C и добавляли в клеточную суспензию (концентрация красителя: 5 мкл/ 1×10^7 клеток). После этого осуществляли достаточное смешивание и проводили инкубирование при комнатной температуре в течение 5 мин с осторожным покачиванием 1 или 2 раза за всю процедуру. Затем в смесь добавляли равный объем сыворотки и инкубировали в течение 1 мин для прекращения мечения. После этого, клетки промывали 5 мл DMEM (с сывороткой) и центрифугировали при $400 \times g$ в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем клетки 2 или 3 раза промывали DMEM и высевали в среду L-DMEM, в которую было добавлено 10% FBS, и оставляли на ночь при 37°C в атмосфере 5% CO_2 повышенной влажности. Успешно меченные клетки при наблюдении невооруженным глазом имели окраску от розового до красного. (3) Затем рКН26-меченные BMSC тестировали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, после чего среду заменяли и погибшие клетки отбрасывали. Количество меченных клеток считается достаточным, только если оно превышает 90%, в противном случае, стадию (2) следует повторить. (4) Перед процедурой мечения приготавливали рабочие растворы Dio(3) и Hoechst: Dio(3) разводили в дистиллированной воде до концентрации 1 мкг/мкл, фильтровали для стерилизации и хранили при -20°C ; Hoechst разводили в диметилсульфоксиде до концентрации 1 мкг/мкл и хранили при -20°C . (5) После теста с помощью флуоресценции в красном диапазоне (рКН26), Dio(3) (10 мкг/10 мл) и Hoechst (10 мкг/10 мл) добавляли в среду рКН26-меченных BMSC и клетки инкубировали в течение ночи. (6) Последнее мечение считалось успешным, если наблюдались сильные флуоресцентные сигналы в красном и зеленом диапазоне и слабые флуоресцентные сигналы в синем диапазоне. (7) Меченные клетки были затем визуализированы и был проведен анализ на соотношение меченных флуоресцентных сигналов в красном и зеленом диапазоне. Синие флуоресцентные сигналы наблюдались в ядре и отношение меченных клеток вычисляли как: количество красных или зеленых флуоресцирующих клеток/количество синих флуоресцирующих клеток в рандомизированном $200 \times$ поле. (8) Для AMD3100-обработанной группы, стерильный AMD3100 (конечная концентрация: 1×10^7 нг/мл) добавляли в меченные клетки и инкубировали в течение ночи. После инкубирования, клетки, перед их использованием, гидролизовали, промывали, суспендировали в 1-2 мл L-DMEM (без сыворотки). Что касается других групп, то успешно меченные клетки, перед их использованием, гидролизовали, промывали, суспендировали в 1-2 мл L-DMEM (без сыворотки). Приготовленные BMSC вводили тому же самому кролику-донору через ушную вену.

4. Мониторинг хоминга кроличьих BMSC во время инфаркта миокарда и после обработки микропузырьками с Си-альбумином

4.1. Мониторинг хоминга кроличьих BMSC во время острого инфаркта миокарда, хронической ишемии сердца и хронической ишемии сердца с обработкой микропузырьками с Си-альбумином.

(1) Кролики: с острым заболеванием (через ≤ 1 месяц после операции по поводу ИМ, $n=3$); с хроническим заболеванием (через 6 месяцев после операции, $n=3$); с хроническим заболеванием и обработкой микропузырьками (через 6 месяцев после операции по поводу ИМ, $n=3$ и обработки микропузырьками с Си-альбумином). (2) BMSC выделяли и культивировали за 1 месяц до хирургической операции по поводу ИМ (для группы с острым заболеванием) или через 4-5 месяцев после операции (для других групп с хроническим заболеванием и хроническим заболеванием и обработкой микропузырьками), и перед их использованием, метили рКН26, Dio(3) и Hoechst. (3) Приготовленные BMSC ($1-9 \times 10^6$ клеток/кролика) вводили через ушную вену через 2 недели (острое заболевание) или 6 месяцев (хроническое заболевание) после хирургической операции по поводу ИМ у кроликов-доноров. Сердца извлекали через 24 часа после инъекции клеток. Для группы с хроническим заболеванием и обработкой микропузырьками, обработку микропузырьками проводили через 6 месяцев после операции по поводу ИМ. Приготовленные BMSC вводили кроликам-донорам после 3 обработок. Сердца извлекали через 24 ч после инъекции клеток. Каждое извлеченное сердце разделяли на 4 части с одинаковой толщиной от вершины до основания по продольной оси. Затем, каждую часть приготавливали в виде замороженных срезов (5 срезов/часть) также от вершины до основания по продольной оси и наблюдали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии. Изображения хоминга фотографировали на камеру Nikon DXM1200/NIS-Elements. Затем срезы фиксировали и приготавливали для анализа на патологию. (4) Изображения анализировали с помощью Image-Pro Plus 6.0. Были вычислены величины IOD, и площади флуоресценции в красной области спектра для каждого изображения (в пикселях). Затем были вычислены суммы значений IOD и флуоресцентных областей для каждого сердца. Статистические данные получали по формуле: Сумма IOD (или флуоресцентных областей)/количество флуоресцентных срезов.

4.2. Механизмы хоминга BMSC, индуцированного посредством микропузырьков с Си-альбумином

(1) Кролики были разделены на 3 группы: с хроническим заболеванием (через 6 месяцев после операции по поводу ИМ, $n=3$); с хроническим заболеванием и обработкой микропузырьками (через 6 месяцев после операции по поводу ИМ, и обработки микропузырьками с Си-альбумином, $n=5$) и с хроническим заболеванием и обработкой микропузырьками+AMD3100 (через 6 месяцев после операции по по-

воду ИМ, обработки микропузырьками с медью и AMD3100-обработки BMSC, n=3). (2) BMSC выделяли и культивировали через 4-5 месяцев после хирургической операции по поводу ИМ и, перед их использованием, метили рКН26, Dio(3) и Hoechst. (3) Приготовленные BMSC инъецировали кроликам-донорам через ушную вену через 6 месяцев после хирургической операции по поводу ИМ с обработкой (хроническое заболевание и обработка микропузырьками) или без обработки микропузырьками (хроническое заболевание). Сердца извлекали через 24 ч после инъекции клеток. Для группы с хроническим заболеванием и обработкой микропузырьками+AMD3100, обработку микропузырьками проводили через 6 месяцев после операции по поводу ИМ. Флуоресцентно меченные и AMD3100-обработанные BMSC инъецировали кроликам-донорам после 3 обработок. Сердца извлекали через 24 ч после инъекции клеток. Извлеченные сердца приготавливали в виде замороженных срезов. Замороженные срезы наблюдали и регистрировали с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии, а затем визуализировали с использованием системы Nikon DXM1200/NIS-Elements. Затем, срезы фиксировали и приготавливали для анализа на патологию. (4) Изображения анализировали с помощью Image-Pro Plus 6.0. Были вычислены величины IOD и площади флуоресценции в красной области спектра для каждого изображения (в пикселях). Затем были вычислены суммы значений IOD и флуоресцентных областей для каждого сердца. Статистические данные получали по формуле: Сумма IOD (или флуоресцентных областей)/количество флуоресцентных срезов.

5. Анализ на патологию

Для умерщвления кроликов им *i.v.* вводили сверхдозу хлоралгидрата. Затем сердца собирали и промывали NS (нормальным физиологическим раствором). После этого физиологический раствор полностью удаляли и сердце приготавливали в виде замороженных срезов. Конфокальные наблюдаемые срезы сушили и фиксировали в 4% растворе формальдегида. Затем срезы дегидратировали и окрашивали H&E: (1) срезы депарафинизировали ксилолом, промывали спиртом с пониженными концентрациями градиента и, наконец, водой: Ксилол (I) 5 мин → ксилол (II) 5 мин → 100% спирт, 2 мину → 95% спирт, 1 мин → 80% спирт, 1 мин → 75% спирт, 1 мин → дистиллированная вода, 2 мин; (2) Срезы окрашивали гематоксилином в течение 5 мин, а затем промывали дистиллированной водой; (3) срезы промывали дистиллированной водой и 1% кислотным раствором спирта в течение 30 с; (4) Срезы смачивали в потоке воды в течение 15 мин или в потоке теплой воды (приблизительно 50°C) в течение 5 мин; (5) Срезы окрашивали в растворе спирта и эозина в течение 2 мин; (6) Срезы дегидратировали, делали прозрачными и заворачивали: 95% спирт (I), 1 мин 95% спирт (II), 1 мин → 100% спирт (I), 1 мин → 100% спирт (II), 1 мин → ксилол (I), 1 мин → ксилол (II), 1 мин → покрытие нейтральной смолой.

6. Статистический анализ

Для анализа данных использовали SPSS14.0 (SPSS, Chicago, IL). Величины IOD и площади флуоресценции выражали как среднее. Различия между группами были тестировали по сумме рангов, $\alpha=0,05$. Отношение меченных клеток выражали как среднее \pm ср. кв.откл. ($\bar{X} \pm SD$). Различия между группами тестировали по независимым t-критериям выборки. Статистическую значимость принято обозначать как $P < 0,05$.

Результаты

Во время операции по поводу ИМ наблюдали изменения цвета передней стенки желудочка, ослабление подвижности миокарда (в стенке левого желудочка, боковой стенке и вершине) и повышение или снижение сегмента ST, зарегистрированного с помощью электродов II, III и aVF.

Были взяты биоптаты костного мозга, и эти биоптаты выделяли путем центрифугирования в градиенте плотности. Лейкоцитарную пленку (моноклеарные клетки) собирали, культивировали и пассировали. Неприлипшие клетки отбрасывали с заменой среды, а прилипшие клетки, обогащенные BMSC, подвергали пролиферации. Прилипшие клетки обнаруживали клональный рост через 3-5 дней после посева. В колониях наблюдались полиэдральные и веретенообразные клетки. Полиэдральные клетки были доминирующими в течение первой недели после посева, однако, постепенно они замещались веретенообразными клетками. Когда колонии становились большими и плотными (обычно это происходило через 1-2 недели после посева), клетки можно было пассировать. После пассирования веретенообразные клетки становились доминирующими.

Флуоресцентное мечение проводили, когда клетки пролиферировали приблизительно до $8-10 \times 10^6$. Для рКН26-мечения необходимо проводить гидролиз и центрифугирование, поскольку рКН26-мечение обычно приводит к гибели части клеток. Таким образом, Dio(3)- и Hoechst-мечение проводили после рКН26-мечения, что позволяло успешно рКН26-помеченным и живым клеткам прилипнуть и выжить. Dio(3) и Hoechst добавляли в среду успешно рКН26-помеченных BMSC, и клетки инкубировали в течение ночи. Клетки рассматривались как успешно меченные и подходящие в экспериментах по мониторингу только при соответствующем соотношении меченных клеток.

Оба рКН26 и Dio(3) являются жирорастворимыми красителями, механизмы мечения которых позволяют встраивать флуорофоры в мембрану. Сигналы мечения этими двумя красителями были сходными. Меченные клетки наблюдались как включения в мембрану, равномерно окрашенные красным или зеленым. Это наблюдение показало, что для одной ячейки, некоторые из клеток могут быть помечены

более сильными сигналами рКН26, а некоторые более сильными сигналами Dio(3). Очень немногие клетки не могли быть помечены ни Dio(3), ни рКН26.

Результаты показали, что при хоминге BMSC во время инфаркта миокарда и обработки микропузырьками с Си-альбумином, область инфаркта редко находилась в 1-й, 2-й и 3-й части сердца. Для этого экспериментального ИМ область инфаркта включала верхушку и большую часть стенки левого желудочка, что было достигнуто за счет лигирования ЛС. Извлеченные сердца разделяли на 4 части от верхушки до основания вдоль продольной оси. 1-я и 2-я части всех сердец имели площадь инфаркта (18/18); 3-й части большинства сердец имели площадь инфаркта (12/18); а 4-ые части нескольких сердец имели небольшую часть площади инфаркта (3/18).

При остром инфаркте миокарда, сигналы хоминга были избыточными и интенсивными в области инфаркта и вокруг нее. Через 1 месяц после хирургической операции по поводу ИМ было установлено, что подопытные кролики с экспериментальным ИМ можно с успехом рассматривать как модели с острым инфарктом миокарда (острый инфаркт, n=3). Во время острого инфаркта у животных инициировалась спонтанная саморепарация, и могли наблюдаться сильные сигналы хоминга BMSC, рассеянных по всей площади инфаркта (фиг. 2-4). В этом эксперименте перекрывающиеся зеленые и красные флуоресцентные сигналы наблюдались как сигналы хоминга, присутствующие в области инфаркта и вокруг нее, но не в области с отсутствием инфаркта (фиг. 2-4). На фиг. 2 показано, что при остром инфаркте, сигналы хоминга BMSC наблюдались в значительной части площади инфаркта. А-С были захвачены в том же поле при операции на левом желудочке. Слева направо показаны зеленый и красный сигналы, результаты Н&Е-окрашивания. Желтые пунктирные линии делят область на область инфаркта (вверху) и область не-инфаркта (внизу). Изображения были получены в 40× поле, в масштабе=500 мкм. На фиг. 3 показано, что сигналы хоминга наблюдаются только в области инфаркта. А-С, D-F, G-I происходят от одного и того же сердца, А-С и D-F представляют собой изображения одного и того же поля в пределах области инфаркта (2-я часть), G-I представляют собой изображения в неинфарктной области. D-F представляет собой синие линейные области в А-С. Желтые пунктирные линии делят область на область инфаркта (слева) и область без инфаркта (справа). G-I представляет собой изображение в области без инфаркта. Перекрывающиеся красные и зеленые сигналы наблюдаются в области инфаркта, тогда как некоторые из них могут находиться на краях области инфаркта или в области, расположенной на расстоянии от области инфаркта. Слева направо показаны зеленый и красный сигналы, результаты Н&Е-окрашивания. А-С, G-I были захвачены в 40× поле, масштаб=500 мкм; D-F были захвачены в 100× поле, масштаб=100 мкм (D-E) или 200 мкм (F). На фиг. 4 показано, что при остром инфаркте наблюдались сильные сигналы хоминга BMSC. Через 1 месяц после хирургической операции по поводу ИМ наблюдались интенсивные сигналы хоминга в области инфаркта. Сверху вниз представлены изображения 1-й (А-С), 2-й (D-F), 3-й (G-I) и 4-й (J-L) частей. Флуоресцентные сигналы наблюдались в области инфаркта (1-я и 2-я части, А-F), а в не-инфарктной области никакого сигнала не наблюдалось (3-я и 4-я части, G-L). Изображения были захвачены в 100× поле, масштаб=100 мкм.

Результаты этого эксперимента показали, что хоминг BMSC прекращался, когда сердце находилось в состоянии хронической ишемии, но обработка микропузырьками с Си-альбумином инициировала повторный хоминг BMSC. Через 6 месяцев после хирургической операции по поводу ИМ было установлено, что подопытных экспериментальных животных можно с успехом рассматривать как модели с хронической ишемией сердца (хроническое заболевание, n=3). Спонтанная саморепарация, а также хоминг BMSC у этих животных значительно снижался или даже прекращался. Перекрывающиеся зеленый и красные сигналы (сигналы хоминга BMSC) не могли быть обнаружены в области инфаркта и в неинфарктной области (фиг. 5). На фиг. 5 показано, что сигналы хоминга BMSC исчезали при хронической ишемии сердца. Через 6 месяцев после хирургической операции по поводу ИМ, сердца разрезали и визуализировали. Сигналы не могли быть обнаружены в 1-й (А-С), 2-й (D-F), 3-й (G-I) и 4-й (J-L) частях. Слева направо показаны зеленый и красный сигналы, результаты Н&Е-окрашивания. Изображения были получены в 100× поле, в масштабе=100 мкм.

Целевая доставка меди в область инфаркта миокарда была достигнута путем облучения ультразвуком и обработки микропузырьками с Си-альбумином. Обработка микропузырьками с Си-альбумином не инициировала хоминг BMSC в сердце, не подверженном инфаркту (фиг. 6). На фиг. 6 показано, что, в отсутствие инфаркта, обработка микропузырьками с Си-альбумином не инициировала хоминг BMSC. Сверху вниз представлены изображения 1-й (А-С), 2-й (D-F), 3-й (G-I) и 4-й (J-L) частей. Флуоресцентные сигналы не могли быть обнаружены ни в одной области (1-я и 2-я часть, А-F). Слева направо показаны зеленый и красный сигналы, результаты Н&Е-окрашивания. Изображения были получены в 100× поле, в масштабе=100 мкм. Обработка кроликов с 6-месячной ишемией сердца микропузырьками с Си-альбумином приводила к повторному хомингу BMSC (фиг. 7). Через шесть месяцев после хирургической операции по поводу ИМ, обработка микропузырьками с Си-альбумином инициировала повторный хоминг BMSC в область инфаркта. Сверху вниз представлены изображения 1-й (А-С), 2-й (D-F), 3-й (G-I) и 4-й (J-L) частей. Флуоресцентные сигналы наблюдались в области инфаркта (1-я, 2-я часть и 3-я часть, А-I), а в не-инфарктной области сигнал не наблюдался (4-я часть, J-L). Слева направо показаны зеленый

и красный сигналы, результаты Н&Е-окрашивания. Изображения были получены в 100× поле, в масштабе=100 мкм. Хотя избыточность, интенсивность и видимая область сигналов хоминга были значительно меньше по сравнению с сигналами хоминга во время острого инфаркта, однако, сигналы хоминга, инициируемые обработкой микропузырьками, были более отчетливыми по сравнению с сигналами у животных с хроническим инфарктом, не подвергаемых обработке (фиг. 8-9). На фиг. 8 показано, что обработка микропузырьками с Си-альбумином инициировала повторный хоминг BMSC в область инфаркта. Во время острого инфаркта избыточные сигналы хоминга BMSC наблюдались в области инфаркта (A-C, a). Сигналы хоминга исчезали в сердце с хронической ишемией (D-F, d). После обработки микропузырьками с Си-альбумином, исчезнувшие сигналы хоминга снова появились в области инфаркта миокарда (G-I, g). Изображения представлены для всех срезов 2-й части. Слева направо показаны зеленый и красный сигналы, результаты Н&Е-окрашивания. Изображения были получены в 100× поле, в масштабе=100 мкм (A-C, D-F, G-I) или 200 мкм (a, d, g). На фиг. 9 показан статистический анализ флуоресцентных сигналов для группы с острым заболеванием, хроническим заболеванием и хроническим заболеванием и обработкой микропузырьками. Вверху проиллюстрирован анализ величин IOD, а внизу проиллюстрирован анализ флуоресцентных областей. Различия между группами были протестированы по сумме рангов. Короткие линии представляют собой среднее; * и # означают $p \leq 0,05$.

Результаты этого эксперимента показали, что повторный хоминг BMSC, стимулированный микропузырьками с Си-альбумином, зависит от оси SDF-1/CXCR4. Ось SDF-1/CXCR4 является одним из важных механизмов хоминга стволовых клеток. SDF-1 экспрессируется поврежденными тканями, притягивающими различные стволовые клетки, включая хоминг BMSC. Специфический рецептор CXCR4, экспрессируемый на поверхности стволовых клеток, отвечает на SDF-1 и инициирует хоминг клеток. Для специфического блокирования SDF-1/CXCR4, AMD3100, то есть блокатор CXCR4, был выбран для обработки клеток.

Результаты этого эксперимента показали, что AMD3100-обработанные BMSC не могли подвергаться хомингу в область инфаркта миокарда. Клетки метили рКН26, Dio(3) и Hoechst, инкубировали с AMD3100 в течение ночи, а затем собирали и инъецировали кроликам. Избыточные и интенсивные сигналы хоминга не наблюдались, когда AMD3100-обработанные BMSC были инъецированы кроликам с острым инфарктом. Избыточные и видимые области сигналов хоминга заметно сокращались по сравнению с сигналами хоминга у кроликов с острым инфарктом, которым вводили BMSC, не обработанные AMD3100 (фиг. 10-12), что указывало на то, что AMD3100 ингибирует SDF-1/CXCR4-зависимый хоминг. На фиг. 10 показано, что AMD3100-обработка BMSC не могла приводить к хомингу клеток в область острого инфаркта миокарда. Через 1 месяц после хирургической операции по поводу ИМ, способность AMD3100-обработанных BMSC к хомингу в область инфаркта явно снижалась (в 1-й, 2-й и 3-й части, A-I). Сверху вниз представлены изображения 1-й (A-C), 2-й (D-F), 3-й (G-I) и 4-й (J-L) частей. Флуоресцентные сигналы были слабыми в любой части. Слева направо показаны зеленый и красный сигналы, результаты Н&Е-окрашивания. Изображения были получены в 100× поле, в масштабе=100 мкм. На фиг. 11 показано, что AMD3100-обработанные BMSC не обладали способностью к хомингу в область острого инфаркта миокарда. Сверху вниз представлены изображения для группы с острым заболеванием (A-C, a) и острым заболеванием+AMD3100 (D-F, d) (все во 2-й части). Слева направо показаны зеленый и красный сигналы, результаты Н&Е-окрашивания. Изображения были получены в 100× поле, в масштабе=100 мкм (A-C, D-F) или 200 мкм (a, d). На фиг. 12 показан статистический анализ флуоресцентных сигналов для группы с острым заболеванием и острым заболеванием+AMD3100. Вверху проиллюстрирован анализ величин IOD, а внизу проиллюстрирован анализ флуоресцентных областей. Различия между группами были протестированы по сумме рангов. Короткие линии представляют собой среднее; * и # означают $p \leq 0,05$.

Результаты этого эксперимента показали, что AMD3100-обработанные BMSC не могли подвергаться хомингу в область хронической ишемии сердца. Через шесть месяцев после хирургической операции по поводу ИМ, обработка микропузырьками с Си-альбумином инициировала повторный хоминг BMSC в область инфаркта. Однако, если подвергаемыми мониторингу клетками были AMD3100-обработанные BMSC, то сигналы хоминга не могли наблюдаться в области хронической ишемии, обработанной микропузырьками с Си-альбумином. При AMD3100-обработке клеток, сигналы хоминга, стимулированные микропузырьками с Си-альбумином, не могли присутствовать у кролика с инфарктом, у которых в течение 6 месяцев наблюдалась ишемия сердца, и которые были обработаны микропузырьками с Си-альбумином. Сверху вниз представлены изображения 1-й (A-C), 2-й (D-F), 3-й (G-I) и 4-й (J-L) частей. В 1-й - 3-й (A-I) части присутствует область инфаркта, но несколько сигналов хоминга наблюдалось в любой части. Слева направо показаны зеленый и красный сигналы, результаты Н&Е-окрашивания. Изображения были получены в 100× поле, в масштабе=100 мкм. На фиг. 14 показано, что AMD3100-обработанные BMSC не обладали способностью к хомингу в область острого инфаркта миокарда или в область хронической ишемии сердца. Сверху вниз представлены изображения для группы с острым заболеванием (A-C, a), с хроническим заболеванием (D-F, d), с хроническим заболеванием и обработкой микропузырьками (G-I, g) и с хроническим заболеванием и обработкой микропузырьками+AMD3100 (J-

L, j) (все во 2-й части). Слева направо показаны зеленый и красный сигналы, результаты H&E-окрашивания. Изображения были получены в 100× поле, в масштабе=100 мкм (A-C, D-F, G-I, J-L) или 200 мкм (a, d, g, j). На фиг. 15 показан статистический анализ флуоресцентных сигналов для групп с хроническим заболеванием, с хроническим заболеванием и обработкой микропузырьками и с хроническим заболеванием и обработкой микропузырьками+AMD3100. Вверху проиллюстрирован анализ величин IOD, а внизу проиллюстрирован анализ флуоресцентных областей. Различия между группами были протестированы по сумме рангов. Короткие линии представляют собой среднее; * и # означают $p \leq 0,05$.

Новозеландские белые кролики, используемые в качестве модели инфаркта миокарда, являются недорогостоящими и непритязательными с точки зрения кормления и транспортировки, не требуют искусственного дыхания во время хирургической операции по поводу ИМ и легко переносят лигирование коронарных артерий. Лигирование коронарных артерий в основном достигается путем лигирования LAD (нисходящей левой передней аорты) или LC, как указывалось ранее в литературе. В этом эксперименте, результаты показали, что лигирование LAD не могло создать стабильную модель инфаркта миокарда. После перфузии красителем наблюдалось, что LAD у кроликов была значительно короче, чем у крыс и свиней. Она достигала максимума 1/3 от передней стенки левого желудочка, и доставляла кровь в очень ограниченную область - 10-15% левого желудочка. Тем не менее, LC является относительно длиннее и больше, достигает верхушки (а в некоторых случаях огибает верхушки и достигает правых коронарных артерий), и доставляет кровь в большинство областей левого желудочка.

Лигирование LC была более успешной и давала более стабильные модели, чем лигирование LAD. Результаты эхокардиографии и оценки гемодинамических параметров показали, что, сердечная функция у кроликов с лигированием LAD, в основном, не изменилась, тогда как при лигировании LC эта функция резко изменилась. Анализ на патологию также показал, что область инфаркта у LC-лигированных кроликов была заметно больше, чем у LAD-лигированных кроликов. Кроме того, LC простирается до поверхности миокарда, в результате чего его легко распознать и оперировать.

Обработанные ультразвуком микропузырьки представляют собой один из видов ценных ультразвуковых контрастных агентов и носителей, нацеленных на мишень лекарственных средств. Микропузырьки остаются стабильными при транспортировке перед облучением ультразвуком, которое регулируется вручную. Таким образом, лекарственные средства на микропузырьках могут быть ориентированы на разрушение в тканях-мишенях. Кроме того, разрушение микропузырьков и ультразвуковое облучение способствует проникновению лекарственных средств в клетки. Обработанные ультразвуком микропузырьки удобны в эксплуатации, не вызывают значительных повреждений у животных, а также позволяют осуществлять своевременную и локальную доставку меди. Таким образом, в этом эксперименте, обработанные ультразвуком микропузырьки с Cu-альбумином были выбраны для пополнения меди в миокарде.

Хоминг стволовых клеток представляет собой системную реакцию, которая охватывает весь организм. Системное наблюдение является более убедительным, чем простые тесты на белок. Таким образом, этот эксперимент выявил механизмы хоминга BMSC, стимулируемого микропузырьками с Cu-альбумином посредством AMD3100-обработки, и, тем самым, показал, что стимулированный хоминг зависит от SDF-1/CXCR4-оси, что позволяет предположить, что в соответствии с этим механизмом, Cu инициирует активность HIF-1, HIF-1 стимулирует экспрессию SDF-1, а SDF-1 инициирует хоминг стволовых клеток.

Ишемия сердца приводит к гипоксии, в результате чего HIF-1 α "ускользает" от деградации и накапливается в цитозоле. При транспортировке в ядро HIF-1 α димеризуется с HIF-1 β с образованием HIF-1. Однако в ядре HIF-1 α гидроксидируется под действием аспарагинилгидроксилазного фактора, ингибирующего HIF-1 (FHN-1) на аспарагиновом остатке N803 на его карбоксильном конце, что приводит к ингибированию взаимодействия HIF-1 α с коактиваторами CBP/p300 и к образованию функциональных транскрипционных комплексов. Медь подавляет активность FHN-1, что приводит к объединению HIF-1 с другими факторами и к образованию функциональных транскрипционных комплексов. HIF-1 не может образовывать функциональный комплекс и инициирует экспрессию генов, расположенных ниже, если содержание меди в системе является недостаточным. Тем не менее, ишемия сердца, которая способствует аккумуляции HIF-1 α , приводит к оттоку меди из сердца и, в свою очередь, к подавлению транскрипционной активности HIF-1 и к ингибированию экспрессии HIF-1-регулируемых генов, включая хемокины хоминга (например, SDF-1). Таким образом, наряду с увеличением продолжительности ишемии сердца, хоминг BMSC снижается вплоть до его исчезновения.

Результаты этого эксперимента показали, что при остром инфаркте миокарда, хоминг BMSC осуществляется в области инфаркта. Если продолжительность ишемии увеличивается до 6 месяцев, то хоминг BMSC исчезает. В этом случае наблюдается нацеленная доставка меди в сердце посредством микропузырьков с Cu-альбумином и повторный хоминг BMSC. В заключение следует отметить, что микропузырьки с Cu-альбумином стимулируют хоминг BMSC при хронической ишемии сердца, и такой стимулированный хоминг является HIF-1-SDF-1-зависимым.

Пример 2. Направленная терапия ишемического инфаркта миокарда у модели макак-резусов, проводимая с использованием медьсодержащих ультразвуковых контрастных микропузырьков.

Этот эксперимент был проведен на макак-резусах.

Модель ишемического инфаркта миокарда была получена путем операции по лигированию коронарной артерии. Через четыре недели после операции, ишемическая ткань сердца была полностью заменена коллагеновыми волокнами и представляла собой ткань, пораженную инфарктом. Затем была проведена направленная терапия с использованием медьсодержащих и обработанных ультразвуком микропузырьков для лечения инфаркта миокарда и последующей оценки эффективности терапии. Макак-резусы имеют сердце высокоорганизованного типа, напоминающее человеческое сердце с подобной внутренней структурой, электрической активностью, распределением коронарных артерий, коронарным коллатеральным кровообращением, а также размещением и прикреплением в полости грудной клетки. Таким образом, макак-резус с моделью инфаркта миокарда лучше имитирует состояние инфаркта миокарда у человека.

1.1. Получение макак-резусов с моделью ишемического инфаркта миокарда

Перед проведением хирургической операции, всем животным вводили внутримышечную инъекцию 5 мг/кг кетамина и 0,2 мг/кг мидазолама для индуцирования седативного эффекта. Шерсть, покрывающую грудь и конечности на участках прикрепления электродов, тщательно выбривали для облегчения работы и лучшей записи ЭКГ. К конечностям были прикреплены стандартные биполярные и однополярные отведения. Животных с аномальной ЭКГ, например, с тахикардией (более 200 ударов в минуту), аритмией, и с сегментами ST, которые явно отклонялись от базовой линии, исключали из этого исследования.

Был проведен постоянный мониторинг стандартных неинвазивных параметров, включая электрокардиографию, давление крови в манжетах, импульсную оксиметрию и капнографию (Dash3000, GE, США.), и были установлены внутривенные катетеры. Все обезьяны, подвергаемые хирургической операции, были сначала интубированы после анестезии, индуцированной путем внутривенного вливания фентанила (10 мкг/кг), мидазолама (0,2 мг/кг), пропофола (1 мг/кг) и векурония (0,1 мг/кг). Искусственное дыхание осуществляли с помощью регулируемой давлением вентиляции для достижения конечного выдыхаемого CO_2 в пределах от 35 до 40 мм рт.ст. На вдохе, давление устанавливали в диапазоне от 12 до 20 см H_2O , частота дыхания составляла 40 об/мин, а отношение вдох/выдох составляло 1:2.

Для поддержания состояния анестезии во время хирургической операции 2 мл фентанила (0,1 мг) и 10 мл пропофола (100 мг) разводили физиологическим раствором до 20 мл. Смесь вводили непрерывно с помощью шприцевого насоса со скоростью 5-10 мл/ч. Скорость насоса была скорректирована в зависимости от типа анестетика и продолжительности операции. Артериальную канюлю вставляли в бедренную артерию с рентгеноконтрастной иглой и подключенной трубкой контроля давления для инвазивного мониторинга кровяного давления во время операции. Обычно пульсация бедренной артерии может пальпироваться на полпути между передней верхней подвздошной осью и лобковым симфизом. Область проведения операции была изолирована в асептических условиях. Изоляцию осуществляли с помощью 4-х частей одноразового стерильного покрытия.

Хирургическую область слегка разрежали медиально по отношению к линии левого четвертого межреберного пространства, и делали поперечный разрез в 4-5 см снаружи от левой стороны рукоятки грудины. Была рекомендована монополярная диатермия, поскольку она может быть использована для разрезания тканей и коагуляции. Подкожную ткань и мышечное пространство рассекали вниз до плевры до входа в плевральное пространство, а затем разрез расширяли путем его открытия с помощью щипцов. После этого вставляли ватный тампон, плевральное пространство очищали, отверстие легких промывали, а затем межреберный разрез расширяли для открытия грудной клетки и обнажения перикарда.

Сердце вскрывали с помощью торакотомического разреза левой четвертой межреберной области (4-5 см) и идентифицировали верхушку и ушко левого предсердия. Конец эпикарда LAD определяли как нулевой уровень, а начало LAD под ушком левого предсердия было определено как уровень 100. Лигирование проводили в определенном участке. Кроме того, основная диагональная ветвь была также лигирована параллельно участку лигирования на артерии LAD у некоторых обезьян, если участок ветвления диагональной артерии находился выше участка лигирования.

Артерию пережимали в течение 1 мин, а затем проводили 5-минутную реперфузию и такую окклюзию-реперфузию повторяли 3 раза перед окончательным лигированием. После окончательного лигирования необходимо провести мониторинг различий в движениях стенки левого желудочка, изменений цвета передней стенки желудочка, а также изменений в ЭКГ и кровяном давлении для гарантии успешного лигирования. После перманентного лигирования в ушко левого предсердия вводили метиленовый синий (1 мл) в виде болюсов с помощью 1,0 мл-шприца. Нарушение наполнения метиленового синего указывало на завершение лигирования, а также на возможное наличие ишемической области.

Перед закрытием грудной клетки проводили интенсивный мониторинг состояния сердца в течение 45 мин. Для поддержания сердечной функции вливали добутамин ($3-5 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$) и при необходимости использовали дефибриллятор (Heartstart XL, Philips). Для предотвращения повреждения сердца во время закрытия перикарда необходимо соблюдать меры предосторожности. Для антиадгезионной обработки в камеру перикарда следует вводить гиалуронат натрия. Перикард и плевру закрывали полиэтиленовыми швами 4-0. Межреберный разрез закрывали шелковым швом. Во избежание пневмоторакса для

предотвращения повреждения легких в процессе закрытия межреберного пространства должны быть приняты меры предосторожности. Повторное раздувание легких при закрытии межреберного разреза необходимо осуществлять так, чтобы воздух мог выходить из плевральной полости. После закрытия межреберного разреза, в подкожное пространство закапывали физиологический раствор, а затем легкие снова раздували для гарантии плотного закрытия разреза грудной клетки. Мышечные и кожные разрезы закрывали слоями #2-0 шелковых швов и очищали в стерильных условиях. Эндотрахеальную трубку вынимали после восстановления спонтанного дыхания. Разрез закрывали стерильной марлей и бинтом. Для облегчения боли внутримышечно инъецировали трамадол (2 мг/кг). Через определенные дни бинт заменяли, а через одну неделю после операции, швы удаляли.

1.2. Мониторинг ЭКГ

ЭКГ с 12 отведениями (MAC8000, GE, USA) проводили для каждой обезьяны в положение лежа на спине до операции, сразу после операции (приблизительно через 2 ч после всей хирургической операции) и через четыре и восемь недель после операции с использованием педиатрических электродов при скорости подачи бумаги 25 мм/с и с амплитудой 10 мм/мВ. Стенки грудной клетки обезьяны не были достаточно широкими для обеспечения 6 прекардиальных отведений в одно и то же время, даже при использовании педиатрических электродов. Следовательно, 6 прекардиальных отведений разделяли на две группы: V1, V3 и V5 записывали для одной группы, а V2, V4 и V6, для другой группы.

1.3. Эхокардиография

Двумерные эхокардиографические измерения проводили на стандартных апикальных 2- и 4-камерах с тремя последовательными сердечными циклами. Частота кадров поддерживалась в пределах от 70 кадров в секунду и до 100 кадров в секунду. Все обезьяны были подвергнуты трансторакальной эхокардиографической оценке с использованием преобразователя на 10,3 МГц (P10-4, Siemens ACuSON Antares System, German) в левом боковом положении до операции и через четыре и восемь недель после операции.

Фракцию выброса (ФВ) левого желудочка оценивали одноплоскостным методом Симпсона. Затем непосредственно регистрировали конечный диастолический объем левого желудочка (LVEDV) и конечный систолический объем левого желудочка (LVESV), и $EF = (LVEDV - LVESV) / LVEDV \times 100\%$. Ударный объем (УО) левого желудочка вычисляли как $SV = LVEDV - LVESV$.

1.4. Магнитно-резонансная томография сердца (МРТ)

Всех обезьян анестезировали путем внутримышечной инъекции 10 мг/кг кетамина и 0,2 мг/кг мидазолама, интубировали для облегчения дыхания и исследовали на клиническом 3,0-Т-сканере (Siemens) в положении лежа на спине до и после обработки с использованием специально изготовленной спирали для фазирования массивов и ЭКГ-запуска для исследования сердечной функции. ЭКГ для запуска последовательности событий является одним из самых важных параметров МР-обследования. Функциональные обследования (кинокамерой МРТ) проводили путем определения свободной последовательности событий, таких как задержка дыхания, короткая ось, стационарное состояние (общий охват левого желудочка; 1 отрезок на задержку дыхания; TR/TE, интервал между сердечными сокращениями/минимальный интервал; толщина среза, 10 мм; число изображений на сегмент, 8). Данные по активации гадопентетатидимеглумином получали для короткой оси желудочка с использованием эхо-эхо-планарной гибридной импульсной последовательности в градиенте, сегментированном посредством промежуточных насыщенных срезов, для 50 сокращений сердца во время первого пропускания контрастного материала (перфузионное сканирование с пятью изображениями на сокращение сердца; время инверсии 160 мс; ударная внутривенная доза составляла 0,1 ммоль/кг и доставлялась со скоростью 5 мл/с), а затем эхо-последовательности в градиенте, полученном путем инверсии-восстановления (один срез на задержку дыхания, пять срезов для каждой ранней фазы и фазы задержки) вдоль короткой оси левого желудочка через 2 и 10 мин после введения второй ударной дозы 0,1 ммоль/кг для ранней визуализации и визуализации активации в фазе задержки, соответственно (время инверсии на нулевой нормальный уровень миокарда было зафиксировано на уровне 200 и 250 мс для ранней визуализации и визуализации активации в фазе задержки, соответственно). В случае необходимости были получены дополнительные изображения (для четырех камер или длинной оси). Общее время исследования составляло приблизительно 30 мин.

Анализ МРТ-изображений

Для анализа, изображения отображали на мониторе компьютера с использованием общедоступной компьютерной программы Syngo Argus, которая является подходящей для отображения изображения различных фаз сердечного цикла в одних и тех же срезах, в одном и том же ряду и для выравнивания изображений одной и той же фазы сердечного цикла в различных срезах. В соответствии с правилом Симпсона, которое обычно используется при проведении МРТ сердца, динамическая серия МРТ-изображений в виде кадров может быть проанализирована для получения точных данных об объемах желудочков. Исходя из контуров, которые оценены вручную для определения эндокардиальных и эпикардиальных границ миокарда каждого среза, в которые были включены папиллярные мышцы, по правилу Симпсона можно автоматически определить объем желудочка и общие функциональные параметры, включая конечные диастолические и конечные систолические объемы, фракцию выброса, ударный объем, с использованием компьютерной программы Syngo Argus.

Размер области инфаркта:

Рандомизированные и анонимные изображения были проанализированы с помощью компьютерной программы для анализа сердца. Для определения размера области инфаркта эндокардиальные и эпикардиальные границы сегментировали на LGE-изображениях автоматически с ручной настройкой и с последующим автоматическим разграничением пораженной инфарктом ткани с использованием встроенной фракции сегмента. При необходимости осуществляли ручную корректировку. Размер области инфаркта, выраженный в процентах по массе левого желудочка, вычисляли как отношение объем инфаркта/объем левого желудочка (по данным на кадрах). Измерения размера области хронического инфаркта, определяемого с помощью магнитной резонансной томографии с активацией контрастным агентом, были воспроизводимыми.

1.5. Обработка медьсодержащими ультразвуковыми микропузырьками

Перед проведением хирургической операции всем животным вводили внутримышечную инъекцию 5 мг/кг кетамина и 0,2 мг/кг мидазолама для индуцирования седативного эффекта. Шерсть, покрывающую грудь и конечности на участках прикрепления электродов, тщательно выбривали для облегчения работы и лучшей записи ЭКГ. Затем устанавливали внутривенный катетер. После этого осуществляли терапию инфаркта миокарда путем обработки ультразвуком. Медьсодержащие микропузырьки вливали через каждые три дня посредством внутривенного введения через небольшую подкожную вену, проходящую вдоль задней части ноги. При каждой обработке медьсодержащими микропузырьками, в прекардиальную часть грудной клетки вставляли ультразвуковой зонд (Vivid 7, M3S, GE) так, чтобы ультразвуковая волна была направлена в область инфаркта сердца. Механический индекс был установлен на 1,2. После каждой инъекции, медьсодержащие микропузырьки, которые достигали желудочка через систему кровообращения, были взорваны путем мощного ультразвукового облучения. Через определенное время, ультразвуковой зонд подавали немного назад и вперед вдоль короткой оси между верхушкой и митральным клапаном сердца. После взрыва медьсодержащих микропузырьков после каждой инъекции делали следующее вливание до тех пор, пока не была достигнута конечная доза для каждой обработки (2 мл/кг). Обработку проводили через каждые три дня. До обработки и через две недели после обработки, каждую обезьяну обрабатывали восемь раз, и определяли сердечную функцию и структуру для оценки терапевтического эффекта.

1.6. Определение инвазивных гемодинамических параметров

Методика определения инвазивного давления-объема позволяет проводить измерения функции левого желудочка, и эта методика является более предпочтительной по сравнению с другими общедоступными методами измерения сердечной функции. Этот метод в комбинации с эхокардиографическим детектированием позволяет полностью идентифицировать сердечную функцию. Эта процедура была проведена только до конечной стадии сбора данных в этом эксперименте.

Регистратор Powelab (16-канальный, ADInstrument Inc.) был присоединен к катетеру 3F (Millar Instrument Inc, USA). Давление калибровали в соответствии с рекомендациями производителей.

Анестезию делали путем внутримышечной инъекции анестетиков. Кетамин (10 мг/кг) в комбинации с мидазоламом (0,2 мг/кг) использовали для постоянного и устойчивого седативного эффекта. Шею обезьян очищали и шерсть сбривали. Затем животное помещали на операционный стол в положении лежа на спине. Внутривенное введение осуществляли венозной рентгеноконтрастной иглой 25-го калибра через небольшую подкожную вену. Анестезию поддерживали с помощью 10 мг/кг кетамина и 20 мг/кг пропофола, разбавленных физиологическим раствором до конечного объема 20 мл. Смесь вливали непрерывно шприцевым насосом со скоростью 1 мл (кг·ч)⁻¹. Для достижения приемлемых результатов при сборе гемодинамических показателей, необходимо соблюдать меры предосторожности в поддержании анестезии с надлежащим использованием и тщательной оптимизацией лекарственных средств. Даже небольшое отклонение от обычной дозы может сильно повлиять на функцию сердца.

В левой части шеи был сделан продольный хирургический разрез в 3-4 см, а затем подкожную ткань и мышечную плоскость иссекали между кожной поверхностью и кожным бугорком. Лицевую поверхность между трахеей и грудинно-сосцевидной частью рассекали для пальпации пульса сонной артерии и определения локализации оболочки сонной артерии. Хирургическое иссечение и канюлирование правой сонной артерии обеспечивало наиболее прямой, своевременный и надежный доступ в левый желудочек, что было подтверждено КТ-сканированием и 3D-реконструкцией сонной артерии.

Общую сонную артерию выделяли путем тупой диссекции длиной 2 см. Дистальную артерию лигировали, если это было необходимо для уменьшения потери крови. Проксимальный сосуд фиксировали хирургическими шелковыми швами 0 и этот сосуд пережимали сосудистым зажимом. Обнаженную артерию заливали в 2% лидокаин для расширения сосуда и облегчения доступа к нему.

Сосуд сонной артерии открывали путем небольшого разреза сосуда, и в артерию помещали катетер 3F Millar, а затем сосудистый зажим удаляли.

Катетер постепенно продвигали по левой сонной артерии в левый желудочек. Затем проксимальный сосуд зажимали фиксатором.

Ствол катетера устанавливали в определенное положение и вращали для достижения оптимального размещения кончика вдоль оси левого желудочка для точного измерения и записи данных при детекти-

ровании с помощью ультразвука.

Проксимальные сегменты электрода для измерения проводимости, находящиеся за пределами камеры левого желудочка, показывающие восьмерку или неправильную петлю, позволяют осуществлять измерение параметров аорты, и объем, детектируемый этими проксимальными сегментами, должен быть исключен. Альтернативно, катетер должен быть продвинут дальше в левый желудочек. При этом надо убедиться, что кончик катетера находится перед верхушкой, а катетер для определения проводимости остается в стабильном и прямом положении приблизительно в середине камеры желудочка, что позволяет избежать контакта со стенкой. При необходимости, следует отрегулировать положение катетера для получения регулярных петель давление-объем.

После стабилизации в течение определенного периода времени, добутамин вливали с помощью инфузионного насоса в начальной дозе $10 \text{ мкг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ с последующим увеличением дозы до 30, 50, 70 $\text{мкг} \cdot \text{кг}^{-1} \cdot \text{мин}^{-1}$ в течение 3 мин для каждой стадии. Функцию сердца при стимуляции добутамина регистрировали непрерывно и одновременно с помощью инструмента. Затем получали и анализировали $+dP/dt \text{ max}$, $-dP/dt \text{ min}$, LVDP при основной частоте сердечных сокращений (HR), которую определяют как частоту сердечных сокращений до вливания добутамина, и при 110, 120, 130, 140% от основной частоты сердечных сокращений для всех обезьян.

1.7. Гистопатологический анализ

Обезьян умерщвляли путем внутривенной инъекции хлорида калия (10%, 10 мл) и проводили полную аутопсию. Собранные сердца промывали и грубо оценивали на видимые повреждения, а затем фиксировали в 10% растворе формальдегида. После этого сердца разрезали на шесть блоков от верхушки до основания по всей продольной оси. Толщина каждого блока составляла ровно 0,5 см. При этом во время разрезания надо следить, чтобы поверхность каждого среза была гладкой и равномерной, а срезы должны быть помечены лигатурой с меткой. Тонкие срезы разрезали и окрашивали Masson и Н/Е для микроскопического исследования.

Антитела:

Мышиное моноклональное антитело против человеческого HIF-1 α : ab16066, Abcam; мышиное моноклональное антитело против человеческого VEGFA: SC-57496, Santa Cruz; кроличье моноклональное антитело против человеческого VEGFR1: 1303-12, Epitomics; моноклональное антитело против человеческого CD31: Maixin bio-tech Company, Fuzhou. Выделение антигена HIF-1 α проводили при нагревании под высоким давлением с использованием EDTA с pH=9,0; выделение антигенов VEGF и VEGFR1 проводили при нагревании в микроволновой печи с использованием цитратно-буферного раствора с pH=6,0, а выделение антигена CD31 проводили при нагревании в микроволновой печи с использованием EDTA. Рабочая концентрация HIF-1 α составляла 1:800; рабочая концентрация VEGF составляла 1:100, а рабочая концентрация VEGFR1 составляла 1:100. В процессе иммуногистохимического детектирования, вместо первого антитела использовали PBS в качестве негативного контроля, а в качестве позитивного контроля использовали предметные стекла, в которых была точно идентифицирована экспрессия белка. Метку Ki-67 подвергали иммунофлуоресцентному анализу под конфокальным микроскопом.

Плотность капилляров:

Сначала определяли визуальное поле зрения максимального распределения капилляров под оптическим микроскопом с увеличением $\times 100$, а затем 5 рандомизированных визуальных полей зрения собирали под оптическим микроскопом $\times 200$ и измеряли плотность капилляров. Капилляры были определены как диаметр каждого просвета, который меньше, чем сумма диаметров 8 эритроцитов. Измерение проводили двумя независимыми специалистами.

Полуколичественный анализ экспрессии белка: для полуколичественного анализа экспрессии белка использовали компьютерную программу Image-Pro Plus 6.0 для анализа изображений (Media Cybernetics). Иммуногистохимические предметные стекла анализировали и фотографировали под оптическим микроскопом. Предметные стекла для другой группы оценивались двумя независимыми специалистами, и каких-либо значимых различий между данными, полученными этими двумя специалистами, не наблюдалось. 5 рандомизированных полей зрения пограничной области и области, удаленной от области инфаркта для каждого предметного стекла, фотографировали под оптическим микроскопом $\times 400$.

1.8. Вестерн-блот-анализ

Приготовление ткани:

Сердце было извлечено из грудной клетки. Стенку левого желудочка тщательно исследовали и отделили область инфаркта, пограничную область и область, удаленную от области инфаркта. Область инфаркта можно было отличить от не-инфарктной области по ее бледному внешнему виду. Пограничную область определяли как площадь, простирающуюся на 1-3 мм от области инфаркта. Образцы хранили в жидком азоте для Вестерн-блот-анализа.

Вестерн-блот-анализ: экстракты белка получали после измельчения каждой ткани в жидком азоте и лизиса в буфере для лизиса RIPA (Beyotime, CN), содержащем полный 1% коктейль ингибиторов протеазы (Roche, DE), который не содержал EDTA, в течение 40 мин на льду. Концентрацию белка определяли с помощью набора для анализа белка Pierce BCA (Thermo Scientific, 23227, USA). Равные количества

белка (30 мкг) от каждого экстракта солибилизировали в 5×ДСН-буфере для образцов и разделяли на 10% ДСН-геле и 8% полиакриламидном геле. Затем белки электрофоретически переносили на поливинилиденфторидную мембрану (Bio-Rad, USA). Мембраны блокировали в течение 1 ч в трис-буферном физиологическом растворе/твина 20 (TBST) (10 мМ трис-HCl, pH 8,0, 150 мМ NaCl, и 0,1% твин 20), содержащем 5% обезжиренное сухое молоко, и инкубировали в течение ночи при 4°C с соответствующими "первыми" антителами, такими как анти-HIF-1 α антитело (Abcam, ab113642, USA), анти-VEGF антитело (Santa Cruz, sc57496, USA) и анти-VEGFR-1 антитело (Abcam, ab32152, USA), в блокирующем растворе в соответствии рекомендациями поставщиков. После промывки TBST, мембраны инкубировали в течение 1 ч при 37°C с соответствующим "вторым" антителом. Белки-мишени визуализировали с использованием хемиллюминесцентного ПХ-субстрата (Millipore, USA) и анализировали с помощью денситометрии с использованием компьютерной программы Quantity One Software.

1.9. Уровни мРНК генов-мишеней HIF-1

Для определения транскрипционной активности HIF-1 при ишемии миокарда, уровень мРНК генов-мишеней HIF-1, VEGF и VEGFR-1 (Flt-1) тестировали с помощью ОТ-ПЦР.

Общую РНК выделяли с использованием тризола (Invitrogen, 15596-026, USA) в соответствии с инструкциями производителей. 1 мкг общей РНК подвергали обратной транскрипции в соответствии с протоколом с использованием набора реагентов PrimeScript™ RTreagent Kit (Takara, RR037A, Japan) при 37°C в течение 15 мин, а затем при 85°C в течение 5 с и 4°C в течение 5 мин. Реакции ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводили с использованием реагента SYBR Premix Ex Taq™ II (TaKaRa, RR820A, Japan). Для амплификации фрагментов кДНК VEGF и VEGFR1, образцы обрабатывали с использованием системы в реальном времени Bio-Rad CFX96: денатурировали при 95°C в течение 30 с, а затем проводили 35 циклов, каждый с изменением температуры: 95°C в течение 5 с, 60°C в течение 30 с. Результаты линейно-логарифмической фазы на кривой роста анализировали и проводили относительную количественную оценку методом 2- $\Delta\Delta$ CT. Уровень экспрессии генов VEGF и VEGFR1 выражали по отношению к актину в каждом образце. Для каждого образца брали по меньшей мере 3 дубликата. Последовательности праймеров представлены в табл. 1.

Таблица 1. Последовательности праймеров

Ген-мишень		Последовательность праймера
HIF-1 α макак- резуса	Прямой праймер	GTCTGCAACATGGAAGGTATTG (SEQ ID NO: 1)
	Обратный праймер	GCAGGTCATAGGTGGTTTCT (SEQ ID NO: 2)
VEGF макак- резуса	Прямой праймер	GAGCTTCCTACAGCACAACA (SEQ ID NO: 3)
	Обратный праймер	CCAGGACTTATACCGGGATTC (SEQ ID NO: 4)
VEGFR1 макак- резуса	Прямой праймер	GGGTCACATCACCTAACATCAC (SEQ ID NO: 5)
	Обратный праймер	CCTTTCTGTGTCCAGATTAC (SEQ ID NO: 6)
Актин макак- резуса	Прямой праймер	CCACGAAACTACCTCAACTCC (SEQ ID NO: 7)
	Обратный праймер	GTGATCTCCTTCTGCATCCTGT (SEQ ID NO: 8)

1.10. Концентрация Си в сердце

Образцы ткани замораживали в свежем виде и хранили при -80°C до лиофилизации. После лиофилизации и гидролиза тканей азотной кислотой, гидролизаты были бесцветными или светло-желтыми и прозрачными без какого-либо видимого осадка или остатка. В каждый сосуд добавляли сверхчистую воду для разведения HNO₃ до 2% для последующих анализов на содержание меди. Концентрации меди определяли с помощью атомно-абсорбционной спектрофотометрии в графитовой печи (ICE3500, Thermo) с использованием программы, представленной в табл. 2.

Таблица 2. Атомно-абсорбционная спектрофотометрия в графитовой печи

Температура (°C)	Время (с)	Поток газа аргона (л/мин)
90	20	0,2
120	20	0,2
850	20	0,2
2100	3	0
2500	3	0,2

1.11. Статистический анализ

Все данные выражали как среднее \pm ср. кв.откл. Изменение каждого параметра сравнивали для четырех групп с использованием критерия гомогенности Левина и коэффициента изменчивости (CV). Был использован пакет программ для статистического анализа SPSS 14.0 (SPSS, Chicago, IL), а значимые различия принято обозначать как $P < 0,05$.

2. Результаты

2.1. Сердечная функция и сердечный резерв

Исследование с помощью эхокардиографии показало, что после обработки медьсодержащими микропузырьками, фракция выброса левого желудочка была значительно увеличена. Однако, у необработанной группы и у группы, обработанной микропузырьками, фракция выброса левого желудочка со временем снижалась (фиг. 16А). Такое восстановление сердечной функции было подтверждено с помощью МРТ (фиг. 1). Дальнейшие исследования показали, что увеличение фракции выброса левого желудочка было результатом значительного снижения конечного систолического объема левого желудочка ($p < 0,05$). После каждого сокращения левого желудочка, остаточная кровь заметно снижалась у группы, обработанной медьсодержащими микропузырьками, что указывает на значительное улучшение систолической функции левого желудочка ($p < 0,05$) (фиг. 17).

Инвазивные гемодинамические параметры оценивали в условиях стресса, создаваемого при введении лекарственного средства. При увеличении частоты сердечных сокращений в ответ на увеличение дозы добутина, параметры сердечного резерва были оценены по увеличению частоты сердечных сокращений со 100 до 140% от базового уровня. При увеличении абсолютной величины $dP/dt \max$, $dP/dt \min$ и давления открытия левого желудочка (LVPD), показатели сердечного резерва были улучшены. Инвазивные гемодинамические параметры показали, что по сравнению с необработанной группой и группой, обработанной микропузырьками, величины $\max dP/dt$ (фиг. 18А), $\min dP/dt$ (фиг. 18В) и LVPD (фиг. 19) были значительно улучшены у группы, обработанной медьсодержащими микропузырьками ($p < 0,05$).

2.2. Размер области инфаркта

Авторами было оценено влияние обработки на объем инфаркта миокарда, измеренного с помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ) до начала обработки и через две недели после обработки. Сравнительный анализ показал, что размер области инфаркта у группы, обработанной ультразвуковыми контрастными микропузырьками, содержащими медь-альбумин (Cu+MB), заметно снижался по сравнению с размером у этой группы до обработки (фиг. 20). Однако, у необработанной группы и у группы, обработанной только микропузырьками (MB), размер области инфаркта не обнаруживал каких-либо существенных изменений.

Результаты подтвердили терапевтический эффект обработки ультразвуковыми контрастными микропузырьками, содержащими медь-альбумин (CAUCM), в отношении уменьшения размера области инфаркта при лечении ишемии сердца.

2.3. Иммуногистохимический анализ

Плотность капилляров: CD31 использовали в качестве маркера эндотелиальных клеток. Иммуногистохимический анализ пограничной области и области инфаркта показал, что значительная часть CD31-меченных капилляров присутствует у группы, обработанной медьсодержащими микропузырьками (фиг. 21 и 22), и это число значительно превышает число, наблюдаемое у необработанной группы и у группы, обработанной микропузырьками ($p < 0,05$). Статистический график плотности капилляров показал, что плотность CD31-меченных капилляров значительно увеличивалась в пограничной области и в области инфаркта после обработки медьсодержащими микропузырьками. * означает $p < 0,01$. Местный кровоток был значительно улучшен.

Ki-67-позитивные клетки были оценены на пролиферативную активность под конфокальным микроскопом. Данные показали, что после обработки медьсодержащими микропузырьками, в области инфаркта появлялось много пролиферирующих клеток. HIF-1 α в области инфаркта детектировали с помощью иммуногистохимического анализа. Данные показали, что HIF-1 α локализуется, главным образом, в цитозоле и в ядрах резидентных кардиомиоцитов и эндотелиальных клеток. Уровень HIF-1 α заметно увеличивался в области инфаркта (фиг. 24). На фиг. 24 показано, что HIF-1 α присутствует в цитозоле (стрелка) и в ядрах (острие стрелки) кардиомиоцитов и эндотелиальных клеток. Экспрессия HIF-1 α увеличивалась в области инфаркта.

Уровень белка HIF-1 α значительно увеличивался в области инфаркта по сравнению с другой областью, как было определено методом Вестерн-блот-анализа. На фиг. 25 показан уровень белка HIF-1 α в различных частях для каждой группы, а на фиг. 26 показана экспрессия HIF-1 у каждой группы с инфарктом миокарда.

VEGF и VEGFR1 представляют собой HIF-1-регулируемые гены. Уровень мРНК VEGF и VEGFR1 тестировали с помощью ОТ-ПЦР для выявления транскрипционной активности HIF-1. Как показано на фиг. 27 и 29, уровень мРНК этих двух генов заметно снижался у необработанных групп и у групп, обработанных микропузырьками, но значительно увеличился у Cu-обработанной группы (фиг. 28, 30). Это указывает на то, что хроническая гипоксия приводит к снижению транскрипционной активности HIF-1,

которая может быть восстановлена путем Cu-обработки.

Концентрацию Cu в миокарде определяли с помощью ААС. Как показано на фиг. 33, концентрация Cu возрастает после Cu-обработки у группы с ишемией миокарда.

Механизм аккумуляции HIF-1 α в ответ на ишемическое повреждение миокарда включает модуляции PND. Ферментативная активность PND требует наличия кислорода, восстановленного железа и 2-оксоглутарата. Кроме того, эти ферменты чувствительны к доступности кислорода, на которую влияют многие метаболические изменения, включая активный кислород, молекулы которого генерируются по цепи транспорта электронов и при нарушении метаболизма и функции митохондрий. Таким образом, белки PND действуют как датчики кислорода, и вместе с этим чувствительны к изменениям транскрипционной активности HIF-1. Таким образом, недостаток кислорода в ишемическом миокарде нарушает функцию PND, что приводит к повышенному накоплению продуктов генов, реагирующих на HIF-1 α и HIF-1. Острая ишемия миокарда приводит к повышенному накоплению HIF-1 и к экспрессии HIF-1-регулируемых генов, среди которых имеются гены, участвующие в ангиогенезе. Ранее проводимое исследование указывало на увеличение мРНК и белков HIF-1 α и VEGF в биоптате желудочка у пациентов, перенесших операцию по коронарному шунтированию, которые имели патологические признаки острой ишемии. В исследованиях на животных-моделях было также установлено, что системная ишемия приводит к значительному повышению HIF-1 α и к коронарному заболеванию.

Проведенное ранее исследование на выделенных сердцах крыс, ортогонально перфузированных в конфигурации Лангендорфа, дало прямое доказательство значительной мобилизации меди в коронарном потоке сразу же после длительной, но не кратковременной ишемии сердца. При перфузии Лангендорфа выделенных сердец крыс, уровень меди был в 8-9 раз выше предышемического уровня в первой фракции коронарного кровотока (CFF) при реперфузии (0,15 мл) через 35 мин после ишемии. Уровни в последующих CFF снижались и достигали предышемического уровня, что указывало на выброс меди при возобновлении коронарного кровотока. Через 18 мин после ишемии уровень меди в первой CFF при реперфузии только на 15% превышал предышемический уровень. Потеря меди в первой CFF четко коррелирует со степенью потери сердечной функции. Через 18 мин после ишемии сердечная функция составляла приблизительно 50%, и это повреждение рассматривалось как обратимое, тогда как через 35 мин функциональная потеря превышала 80% и считалась необратимой. Таким образом, потеря меди после длительной ишемии в сердце непосредственно зависит от ишемической токсичности.

Повышение уровней гомоцистеина при ишемии миокарда известно уже давно и рассматривается как фактор риска развития патогенеза миокарда. Было отмечено, что одновременное увеличение меди и гомоцистеина в крови одновременно наблюдается у пациентов с сердечно-сосудистым заболеванием. Разумно предположить, что отток меди из сердца ассоциируется с гомоцистеином. Существует ряд доказательств, указывающих на взаимодействие между медью и гомоцистеином. Во-первых, во всех случаях наблюдалось, что гипергомоцистеинемия связана с высокими концентрациями меди, а также церулоплазмина в крови. Во-вторых, комплексы меди и гомоцистеина были идентифицированы *in vitro*. В-третьих, добавление меди приводит к восстановлению медьзависимой ферментативной активности в условиях воздействия гомоцистеина. В целом, эти наблюдения позволяют предположить, что взаимодействие меди и гомоцистеина может быть ответственно за отток меди из сердца.

Медь способна стабилизировать HIF-1 α по механизму, участвующему в ингибировании пролилгидроксилаз. Однако, это действие меди будет таким же, как и действие других переходных металлов, таких как кобальт и никель, которые не играют существенной роли в активации HIF-1, но повышают активность HIF-1, когда клетки подвергаются воздействию избыточного количества этих переходных металлов. Проведенные авторами исследования показали, что медь необходима для транскрипционной активности HIF-1. Образование хелатного комплекса меди в культивированных клетках блокирует IGF-1-индуцированную экспрессию HIF-1, связывающегося с чувствительным к гипоксии элементом (HRE), и экспрессию VEGF. Этот ингибирующий эффект может быть ослаблен путем добавления избытка меди в культуры. Кроме того, авторами было обнаружено, что это действие меди зависит от шаперона для Cu, то есть, Zn-супероксиддисмутазы (CCS) и гена CCS, сайленсинг которого блокирует IGF-1-индуцированную экспрессию HIF-1, связывающегося с HRE, и экспрессию VEGF, что, тем самым, имитирует эффект образования хелатного комплекса меди. Кроме того, CCS непосредственно взаимодействует с HIF-1 α , как показал анализ методом иммунопреципитации.

Существует множество сайтов, которые потенциально требуют присутствия меди для активации HIF-1, включая синтез HIF-1 α , стабилизацию, транслокацию из цитоплазмы в ядро, связывание с последовательностью генов-мишеней HRE, и образование транскрипционного комплекса HIF-1. Авторами был точно определен механизм действия меди в регуляции транскрипционной активности HIF-1 в клетках человеческой гепатомы HepG2. Обработка клеток HepG2 тетраэтиленпентамином (ТЕРА), образующим хелатный комплекс с медью, или кiPНК, нацеленной на CCS, приводила к подавлению индуцируемой гипоксией активации HIF-1. Добавление избыточного количества меди приводило к ослаблению ингибирования посредством ТЕРА, но не посредством сайленсинга гена CCS. Такой сайленсинг гена CCS исключал возможное сильное воздействие на образование неспецифического хелатного комплекса под

действием ТЕРА. Следовательно, полученные данные показали, что медь необходима для активации HIF-1, но это действие является CCS-зависимым. Снижение уровня меди не влияет на продуцирование или стабильность HIF-1 α , но снижает уровень связывания HIF-1 α с последовательностью геном-мишеней HRE и с p300, то есть, с компонентом транскрипционного комплекса HIF-1. Очевидно, что медь ингибирует FHN-1, в результате чего образуется транскрипционный комплекс HIF-1. Таким образом был сделан вывод, что медь необходима для активации HIF-1 поскольку она регулирует связывание HIF-1 α с HRE с образованием транскрипционного комплекса HIF-1. Следовательно, дефицит меди подавляет транскрипционную активность HIF-1 благодаря снижению уровня FHN-1.

Для доказательства этой концепции, авторами было проведено исследование с использованием пищевых добавок с медью для мышей с гипертрофической кардиомиопатией. Мыши были подвергнуты перегрузке давлением путем сужения восходящей аорты, и через 4 недели после такой процедуры развивалась гипертрофия сердца. Пищевые добавки с физиологически соответствующими уровнями меди давали после развития гипертрофии сердца. Через 4 недели после введения меди было установлено, что уже развившаяся гипертрофическая кардиомиопатия исчезала, и такое обратное развитие происходило в дальнейшем при перегрузке давлением. Продолжительная перегрузка давлением приводила к снижению уровней меди и VEGF в сердце наряду с подавлением ангиогенеза миокарда. Пополнение меди приводило к восстановлению уровня меди в сердце, к повышению уровня VEGF и к стимуляции ангиогенеза.

HIF-1 состоит из конститутивно экспрессируемых HIF-1 β (ARNT) и HIF-1 β (или HIF-1 β), которые подвергаются двухстадийной (цитозольной и ядерной) регуляции гидроксилирования в аэробных условиях. В цитозоле, HIF-1 β подвергается пролилгидроксилированию под действием трех основных пролилгидроксилаз (PHD), которые используют O₂ в качестве субстрата. Гидроксилированный HIF-1 β связывается с белком фон Хиппеля-Линдау (pVHL), который нацеливает HIF-1 β на убихитинизацию и деградацию протеосомы. В ядре HIF-1 β взаимодействует с кофакторами SRC-1, CBP и p300, которые ингибируются аспарагингидроксилазой или фактором, ингибирующим HIF-1 (FHN-1). FHN-1 также является O₂-зависимым ферментом. В условиях гипоксии, PHD и FHN-1 ингибируются, что приводит к "ускользанию" протеосомы от деградации под действием HIF-1 β и к облегчению образования транскрипционного комплекса HIF-1 и, тем самым, к активации фактора транскрипции. Было обнаружено, что Co и Ni ингибируют PHD, имитируя условия гипоксии, что приводит к активации HIF-1 β . Избыток Си также ингибирует PHD и оказывает такое же влияние на HIF-1 β , как Co и Ni. Однако, Си необходима для взаимодействия между HIF-1 и HRE и действует как физиологический ингибитор FHN-1, обеспечивая тем самым образование транскрипционного комплекса HIF-1. Таким образом, недостаток Си ингибирует активность HIF-1 (фиг. 34).

Ишемия миокарда приводит к накоплению HIF-1 α и к истощению меди. В этих условиях, накопление HIF α не может приводить к активации транскрипции HIF, поскольку медь необходима для образования транскрипционного комплекса HIF и взаимодействия HIF с последовательностью HRE в генах-мишенях. Поэтому, несмотря на накопление HIF в ишемическом миокарде, дефицит меди блокирует HIF-регулируемую экспрессию генов, участвующих в ангиогенезе, что приводит к подавлению ангиогенеза миокарда. Это приводит к инфаркту миокарда и к дальнейшему прогрессированию сердечной недостаточности.

Таким образом, данное исследование было проведено путем нацеленной доставки меди посредством ультразвука, запускающего разрывы медьсодержащих микропузырьков для увеличения содержания меди в локальной области ишемии в целях лечения инфаркта миокарда. Результаты показали, что транскрипционная активность HIF увеличивалась в области инфаркта, а также значительно повышалась плотность капилляров. Кроме того, эхокардиографическое исследование показало, что функция сердца улучшалась после обработки медьсодержащими микропузырьками. Кроме того, сердечный резерв был увеличен соответственно у группы, обработанной медью. Результаты этого эксперимента убедительно показали, что индуцированный ультразвуком разрыв медьсодержащих микропузырьков будет представлять собой новую стратегию доставки меди для лечения инфаркта миокарда.

Пример 3. Лечение ишемического повреждения головного мозга у крыс с помощью медьсодержащих биологических материалов

Для исследования нового метода лечения ишемии головного мозга, в этом примере использовали медьсодержащие наноматериалы для лечения ишемии у крысиных моделей в целях тестирования его терапевтического эффекта в отношении ангиогенеза.

1. Экспериментальные методы

1.1. Создание крысиной модели ишемии

Здоровых самцов крыс Sprague-Dawley (SD) (с массой тела 270 \pm 15 г) помещали в комнату с постоянной температурой и влажностью и 12-часовым циклом смены дня и ночи. Перед операцией крыс содержали в условиях голодания в течение 12 часов со свободным доступом к питьевой воде.

1.2. Технические методы

Крыс произвольно разделяли на 5 групп: контрольную группу, IR-группу, IR+Cu-группу, IR+NM-группу, IR+Cu - NM-группу. Крысам с ишемией головного мозга соответственно вводили одинаковые

объемы материала, содержащего Cu, NM, Cu-NM (10 мк/л) в стереотаксический желудочек на 7-ой день после хирургической операции, а также оценивали функции нервов и проводили ТТС-окрашивание в течение 14 дней. Затем ткань головного мозга фиксировали 4% параформальдегидом для иммуногистохимического детектирования.

1.3. Стадии создания модели окклюзии и реперфузии средней церебральной артерии (МСаО)

Анестезию индуцировали 10% хлоралгидратом (0,35 мл/100 г) путем внутривентриальной инъекции, но без канюлирования трахеи и дыхательного аппарата. Если у крыс не наблюдалось движения конечностей, частота дыхания составляла увеличивалась приблизительно в 30-60 раз, а глаза были закрыты, то можно считать, что анестезия крыс прошла успешно. Следующие процедуры были проведены методом Koizumi и Longa (Koizumi et al, 1986, Longa EZ, 1989), то есть, методом шовной окклюзии, для создания модели окклюзии средней церебральной артерии с улучшенным швом. Традиционный метод проводили путем наложения нейлонового однонитиевого шва 4-0, диаметром 0,20-0,25 мм, кончик которого был закруглен путем нагревания пламенем. Поскольку кончик не был достаточно большим, то кровеносный сосуд не мог быть полностью блокирован, что приводило к обратному потоку. Модифицированный шов, диаметром 0,32 мм и с кончиком 5 мм, покрытым силикагелем, был помечен на 18 мм. Внешняя сторона шва, конец которого был покрыт силиконом, терлась о внешнюю стенку сосуда, что не давало утечки. И таким образом была уменьшена скорость обратного потока и повышена вероятность успеха создания данной модели.

После анестезии, крыс помещали на операционный стол. Во время хирургической операции, ректальная температура поддерживалась на уровне 37,0°C с помощью грелки-подушки. Шерстяной покров шеи сбрасывали, хирургическую область дезинфицировали повидоном-йодом и деиодировали 75% этиловым спиртом, а затем накладывали стерильные хирургические простыни. После разрезания кожи шеи по средней передней линии ножницами для ткани длиной 3 см, шейную мышцу и щитовидную железу прямо разделяли зажимом для сосудов до обнажения общей сонной артерии (ССА), а затем общую артерию отделяли вдоль сонной артерии для выделения внешней сонной артерии (ЕСА) и внутренней сонной артерии (ІСА). После лигирования дальнего конца ЕСА, кровоток сонной артерии блокировали временным зажимом и делали небольшой разрез в ССА. Шов был вложен в ОАС через небольшой разрез, а затем его осторожно и медленно продвигали вдоль ССА и блокировали до тех пор, пока не была достигнута обструкция, вызванная временным зажимом. Затем временный зажим снимали, и шов сразу проталкивали во внутреннюю сонную артерию. Если во время продвижения шва ощущалось сопротивление, то кончик шва вставляли в переднюю церебральную артерию, и боковая стенка шва давала окклюзию средней церебральной артерии, а поэтому продвижение шва должно быть остановлено для предотвращения попадания шва в крылонебную артерию. Крылонебная артерия представляет собой внешнюю черепную ветвь ІСА. Шов не должен быть продвинут на глубину 10 мм, если он был вставлен в крылонебную артерию. После удаления шва и правильной регуляции направления, он может быть вставлен в ІСА. Следующая операция, такая как наложение шва на разрез мышцы и кожи, дезинфекция йодом и наложение стерильной повязки крысам во влажной камере при 33°C были проведены для восстановления от наркоза. Через 90 минут после МСаО, анестезию проводили снова, и шов удаляли для реперфузии крови. Вытаскивание шва прекращали, когда ощущалось сопротивление. Сопротивление указывает на то, что кончик шва достигвилки общей сонной артерии, после чего шов отрезали снаружи кожи. При этом необходимо поддерживать температуру тела и добавить нормальный физиологический раствор. Для предотвращения инфекции внутримышечно вводили 400000 единиц пенициллина.

1.4. Послеоперационная оценка мозгового повреждения

Оценка тяжести неврологического заболевания: крысы с идеальной моделью МСаО обнаруживали различную степень неврологической дисфункции после восстановления сознания. Основным симптомом является гемиплегия передних конечностей, а также поворот головы в противоположную сторону, вращение или опускание головы после поднятия, изгиб тела в одну сторону и сгибание задних конечностей у животного-модели. Во время наблюдения определяли выживаемость.

Оценку неврологической дисфункции проводили после пробуждения крыс. В этом эксперименте использовали критерии оценки по 18 баллам, табл. 3. Система оценки MNSS была разделена на баллы (всего 18 баллов): 1. Подвижность (6 баллов): наблюдение степени сгибания контралатеральных передних конечностей при подъеме хвоста. 2. Ощущения (2 балла): сильные и слабые ощущения. 3. Испытание на равновесие на бруске (6 баллов): наблюдение состояния равновесия после ишемии для установления степени неврологического дефекта. 4. Рефлексия (4 балла): включая рефлексию ушной раковины, роговицы, испуг, судороги и т.п. "0" означает нормальное состояние, "18" очень серьезное нарушение. Слабые повреждения: 1-6, умеренное повреждение: 7-12; тяжелое повреждение: 13-18. В случае отсутствия у крыс видимой неврологической дисфункции после ишемии и реперфузии, эти крысы были исключены из исследования через 24 ч после реперфузии.

Таблица 3. Модифицированная оценка тяжести неврологической дисфункции по баллам

Классификация	Оценка
Тесты на подвижность	
Подъем хвоста у крыс (3)	
Сгибание передних конечностей	1
Сгибание задних конечностей	1
Поворот головы на >10° по вертикальной оси за 30 секунд	1
Помещение крыс на пол (норма =0; максимум =3) (3)	
Нормальное передвижение	0
Неспособность к прямому передвижению	1
Вращение в направлении пораженной стороны	2
Падение на пораженную сторону	3
Тесты на чувствительность (2)	
Тест на устойчивость (вируальный и тактильный тест)	1
Проприоцептивный тест (глубокая чувствительность, отталкивание подушечкой лапы от края стола в ответ на стимуляцию мышц конечностей)	1
Тесты на равновесие на бруске (норма=0; максимум =6) (6)	
Равновесие в положении прямо	0
Захват одной стороны бруса	1
Захват бруса и падение 1 конечности с бруса	2
Захват бруса и падение 2 конечностей с бруса или верчение на бруске (>60 с)	3
Попытки удержаться на бруске, но с падением (>40 с)	4
Попытки удержаться на бруске, но с падением (>20 с)	5
Падение; отсутствие попыток удержаться или повиснуть на бруске (<20 с)	6
Отсутствие рефлекса и аномальные движения (4)	
Рефлекс ушной раковины (тряска головы при дотрагивании до слухового канала)	1
Рефлекс роговицы (моргание глаз при легком дотрагивании ватным тампоном до роговицы)	1
Рефлекс испуга (двигательный ответ на кратковременный шум от захлопывания папки с бумагами)	1
Эпилептические припадки, синдром «пляшущих глаз», миодистония	1

Измерение области инфаркта:

Реакцию ТТС (2, 3, 5-хлорирование трифенилтетразолия) с сукцинодегидрогеназами митохондрий проводили для детектирования активности клеток. Появление белого цвета при ТТС-окрашивании срезов головного мозга указывало на наличие ишемического повреждения головного мозга. ТТС-окрашивание (2%) было осуществлено без света при 37°C. Образцы мозга брали в разное время (18 на группу) и помещали на пресс-форму для срезов ткани, которую до этого хранили при -20°C. После 10-минутного замораживания, головной мозг разрезали на 6 срезов от обонятельной луковицы к затылочной доле в пресс-форме для срезов толщиной 2 мм на срез. Затем срезы погружали в 2% ТТС и помещали на 30 мин в инкубатор при 37°C, после чего фиксировали в 10% параформальдегиде в течение ночи.

ТТС-окрашивание показало, какая часть срезов ткани головного мозга была поражена гипоксией. А поэтому, ТТС-мечение области повреждения головного мозга было широко использовано для детектирования размера области ишемии головного мозга. Каждое изображение среза фотографировали на цифровую камеру (цифровую камеру Powershot 400, Canon Corp) и обрабатывали с помощью компьютерной программы Image J для вычисления площади повреждения головного мозга. В то же время, авторами была использована модифицированная формула для исключения отклонений в результате воздействия отека мозга на фактический объем повреждения головного мозга: скорректированный (%) = {[область контралатерального полушария-(пораженная площадь полушария-область поражения головного мозга)]/площадь контралатерального полушария}×100%.

Определение индекса атрофии головного мозга: этот эксперимент проводили для исследования изменения церебрального инфаркта в хронической фазе, где область инфаркта головного мозга имела различные степени атрофии в течение 10 дней, и это было особенно заметно на 14-й день. Степень атрофии головного мозга вычисляли так же, как и площадь церебрального инфаркта. Индекс уменьшения площади полушария головного мозга с церебральным инфарктом (%) = $\frac{\text{объем полушария}-\text{объем инфаркта}}{\text{объем полушария}} \times 100\%$.

1.5. Получение медьсодержащих биологических материалов

В этом примере описано получение коротких пептидов, имеющих сайты связывания с Cu^{2+} (состоящих из гистидина, аргинина и глицина). Короткий пептид может связываться с Cu^{2+} с образованием стабильных образцов гидрогеля, состоящих из нановолокон биологических наноматериалов (Cu-NM, содержащих 80 мкМ CuSO_4). Cu-NM имеет функцию, осуществляющую медленное высвобождение Cu^{2+} в определенный участок поврежденных тканей и органов и способствующую регенерации органа с ишемическим повреждением ткани благодаря эффективному биологическому действию меди и устранению побочных эффектов ионов меди в нормальных тканях и органах.

1.6. Интравентрикулярная инъекция медьсодержащих наноматериалов стереотаксическим методом

Локализация боковых желудочков у крысы анатомическая карта коронарной плоскости показала, что боковые желудочки у крысы расположены на 0,8 мм от брегмы, 1,5 мм сбоку от средней линии, на глубине 4-4,5 мм. Этот участок является оптимальным местом инъекции препарата.

На 7-ой день после церебральной ишемии/реперфузии, крыс анестезировали путем внутривентрикулярной инъекции 10% хлоралгидрата (3,5 мл/кг). Крыс фиксировали на стереотаксическом аппарате после анестезии, и шерсть в теменной области выбривали. После общей стерилизации и покрытия асептическим полотенцем на коже делали разрез 1 см по средней линии для выделения брегмы.

Было просверлено крошечное отверстие на 1,5 мм сбоку от средней линии, на 0,8 мм сзади от брегмы на черепе, без повреждения ткани мозга. 10 мкл Cu-NM-вещества забирали шприцом, который был зафиксирован и отрегулирован для корректировки положения кончика иглы. Затем кончик иглы шприца вводили в небольшое отверстие и делали инъекцию в ткань головного мозга точно на глубину 4,5 мм. Затем инъецировали Cu-NM-материал и через 5 мин после инъекции шприц вынимали, и небольшое отверстие герметично закрывали костным воском. Разрез кожи зашивали. В то же самое время, группе Су-обработки инъецировали 10 мкл Су; группе, которую обрабатывали наноматериалом, инъецировали 10 мкл наноматериала; а плацебо-группу и контрольную группу не обрабатывали. Затем оценивали неврологическую функцию, и проводили TTC-окрашивание для измерения объема инфаркта и степени атрофии головного мозга через 14 дней после обработки.

1.7. Детектирование патологии

Cu, NM, Cu-NM вводили в желудочек головного мозга через одну неделю после создания модели церебральной ишемии/реперфузии. Ткань головного мозга собирали через одну неделю обработки (пять крыс в каждой группе). После анестезии авторами была проведена перфузия сердца 0,9% физиологическим раствором и 4% параформальдегидом, после чего ткань головного мозга быстро удаляли и фиксировали в 4% параформальдегиде. Срез головного мозга был выбран на уровне зрительных нервов коронарной секции, а затем его окрашивали следующим образом.

Н&Е-окрашивание:

Образцы фиксировали 10% нейтральным формалином, дегидратировали и заливали в парафин. Предметные стекла и покровные стекла пропитывали в течение ночи азотной кислотой и очищали водопроводной водой и дистиллированной водой, а затем протирали безводным спиртом и помещали в место, не содержащее пыли. После сушки в 37°C, предметные стекла обрабатывали полилизинными таблетками. Партии 4 мкм-срезов заливали в парафин рутинным методом, а затем сушили в печи при 60°C. Вкратце, стадии стандартного Н&Е-окрашивания включают: (1) получение срезов ткани (4 мкм), залитых в парафин после его гидратации, (2) распределение срезов ткани в гематоксилине Харриса в течение 5 мин и промывку водой в течение 1 мин, (3) дифференциацию срезов ткани 75% этанолом и соляной кислотой в течение 30 с и промывку водой в течение 1 мин, (4) обработку срезов ткани аммиаком в течение 30 с и промывку водой в течение 1 мин, (5) окрашивание срезов тканей в этаноле с кислым эозином в течение 12 мин, (6) быструю промывку срезов ткани водой, (7) дегидратацию срезов ткани с получением прозрачных срезов, (8) фиксацию срезов нейтральной смолой. Затем проводили мониторинг патологических изменений в области инфаркта головного мозга и сравнивали с тканью контралатерального отдела головного мозга.

Иммуногистохимический анализ: этот анализ проводили для детектирования ангиогенеза. Детектированные области включали зону инфаркта, прилегающие области инфаркта и ткань контралатерального отдела нормального головного мозга. После мечения кровеносных сосудов CD31, авторами было проведено наблюдение ангиогенеза при ишемии головного мозга после введения медьсодержащих наноматериалов. Вкратце, стадии иммуногистохимического анализа включают: (1) получение срезов ткани (4 мкм), залитых в парафин после его гидратации, (2) гашение эндогенной пероксидазы 3% H_2O_2 (пероксидом водорода), (3) блокирование этих срезов 10% кроличьей сывороткой в течение 30 мин при комнатной температуре, (4) инкубирование с "первым" козым поликлональным антителом против крысного

CD31 (1:2000) при 4°C в течение ночи, (5) после промывки, инкубирование среза со "вторым" козьим поликлональным антителом против крысного CD31 (1:2000) в течение 1 ч, (6) инкубирование с комплексом, состоящим из фермента пероксидазы хрена и авидина (1:200), (7) окрашивание диаминобифениламином (DAB).

1.8. Статистический анализ

Данные были статистически проанализированы с помощью компьютерной программы SPSS14.0 (SPSS, Chicago, IL), то есть, программы для измерения величины "среднее \pm стандартное отклонение" ($X \pm SD$) для всех результатов сравнения, полученных с использованием t-критерия. Несколько групп сравнивали с применением дисперсионного анализа (ANOVA), критерия наименьших значимых различий (LSD) и дисперсии. Равная дисперсия не предполагалась, и она может быть скорректирована методом Геймса-Хоуэлла. $\alpha=0,05$ для уровня контроля, $P<0,05$ для значимых статистических различий.

2. Результаты эксперимента

2.1. Наблюдения после операции, вероятность успеха моделирования и выживаемости

Швы вставляли через внутреннюю сонную артерию и через 90 мин удаляли для создания модели церебральной ишемии/реперфузии. После восстановления крыс от наркоза у них наблюдались такие симптомы, как поворот головы в противоположную сторону, отсутствие подвижности контралатеральной передней конечности, вращение в противоположную сторону или опускание головы после поднятия, опускание контралатеральной передней конечности при подъеме хвоста. Из всех 300 МСАО-моделей, 210 моделей были успешными (показатель успеха 70%), 30 моделей были неудачными (10%), а 60 крыс погибли (20%).

Таблица 4. Создание моделей на крысах

	Успех	Неудача	Гибель животных				Всего
			САН	Энцефалооте к	Операция	Другие	
	210	30	18	24	10	8	300
Показатель	70%	10%	6%	8%	3%	3%	100%

Анализ причин: у 22 крыс не наблюдалось нарушения функции конечности, а у 8 крыс наблюдались слабые симптомы паралича и восстановление через 24-48 ч. Возможными причинами являются недостаточная глубина шва, в результате чего появлялся зазор между боковой стенкой шва и внутренней стенкой сосуда, что приводило к кровотечению в среднюю церебральную артерию. Вторая причина заключается в том, что шов снимали при закрытии разреза кожи, что приводило к недостаточной окклюзии. В третьих, мутация кровеносных сосудов способствовала повышению толерантности к ишемии с более коротким временем восстановления неврологической функции. TTC-окрашивание продемонстрировало лишь небольшое поражение инфарктом в области базальных ганглиев у крыс этого вида после МСАО. Неудачная модель была исключена в ходе эксперимента.

В четвертых, кровоизлияние в подпаутинное пространство было обусловлено избыточной глубиной шва, слишком большим размером шва для его проталкивания и прокола сосуда этим швом, что вызывало кровоизлияние в подпаутинное пространство. В соответствии с данными после аутопсии, 18 крыс (30% от общего числа погибших крыс) погибли от кровоизлияния в подпаутинное пространство. Тяжелый инфаркт головного мозга: избыточная глубина шва вызывала тяжелую ишемию и инфаркт головного мозга. TTC-окрашивание показало, что 24 крысы (40% от общего числа погибших крыс) погибли от тяжелого отека головного мозга по всему полушарию головного мозга. Трахея и блуждающий нерв были повреждены во время операции: повреждение блуждающего нерва приводило к поступлению массы секреторируемой жидкости в дыхательные пути, что вызывало респираторную гипоксию. 10 крыс (16,7% от общего числа погибших крыс) погибли именно по этой причине.

Необъяснимая гибель: необъяснимая гибель крыс происходила в процессе размножения после хирургической операции. Авторы не нашли вескую причину гибели после анатомического исследования или TTC-окрашивания погибших крыс. В этой группе было 8 крыс, что составляет 13,3% от общего числа погибших крыс.

2.2. Оценка повреждения нейронов

Через 14 дней после ишемии головного мозга, оценка функции нервов показала, что плацебо-группа была нормальной, контрольная группа (IR), IR+Cu-, IR+NM-, IR+Cu-NM-группы имели различные степени повреждения функции нервов в течение 14 дней (табл. 5). Но у IR+Cu-NM-группы, оценка функции нервов через 14 дней была значительно ниже, чем у IR-группы, у IR+Cu-группы и у IR+NM-группы ($P<0,05$), причем, у IR+Cu-группы и у IR+NM-группы каких-либо значимых различий не наблюдалось (фиг. 35).

Таблица 5. Оценка неврологической функции у крыс через 14 дней после операции ($\bar{x} \pm s$)

Группы	Плацебо	IR	IR+ Cu	IR+NM	IR+ Cu-NM
NS	0	6,94 ± 0,73	6,56 ± 1,20	6,22 ± 1,17	2,72 ± 0,89#

#, P < 0,05 для IR, IR+Cu, IR+NM

2.3. Анализ объема инфаркта головного мозга

Через 14 дней после ишемии головного мозга проводили TTC-окрашивание для определения объема инфаркта головного мозга (фиг. 36А). Результаты показали, что у плацебо-группы инфаркт отсутствовал, а у IR+Cu-, IR+NM-, IR+Cu-NM-групп наблюдались различные степени инфаркта (табл. 6). Объем инфаркта головного мозга у IR+Cu-NM-группы был значительно ниже, чем у IR-группы, IR+Cu-группы и IR+NM-группы (P<0,05), причем, у IR+Cu-группы и у IR+NM-группы каких-либо значимых различий не наблюдалось (фиг. 36В).

Таблица 6. Сравнение объемов инфаркта головного мозга у крыс ($\bar{x} \pm s$)

Группы	Плацебо	IR	IR+ Cu	IR+NM	IR+ Cu-NM
Объем инфаркта (%)	0	34,14±3,99	30,16±3,96	31,57±3,52	10,81±2,98*

*, P<0,05 для IR, IR+Cu, IR+NM

2.4. Анализ индекса уменьшения головного мозга

После ишемии головного мозга локальная ткань головного мозга подверглась разжижающему некрозу и инфильтрации воспалительных клеток, и некротическая ткань постепенно поглощалась, что, в конечном счете, приводило к ишемической атрофии головного мозга. Результаты показали, что атрофия головного мозга наблюдалась через 14 дней после инфаркта головного мозга, где показатель уменьшения головного мозга (9,93±1,89%) у крыс, обработанных Cu-NM, был значительно ниже, чем у крыс IR-группы (24,22±3,39), IR+Cu+NM-группы (22,18±2,93), и IR-группы (22,11±3,52) (табл. 7), и у этой группы было больше капилляров в ткани головного мозга (фиг. 37). Между IR-группой и IR+Cu и IR+NM-группой каких-либо значимых различий не наблюдалось. На фиг. 37А показано, что уменьшение размера ткани головного мозга наблюдалось через 14 дней после инфаркта головного мозга. Головной мозг у IR+Cu-NM-группы слегка уменьшался, и в нем было больше видимых капилляров. На фиг. 37В проиллюстрировано количественное сравнение атрофии головного мозга, которое показало, что у IR+Cu-NM-группы атрофия была значительно ниже, чем у IR-группы, IR+Cu-группы и IR+NM-группы (P<0,05).

Таблица 7. Показатель атрофии головного мозга крыс ($\bar{x} \pm s$)

Группы	Плацебо	IR	IR+ Cu	IR+NM	IR+ Cu-NM
Показатель атрофии (%)	0	24,22±3,39	22,18±2,93	22,11± 3,52	9,93±1,89#

#, P < 0,05 для IR, IR+Cu, IR+NM

2.5. Изменение гистопатологической морфологии после инфаркта головного мозга

Ткань головного мозга обрабатывали путем Н&Е-окрашивания и наблюдали под микроскопом: число нейронов было большим; ядро присутствовало в нормальных тканях мозга; число нейронов было значительно ниже в области инфаркта; структура клеток была разреженной и неупорядоченной; наблюдался широкий спектр некроза клеток, частичный автолиз клеток, нечеткая структура, исчезновение ядрышек и более свободные пузырьки нервных волокон вокруг нейронов в области инфаркта.

2.6. Детектирование ангиогенеза

Ангиогенез детектировали посредством иммуногистохимического окрашивания маркером CD31 васкулярных эндотелиальных клеток для оценки числа кровеносных сосудов. В основном, наблюдалась окружающая область ишемии головного мозга (пограничная ишемическая зона, IBZ). На фиг. 39 показана область детектирования ангиогенеза в виде небольшого прямоугольника, обозначаемого IBZ. Затем подсчитывали число сосудов на квадратный миллиметр. Результаты показали, что большое число новых кровеносных сосудов располагалось вокруг области инфаркта головного мозга у IR+Cu-NM-группы, и число кровеносных сосудов у этой группы было явно больше, чем у других групп (фиг. 40).

Инфаркт головного мозга также называют ишемической церебральной апоплексией (ишемия головного мозга, ИГМ), это заболевание является результатом нарушения кровоснабжения головного мозга, вызываемого стенозом или окклюзией сосудов, приводящих к ишемии, гипоксии и некрозу соответствующих частей ткани головного мозга, причем, такие повреждения встречаются довольно часто, и на их долю приходится около 80% всех случаев апоплексии головного мозга. В настоящее время, для восстановления кровоснабжения ишемических тканей самым эффективным способом лечения ИГМ является лечение тромболитом на очень ранней стадии, если это возможно. Однако, "окно" при лечении тромболитом строго ограничено (<3 ч). Терапевтическое окно при лечении тромболитом для некоторых пациентов

может быть продлено до 4,5 ч, однако только менее, чем у 5% пациентов с тромболизом такое лечение является безопасным и эффективным. Лечение тромболиза по прошествии такого терапевтического окна приводило к тяжелому ишемическому/реперфузионному повреждению при ишемии/реперфузии (IR), к повышению риска геморрагической трансформации, и к повышению тяжести заболевания. В настоящее время подтверждено, что различные виды нейропротективных лекарственных средств являются эффективными у животных-моделей, но дают незначительный эффект при клиническом применении.

Ишемическое повреждение головного мозга, как сигнал повреждения ткани, инициирует механизмы саморегенерации и саморепарации ткани. Но при хроническом повреждении, отсутствие сигнала о повреждении ткани приводит к значительному снижению или к потере способности к саморепарации и регенерации организма, в результате чего эндогенная регенерация является ограниченной и не может восстанавливать поврежденную функцию головного мозга. Таким образом, авторами настоящего изобретения была активирована природная система регенерации и репарации ткани посредством экзогенного вмешательства. Такое экзогенное лечение активирует природную способность к регенерации тканей и стимулирует ангиогенез и регенерацию нервов. Сочетание регенерации нервов и сосудов способствует восстановлению неврологической функции.

Ангиогенез играет важную роль в восстановлении нервной функции после ишемии головного мозга. Новообразованные периферические сосуды, в основном, расположены в области инфаркта, то есть, в ишемической области и в полутемной полосе (ишемические полутени, IP). Под влиянием коллатерального кровообращения, ишемический перешеек и полутемная полоса обеспечивают определенный компенсирующий поток крови. В отсутствие какого-либо лечения, в ишемической полутени будет происходить гибель клеток. Таким образом, экзогенное вмешательство будет стимулировать ангиогенез в ишемическом полутемном поясе, и тем самым спасти поврежденные нервные клетки посредством стимуляции роста капилляров вокруг области ишемии и формирования коллатерального кровообращения. И, наконец, в случае возникновения ангиогенеза в ишемической области будет происходить восстановление нервной функции.

Медь является важной частью регуляции активности фактора, индуцирующего гипоксию, 1 (индуцирующего гипоксию фактора 1, HIF-1). Медь может активировать HIF-1 через транскрипционный комплекс HIF-1 и стимулировать экспрессию VEGF, ангиопоэтина-1 и других факторов, и тем самым стимулировать ангиогенез. Добавление меди в ишемическую ткань миокарда может способствовать эффективному восстановлению кровоснабжения органов микроциркуляции, и наконец, регенерации ткани миокарда и восстановлению функции нейронов.

Избыточное количество меди может приводить к окислительному стрессу и вызывать серьезные побочные эффекты в организме, а поэтому система регулируемой доставки меди является идеальным инструментом для использования меди в медицине. Идеальный переносчик меди должен быть богат медью и дольше оставаться в конкретном участке повреждения. Благодаря медленному высвобождению медьсодержащей системы будет активироваться природная регенерация ткани с последующей стимуляцией улучшения нервной функции, а поэтому двухвалентная медь должна иметь хорошую биосовместимость и не отторгаться организмом. В этом примере, ионы меди объединяют с наноматериалами (нано-биоматериалом, NM). Этот новый вид медьсодержащих наноматериалов (Cu-NM) имеет очень хорошую биологическую совместимость и может стимулировать эффективное поглощение меди посредством медленного высвобождения ионов меди в области ишемии, что, тем самым, будет стимулировать ангиогенез в области ишемии и увеличивать приток крови за счет улучшения микроциркуляции поврежденной ткани головного мозга, в результате чего будет происходить репарация поврежденной ткани и восстановление поврежденной функции головного мозга.

Это лечение проводили путем инъекции медьсодержащих наноматериалов в желудочек головного мозга крыс через 7 дней после ишемии/реперфузии.

Объем инфаркта и атрофия головного мозга значительно уменьшались через 14 дней. Функция нервов явно улучшалась. Cu-NM-материал стимулировал регенерацию области инфаркта головного мозга и периферических сосудов, которые были бы полезны для восстановления нервной функции. На 1-й день после ишемического повреждения головного мозга, размер области инфаркта головного мозга и баллы оценки нервной функции были самыми высокими, после чего размер области инфаркта постепенно снижался, что также приводило к постепенному устранению дисфункции у крыс. Размер области инфаркта немного изменялся на 14-й день. В случае персистентного ишемического/реперфузионного повреждения наблюдалось подавление природной системы репарации. Однако, эта обработка активировала природный механизм репарации организма с последующей мобилизацией стволовых клеток, которые поступали в область инфаркта, и, в конечном счете, превращались в зрелые клетки и заменяли некротические клетки. В этом примере приводится убедительное доказательство улучшения природной функции репарации ткани благодаря введению меди.

Медь регулирует экспрессию различных сосудистых факторов роста, таких как VEGF посредством регуляции HIF-1. Эти факторы ответственны за ангиогенез. Результаты указывали на значительное увеличение плотности капилляров вокруг области инфаркта головного мозга. Один VEGF может только способствовать образованию новых кровеносных сосудов, но для образования зрелых кровеносных со-

судов требуется также участие различных факторов. Медь не только индуцирует образование новых кровеносных сосудов, но также способствует их созреванию. Эти множественные факторы являются более эффективными, чем отдельно взятый VEGF. Этот пример показал, что медь способствует регенерации периферических сосудов в области инфаркта и стимулирует восстановление нервной функции.

Этот пример показал, что лечение медью в значительной степени снижает атрофию головного мозга. После инфаркта головного мозга в областях инфаркта наблюдаются некроз и атрофия нейронов и глиальных клеток, но лечение медью может частично устранять атрофию головного мозга. Исследования показали, что пораженный инфарктом головной мозг способен восстанавливаться после его повреждения. В центральной нервной системе, регенерация нервных клеток наблюдается в двух конкретных областях: в субэпендимальной области (субвентрикулярной области, SVZ) и в зубчатой извилине гиппокампа гранулярной области (в субгранулярной области, SGZ). В физиологических условиях, нервные клетки образуются в области SVZ и мигрируют вдоль рострального мигрирующего потока (ростральный мигрирующий поток, RMS) к обонятельной луковице, что приводит к усилению апоптоза нервных клеток. Однако, в условиях ишемии головного мозга, регенерация нервов в области SVZ была значительно увеличена, и новые нервные клетки изменяли традиционные пути миграции RMS в области повреждения, что способствовало восстановлению окружающих тканей. Эти исследования показали, что центральная нервная система отвечает на повреждение посредством пролиферации нервных клеток и хоминга клеток в область повреждения. Таким образом, медь может быть ответственна за стимуляцию регенерации нервов. Поскольку регенерация нервов зависит от источника регенерации сосудов, то оба эти эффекта способствуют восстановлению нервной функции. Медь может стимулировать экспрессию различных сосудистых факторов роста, и эти факторы также играют важную роль в регенерации нервов. Исследования *in vivo* и *in vitro* подтвердили, что VEGF повышает уровень экспрессии маркера пролиферации клеток BrdU в областях SVZ при ишемии головного мозга мышей, что указывает на то, что VEGF играет определенную роль в регенерации нервов посредством нескольких нейротропных факторов.

Пример 4. Лечение инфаркта головного мозга у макак-резусов с использованием медьсодержащего материала

В этом примере использовали 9 макак-резусов: 4 в необработанной группе и 5 в группе обработки медью.

1. Создание модели инфаркта головного мозга у макак-резуса

За 8 часов до хирургической операции, животных выдерживали в условиях голодания, а затем всем животным делали внутримышечную инъекцию 10 мг/кг кетамина и 0,2 мг/кг мидазолама для индуцирования седативного эффекта. После анестезии, животных помещали на операционный стол. Шерсть на голове и конечностях в месте прикрепления электрода и отрицательно заряженного лезвия электрического ножа тщательно сбривали для улучшения записи данных ЭКГ и проведения операции. После бритья кожи была создана венозная галерея, и подсоединен монитор. Во время хирургической операции проводили неинвазивное измерение стандартных параметров, включая частоту сердечных сокращений, кровяное давление, насыщение кислородом, парциальное давление диоксида углерода и температуру. Затем животным внутримышечно вводили инъекцию бромида векурония через канюлю, встроенную в трахею на расстоянии 3,5-4,5 см от глотки с помощью ларингоскопа. Расположение канюли трахеи должно быть подтверждено, для того, чтобы убедиться, что канюля находится в трахее, а не в пищеводе. Затем были скорректированы параметры аппарата искусственного дыхания, а именно, модель регулирования давления, P=12-20 мм рт.ст., частота дыхания=40/мин, дыхательный объем 10-15 мл/кг, давления диоксида углерода 30-40 мм рт.ст. Статус анестезии поддерживали путем ингаляции изофлурана (0-1,5%), и внутривенной микроинъекции фентанила (2 мкг/кг) и бромида векурония (0,05 мг/кг), и если такая анестезия была успешной, животных помещали на операционный стол, закрепляя голову на фиксаторе на 15° вверх, для доступа к правой лобновисочной доле.

Оперируемый участок стерилизовали иодиформом и покрывали асептическим полотенцем. Краниотомию лобновисочной доли начинали с правой скуловой дуги и заканчивали в средней линии.

Хирургическая операция включает отрезание кожи, подкожной ткани и височной доли для обнажения лобновисочной доли черепа. Затем в лобновисочной доле черепа просверливали небольшое отверстие с помощью абразивного сверла и в кости делали окно 3×5 см с помощью костных кусачек. После этого, эндокраниальную область открывали путем разрезания, закрепляли на виске и обнажали височную долю. Ткань головного мозга покрыли хлопковой тканью для уменьшения ее повреждения. Нижнюю часть лобной доли и области седла осторожно обнажали шпателем для разрезания головного мозга. После обнажения зрительного нерва, паутинное пространство должно быть отделено с помощью съемника для высвобождения цереброспинальной жидкости и уменьшения давления в ткани головного мозга. После уменьшения давления в ткани головного мозга, передняя височная доля должна быть вытянута самодвигающимся ретрактором для открывания оперируемого участка. После отделения внутренней сонной артерии от ближнего конца до дальнего конца, две ветви артерии наблюдались в развилке ICA, включая среднюю мозговую артерию (MCA) и переднюю мозговую артерию (ACA). После отделения MCA от ближнего конца до дальнего конца была выделена первая секция (секция M1). На начальную секцию M1 накладывали шов 6-0, а секцию M1 длиной 5 мм коагулировали электрическим зарядом, идущим от

двойного полюса. Затем коагулированную электрическим зарядом секцию отрезали для блокирования кровообращения в МСА. Оперируемый участок очищали нормальным физиологическим раствором, а твердую мозговую оболочку, мышцы и кожу зашивали. Рану стерилизовали и накладывали стерильную повязку.

Послеоперационный уход включал поддержание температуры тела с помощью электрического одеяла после анестезии, сохранение неблокированных дыхательных путей и вытягивание катетера из трахеи после восстановления глотательного рефлекса. Животное снова помещали в инкубационную камеру до тех пор, пока к нему не возвращалась способность перевертываться или вставать. Для облегчения боли вводили 100 мг трамадола путем внутримышечной инъекции, а для предотвращения тошноты и рвоты вводили 2 мг гранисетрона по той же инъекционной схеме. Наблюдение животного проводили 1-2 раза в день после операции для уверенности присутствия синдрома или другой патологии в прооперированном участке.

2. Оценка функции нервов у макак-резуса с моделью инфаркта головного мозга

Анализ нервной функции включал, главным образом, оценку инсульта у приматов, не являющихся человеком, по шкале баллов (по шкале баллов для оценки инсульта у приматов, не являющихся человеком, NHPSS) (табл. 8) и оценку инсульта головного мозга у обезьян по пересмотренной шкале баллов (Модифицированной неврологической шкале баллов для оценки инсульта у обезьян, mNSS) (табл. 9) для всестороннего исследования функции черепного нерва макак-резусов по многим аспектам, таким как сознание, мышечный и нервный рефлекс, равновесие. Чем выше балл оценки нервной функции, тем она хуже.

Таблица 8. Оценка инсульта по шкале баллов для приматов, не являющихся человеком, NHPSS

1. Оценка сознания (0-2)
 - 0 - норма
 - 1- состояние сонливости
 - 2- бессознательное состояние
2. Защитная реакция (0-2)
 - 0 - норма
 - 1- пониженная
 - 2 - отсутствует
3. Рефлекс захвата (справа/слева) (0-1X2):
 - 0 - присутствует; 1 - отсутствует
4. Подвижность конечностей (верхних/нижних, правых/левых) (0-4 × 4)
 - 0 - норма
 - 1 - несимметричные движения или сильный захват одной из конечностей

- 2 - явно выраженная слабость
3 - минимальное движение, сильная слабость
4 - отсутствие произвольных движений и отсутствие движений в ответ на раздражители
5. Походка (0-3)
0 - норма; 1 - хромота
2 - сильная хромота; 3 - неспособность передвигаться (но способность ползать)
6. Поворот головы (0-2)
0 - нормальное поведение
1 - заметное предпочтение поворота в одну сторону
2 - постоянная ротация
7. Брадикинезия (0-2)
0 - отсутствует; 1 - слабая; 2 - тяжелая
8. Равновесие (0-2)
0 - норма
1 - слабое нарушение
2 - серьезное нарушение, неспособность вставать на ноги
9. Невнимательность (с правой/левой стороны) (0-2 x 2)
0 - отсутствие
1 - отсутствие реакции на раздражители с одной стороны при одновременных раздражителях
2 - полное игнорирование всех раздражителей, визуальных, слуховых и тактильных
10. Ограниченное поле зрения/гемианопия (справа/слева) (0-1 x 2)
0 - отсутствует
1 - отсутствие реакции на визуальные раздражители в поврежденной области. Отличается от невнимательности отсутствием рефлекса моргания (не отличается от повреждения коры головного мозга, но диагностируется как повреждение глазного нерва или зрения в отличие от заболевания коры головного мозга).
11. Слабость лицевых мышц (справа/слева) (0-2 x 2)
0 - слабость отсутствует
1 - легкая слабость
2 - сильная слабость (при повреждении центральной 7-й мышцы, наблюдается постоянное слюнотечение и кособокий рот
-

Таблица 9. Модифицированная неврологическая шкала баллов для оценки инсульта у обезьян, mNSS

Категория	Балл
Сознание (0-8)	
Нормальное состояние, постоянная тревога и агрессивность	0
Сознание и минимальная агрессивность	1
Сознание и убежание	2
Сознание, но без убежания	3
Сонливость, вызываемая раздражителем	4
Летаргия, открытые глаза при интенсивной стимуляции	5
Ступор, вызванный постоянными раздражителями	6
Легкая кома, только двигательный рефлекс	7
Глубокая кома, отсутствие движений	8
Двигательная система (ипсилатеральная/контралатеральная) (0-14x2)	
2. Рука (сила движения/подвижность, ипсилатеральная/контралатеральная)	
Норма	0
Асимметричные движения противоположных конечностей (способность схватить прутья клетки поврежденной рукой)	1
Слабый гемипарез (способность поднимать поврежденную руку)	2
Умеренный гемипарез (явная, заметная слабость, способность лишь поддерживать тело)	3
Тяжелый гемипарез (минимальная подвижность, сильная слабость)	4
Отсутствие произвольных движений и отсутствие движений в ответ на раздражители	5
2 Нога (сила движения/подвижность, ипсилатеральная/контралатеральная)	
Норма	0
Минимальная хромота (способность передвигаться и прыгать на поврежденной ноге)	1
Слабый гемипарез (способность стоять на поврежденной ноге)	2

Умеренный гемипарез (стибание коленей под действием силы тяжести)	3
Тяжелый гемипарез (возможны движения, но не под действием силы тяжести)	4
Полный паралич и недееспособность	5
3. Слабость лицевых мышц (сила движения/подвижность, ипсилатеральная/контралатеральная)	
Норма	0
Легкая слабость	1
Сильная слабость	2
4. Рефлекс захвата	
(ипсилатеральный/контралатеральный) (0-1x2)	
Присутствует	0
Пониженный	1
Отсутствует	2
Сенсорная система (ипсилатеральная/контралатеральная (0-4x2)	
1. Чувствительность лицевых нервов	
Постоянная реакция на прикосновение к любой части лица	0
Отсутствует, отсутствие реакции на прикосновение к любой части лица	1
2. Рефлекс ушной раковины	
Дрожание уха в ответ на внешнюю/внутреннюю стимуляцию шерсти	0
Отсутствует, ухо не двигается в ответ на прикосновение	1
3. Болевой рефлекс	
Сильный, быстрый, отдергивание пальца после прикосновения	0
Слабый, медленный, неполное или самопроизвольное отдергивание пальца после прикосновения	1
Отсутствует, палец не отдергивается после прикосновения	2
Координация скелетно-мышечной системы (0-6)	
Норма, обычная походка	0
Минимальное нарушение координации, небольшое нарушение походки	1

Отсутствие координации, но карабкање по сетке из прутьев	2
Способность встать самостоятельно, падение через несколько шагов	3
Положение сидя, способность только к повороту туловища	4
Положение лежа на боку или на спине	5
Отсутствие подвижности	6
Ограниченное поле зрения/гемианопия (ипсилатеральное/контралатеральное) (0-2 x 2)	
Норма	0
Гемианопия (слепота в 1/2 части поля зрения)	1
Полная слепота	2
Заболевание щечного кармана (ипсилатеральная/контралатеральная) (0-3x2)	
Отсутствие	0
Присутствие	
Легкое (5 см)	1
Умеренное (5-10 см)	2
Тяжелое (>10 см)	3
<hr/>	
Всего: 60 баллов	

3. Результаты неврологической оценки

Инфаркт головного мозга развивался через 7 дней после ишемии головного мозга, после чего осуществляли обработку путем инъекции медьсодержащих наноматериалов и проводили послеоперационное неврологическое обследование. Было обнаружено, что дисфункция нервов у группы, обработанной комплексом меди, значительно снижалась ($P < 0,05$). Со временем наблюдалось более заметное восстановление нервной функции. Результаты показали, что комплексы меди могут эффективно стимулировать восстановление нервной функции у макак-резусов с инфарктом головного мозга и улучшать функцию нервов (фиг. 41, чем ниже оценка, тем меньше повреждение и лучше функция нервов). На фиг. 41 проиллюстрирована оценка степени дисфункции нервов у макак-резусов с моделью инфаркта головного мозга. Результаты показали, что у группы, обработанной комплексом меди, по сравнению с необработанной группой, наблюдалось значительное улучшение функции нервов.

Пример 5. Стимуляция ангиогенеза в изолированном кольце аорты крыс путем введения меди

В этом примере продемонстрировано, что VEGF играет важную роль в ангиогенезе, но при повышении уровня продуцирования VEGF, проангиогенный эффект меди не наблюдался. Стимуляция ангиогенеза в органах на системном уровне после добавления меди зависит от VEGF, но стимуляция пролиферации васкулярных эндотелиальных клеток в культуре после добавления меди не зависит от VEGF. В этом примере были использованы кольца аорты, выделенные у крыс. У крыс Sprague Dawley (8-10-недельных) выделяли аорту грудной клетки и получали срезы сосудистых колец толщиной 1,0 мм для культивирования. Затем к культурам добавляли сульфид меди в конечной концентрации 5, 25, 50 или 100 мкМ и выдерживали в течение 8 дней. К некоторым культурам добавляли тетраэтиленпентамин, образующий хелатный комплекс с медью (TEPA), в конечной концентрации 25 мкМ для блокирования действия меди. Для определения роли VEGF в стимуляции ангиогенеза после добавления меди использовали анти-VEGF антитело. Полученные данные показали, что медь в концентрации 5 мкМ в культурах стимулировала образование сосудов, но этот эффект был блокирован TEPA. Медь в концентрации выше 50 мкМ теряла свой проангиогенный эффект. Однако, медь в концентрации 5 мкМ не повышала уровня продуцирования VEGF, а в концентрации выше 50 мкМ, продуцирование VEGF значительно увеличилось. С другой стороны, обработка анти-VEGF антителом полностью блокировала проангиогенный эффект меди в концентрации 5 мкМ.

1. Методы

1.1. Выделенные у крыс кольца аорты и условия обработки

Грудные аорты брали у 8-10-недельных самцов крыс Sprague Dawley (SD) (292-307 г) и сразу переносили в чашки для культивирования, содержащие охлажденную льдом бессывороточную базальную эндотелиальную среду-2 (EBM-2, Lonza Cologne AG).

Фиброзно-жировую ткань, расположенную около аорты, осторожно удаляли тонкими микропрепараторными щипцами и ножницами для иридектомии, соблюдая при этом особую осторожность, чтобы не повредить стенки аорты. Кольца аорты длиной в один миллиметр приготавливали в виде срезов и ин-

тенсивно промывали пятью последовательными промывками EBM-2.

1.2. Анализ на ангиогенез

48-луночные планшеты для культивирования тканей покрывали 100 мкл Матригеля (GFR, BD) и оставляли в геле на 45 мин при 37°C, 5% CO₂. Кольца аорты помещали на покрытые матригелем лунки, а затем покрывали еще 100 мкл матригеля и оставляли в геле на 45 мин при 37°C, 5% CO₂. Затем в культуру добавляли 250 мкл EBM-2, содержащую 1% фетальную бычью сыворотку (FBS). В культуру добавляли раствор сульфида меди, так, чтобы конечная концентрация меди составляла 5, 25, 50 или 100 мкМ. Среду для культивирования удаляли и заменяли через каждые 2 дня. Кольца аорты фотографировали на 8-й день.

1.3. Анализ изображения

Площадь разрастания ангиогенных сосудов вычисляли с использованием компьютерной программы Image J (NIH, Bethesda, MD). Плотности микрососудов представлены в квадратных пикселях.

1.4. Вестерн-блот-анализ VEGF

После лизиса колец аорты крысы с матригелем были получены экстракты белка для анализа методом радиоиммунопреципитации (RIPA) в буфере для лизиса (Beuotime, Цзянсу, CN), содержащем 1% полную смесь ингибиторов протеазы, не содержащую этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA) (Roche, Mannheim, DE), и эти экстракты хранили в течение 30 мин на льду. Равная загрузка белка обеспечивалась путем предварительной количественной оценки с использованием набора для анализа белка, содержащего бицинхониновую кислоту (BCA) (Thermo, Rockford, USA). Соответствующее количество белка в общих лизатах разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия (ДСН) и переносили на поливинилидендифторидную мембрану (Bio-Rad, USA). Мембраны блокировали в течение 1 ч в Трис-буференном физиологическом растворе/Твинн 20 (TBST) (10 мМ Трис-НСl, рН 8,0, 150 мМ NaCl, и 0,1% твина 20), содержащем 5% обезжиренное сухое молоко, и инкубировали в течение ночи при 4°C с "первым" мышинным анти-VEGF антителом (Santa Cruz, CA, USA) и мышинным антителом против актина бета (ZSGB-BIO, Beijing, CN), разведенными в блокирующем буфере. После промывки TBST, мембраны инкубировали с антителом против мышинового иммуноглобулина G (IgG), конъюгированным с пероксидазой хрена (ПХ) (ZSGB-BIO, Beijing, CN) и разведенным в TBST, в течение 1 часа при комнатной температуре. Белки-мишени визуализировали с использованием хемилюминесцентного субстрата для ПХ (Millipore, Billerica, USA).

1.5. Нейтрализация VEGF

Кольца аорты культивировали в 48-луночных планшетах в 250 мкл среды EBM-2 (1% FBS), содержащей анти-VEGF антитело (Santa Cruz, CA, USA) в конечной концентрации 2 нг/мл. Обработку и анализ на ангиогенез проводили так же, как указано выше.

1.6. Статистический анализ

Данные получали из трех независимых экспериментов и выражали как среднее \pm ср. кв.откл. (SEM). Результаты, представленные на фиг. 42 и фиг. 44А, были сначала проанализированы с помощью одностороннего дисперсионного анализа, а затем с использованием критерия Дюннетта Т3 для сравнения множества групп. План 2 \times 2-факторного эксперимента был применен для данных, представленных на фиг. 43, 44В и 45. После детектирования значимого взаимодействия был проведен дополнительный анализ на значимость основных эффектов. Уровень значимости рассматривается как P<0,05.

2. Результаты

2.1. Влияние меди на ангиогенез кольца аорты, выделенного у крыс

На фиг. 42 показано влияние различных концентраций сульфида меди на ангиогенез выделенных у крыс колец аорты, культивированных в EBM-2 с 1% FBS. Сульфид меди добавляли непосредственно к культурам до конечной концентрации элемента меди 0 (контроля), 5, 25, 50 или 100 мкМ и выдерживали в течение 8 дней. Количественные данные получали из трех отдельных экспериментов, каждый из которых проводили с тремя образцами для каждой обработки, и данные представляли как среднее \pm ср. кв.откл.; * значительно отличается от контрольной группы (P<0,05) (масштаб=500 мкм).

Было обнаружено, что медь в концентрации 5 мкМ оказывала самое сильное стимулирующее действие на ангиогенез. Концентрации выше этого уровня не только не давали проангиогенный эффект, но также обнаруживали значительное ингибирующее действие при концентрации выше 50 мкМ. Конечные концентрации меди, включая концентрации среды, FBS (1%) и добавленной меди, составляли 26,9, 344,4, 1614,4, 3201,9 или 6416,9 мкг/л в культурах при добавлении 0, 5, 25, 50, или 100 мкМ меди, соответственно. Следовательно, концентрации меди в кольцах аорты после культивирования в течение 8 дней в различных концентрациях добавленной меди составляли соответственно 5, 9, 26, 63, 106 или 162 мкг/г ткани, и эти концентрации были пропорциональны концентрациям меди в культурах.

Тетраэтиленпентамин, образующий хелатный комплекс с медью (ТЕРА), добавляли в культуру в течение 8 дней отдельно в качестве контроля или одновременно с медью в конечной концентрации 25 мкМ. При такой обработке комплекс ТЕРА сам по себе ингибировал ангиогенез и полностью подавлял стимулирующий ангиогенный эффект при концентрации 5 мкМ меди, как показано на фиг. 43. Выделенные у крыс кольца аорты, культивированные в EBM-2 с 1% FBS, обрабатывали 5 мкМ сульфида меди, 25

мкМ ТЕРА или обоими соединениями в течение 8 дней. Количественные данные получали из трех отдельных экспериментов, каждый из которых проводили с тремя образцами для каждой обработки, и данные представляли как среднее \pm ср. кв.откл.; * значительно отличается от контрольной группы ($P < 0,05$) (масштаб=500 мкм).

2.2. Влияние меди на продуцирование VEGF в выделенном кольце аорты

Результаты, представленные на фиг. 44, показали, что при концентрации 5 мкМ в культуре медь не стимулировала продуцирование VEGF в выделенной сосудистой ткани, но при концентрации выше 50 мкМ, ингибировала ангиогенез и значительно повышала уровень продуцирования VEGF. Комплекс ТЕРА, в конечной концентрации 25 мкМ, значительно снижал уровни VEGF в выделенной у крыс ткани кольца аорты, которая была обработана 5 мкМ меди в культурах, или не была обработана (фиг. 44). На фиг. 44 проиллюстрирован Вестерн-блот-анализ на уровни белка VEGF в выделенных у крыс кольцах аорты. На фиг. 44А показано влияние различных концентраций меди на уровни белка VEGF. Протокол обработки был таким же, как показано на фиг. 42. На фиг. 44В показано влияние ТЕРА на уровни белка VEGF. Протокол обработки был таким же, как показано на фиг. 43. Все количественные данные были получены из трех независимых экспериментов и представлены как среднее \pm ср. кв. откл.; * значительно отличается от контрольной группы ($P < 0,05$).

2.3. Влияние анти-VEGF антитела на стимуляцию ангиогенеза медью

Результаты, представленные на фиг. 45, показали, что конечная концентрация 2 нг/мл только одного анти-VEGF антитела в культуре значительно ингибировала ангиогенез, и его комбинация с 5 мкМ меди полностью блокировала ангиогенный стимулирующий эффект меди. На фиг. 45 показано влияние анти-VEGF антитела на стимуляцию ангиогенеза медью. Выделенные у крыс кольца аорты, культивированные в ЕВМ-2 с 1% FBS, обрабатывали 5 мкМ сульфида меди, 2 нг/мл анти-VEGF антитела или обоими соединениями в течение 8 дней. Количественные данные были получены из трех независимых экспериментов и представлены как среднее \pm ср. кв. откл.; * значительно отличается от контрольной группы ($P < 0,05$) (масштаб=500 мкм). Однако, ни анти-VEGF-антитело, взятое отдельно, ни его комбинация с 5 мкМ меди не влияли на продуцирование VEGF (фиг. 46). На фиг. 46 показано влияние анти-VEGF антитела на уровни белка VEGF в выделенных у крыс кольцах аорты. Протокол обработки был таким же, как показано на фиг. 45. Все количественные данные были получены из трех независимых экспериментов и представлены как среднее \pm ср. кв. откл.; * значительно отличается от контрольной группы ($P < 0,05$).

Пример 6. Лечение повреждения печени путем добавления цинка

Печеночные звездчатые клетки секретируют большое количество коллагена после постоянной стимуляции спиртом, вирусом и химическим веществом. Фиброз и поражение печени вызываются избыточным отложением внеклеточного матрикса. В этом примере из-за специфической функции цинка подавлять фиброз проводили направленную терапию с добавлением цинка для активации природной саморепарации печеночной ткани, мобилизации хоминга стволовых клеток (например, мезенхимальных стволовых клеток костного мозга) в участок повреждения печени, дифференцировки этих клеток в печеночные клетки и регенерации поврежденной ткани. Целевое добавление цинка было достигнуто с помощью опосредуемого ультразвуком разрыва нагруженных цинком микропузырьков для доставки цинка в поврежденную ткань печени. После терапии путем целевого добавления цинка наблюдалось устранение фиброза печени и восстановление функции печени.

Этот эксперимент был проведен для оценки терапевтического воздействия, вызываемого разрывом нагруженных цинком микропузырьков под действием ультразвука, на фиброз печени и жирную печень. Модель фиброза печени у крыс Wister индуцировали путем инъекции 100 мг/кг тиоацетамида (ТАА) в определенные дни до появления симптомов фиброза печени. Затем эти модели были разделены на две группы, обработанную группу и необработанную группу. В группе обработки, обработку посредством разрыва нагруженных цинком микропузырьков под действием ультразвука проводили через каждые три дня. После обработки брали пробы крови для оценки поражения печени по маркерам, определения уровней жиров в крови, уровней липидов в печени, уровней коллагена, активности ферментов-антиоксидантов и избыточного окисления метаболитов липидов. Степень поражения печени оценивали путем детектирования уровней аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартаттрансаминазы (AST). TNF- α и IL- β секретируются после поражения печени, что, в свою очередь, ускоряло повреждение печени. Таким образом, уровни TNF- α и IL- β служат показателями степени поражения печени. Кроме того, обратное развитие фиброза печени может быть также оценено путем взятия срезов печеночной ткани и биопсии.

Этот эксперимент был проведен для оценки терапевтического воздействия, вызываемого разрывом нагруженных цинком микропузырьков под действием ультразвука, на химическое повреждение печени. Модель повреждения печени у крыс Sprague-Dawley индуцировали путем интубации 1 мл/кг (40%) тетрахлорметана (CCl₄) в определенные дни до появления симптома повреждения печени. Затем эти модели были разделены на две группы, обработанную группу и необработанную группу. В группе обработки, обработку посредством разрыва нагруженных цинком микропузырьков под действием ультразвука проводили через каждые три дня. После обработки брали пробы крови для оценки поражения печени по

маркерам, для определения уровней жиров в крови, уровней липидов в печени, уровней коллагена, активности ферментов-антиоксидантов и избыточного окисления метаболитов липидов. Степень поражения печени оценивали путем детектирования уровней аланинаминотрансферазы (ALT) и аспартаттрансаминазы (AST). TNF- α и IL- β секретируются после поражения печени, что, в свою очередь, ускоряло повреждение печени. Таким образом, уровни TNF- α и IL- β служат показателями степени поражения печени. Кроме того, обратное развитие фиброза печени может быть также оценено путем взятия срезов печеночной ткани и биопсии.

Пример 7. Целевое пополнение содержания меди в сердце с использованием обработанных ультразвуком микропузырьков, содержащих медь-альбумин

1. Методы.

1.1. Ультразвуковая обработка медьсодержащих микропузырьков

Ультразвуковую терапию инфаркта миокарда проводили у нормальных мышей. В хвостовую вену вливали медьсодержащие микропузырьки. При каждой обработке медьсодержащими микропузырьками, ультразвуковой зонд (Vivid 7, i13L, GE Healthcare Ultrasound) помещали в прекардиальную область грудной клетки, так, чтобы ультразвуковая волна была направлена в область инфаркта сердца. Механический индекс был установлен на 1,2. После каждой инъекции, медьсодержащие микропузырьки, которые достигали желудочков через систему кровообращения, были взорваны путем мощного ультразвукового облучения. Через определенное время, ультразвуковой зонд подавали немного назад и вперед вдоль короткой оси между верхушкой и митральным клапаном сердца. После разрыва медьсодержащих микропузырьков при каждой инъекции делали следующее вливание до тех пор, пока не была достигнута конечная доза для каждой обработки (0,5 мг/кг). После инъекции брали пробу крови и извлекали сердце.

1.2. Определение концентрации Cu.

Свежие образцы замораживали и хранили при -80°C до лиофилизации. После лиофилизации и гидролиза тканей азотной кислотой, гидролизаты были бесцветными или светло-желтыми и прозрачными без какого-либо видимого осадка или остатка. В каждый сосуд добавляли сверхчистую воду для разведения HNO_3 до 2% для последующих анализов на содержание меди. Концентрации меди определяли с помощью атомно-абсорбционной спектрофотометрии в графитовой печи (ICE3500, Thermo) с использованием программы, представленной в табл. 10.

Таблица 10. Атомно-абсорбционная спектрофотометрия в графитовой печи

Температура ($^{\circ}\text{C}$)	Время (с)	Поток газа аргона (л/мин)
90	20	0,2
120	20	0,2
850	20	0,2
2100	3	0
2500	3	0,2

2. Результаты

После инъекции медьсодержащих микропузырьков, концентрация меди в крови значительно увеличилась (фиг. 47).

Кроме того, поскольку ультразвуковой зонд давал мощное излучение, то это приводило к разрыву медьсодержащих микропузырьков. Сонопорация, индуцированная ультразвуком, также приводила к образованию временных отверстий в клеточной мембране и капиллярах, что значительно облегчало поглощение меди тканью сердца у группы, обработанной медьсодержащими микропузырьками под действием ультразвука (Cu+MB, обработанные ультразвуком), по сравнению с группой, обработанной медьсодержащими микропузырьками, но без ультразвука (Cu+MB) (фиг. 48).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Применение микроэлемента для получения лекарственного средства для индуцирования репарации ткани в ткани мозга индивидуума, имеющего повреждение ткани головного мозга, где микроэлемент представляет собой медь и где микроэлемент составлен для доставки в место повреждения.

2. Применение по п.1, где лекарственное средство предназначено для использования в комбинации с эффективным количеством стволовых клеток.

3. Применение микроэлемента для получения лекарственного средства для индуцирования восстановления ткани у индивидуума, имеющего повреждение ткани, причем лекарственное средство предназначено для использования в комбинации с эффективным количеством стволовых клеток, причем микроэлемент представляет собой медь и причем микроэлемент составлен для доставки в место повреждения, где ткань представляет собой мозг.

4. Применение по любому из пп.1-3, в котором микроэлемент составлен для прямой доставки к месту повреждения.

5. Применение по любому из пп.1-4, в котором микроэлемент заключен в микропузырьки.

6. Применение по п.5, в котором микропузырек составлен для внутривенного введения и в котором микроэлемент высвобождается посредством сайт-направленного разрыва микропузырька в месте повреждения.

7. Применение по п.6, в котором сайт-направленный разрыв микропузырька осуществляют ультразвуком.

8. Применение по любому из пп.1-7, в котором индивидуум имеет нарушенную систему восстановления тканей.

9. Применение по любому из пп.1-8, в котором индивидуум имеет хроническое повреждение ткани.

10. Применение по любому из пп.1-9, в котором индивидуум имеет дефицит стволовых клеток.

11. Применение по любому из пп.1-10, в котором возраст индивидуума составляет по меньшей мере 60 лет.

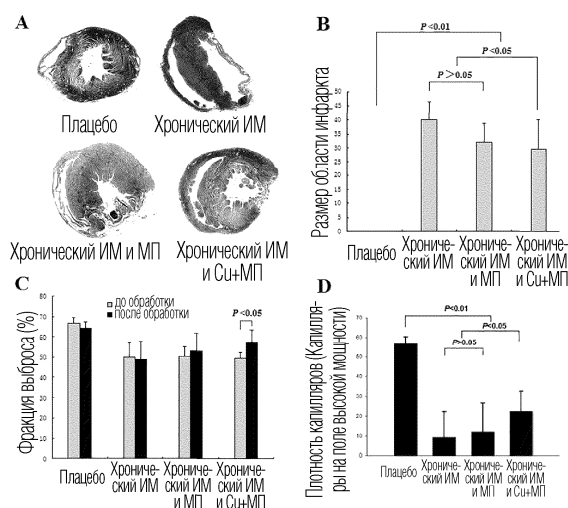
12. Применение по любому из пп.1-11, в котором микроэлемент составлен для инъекции через катетер и остается концентрированным в месте инъекции при инъекции.

13. Применение по любому из пп.1-4 и 8-12, в котором микроэлемент заключен в имплантат.

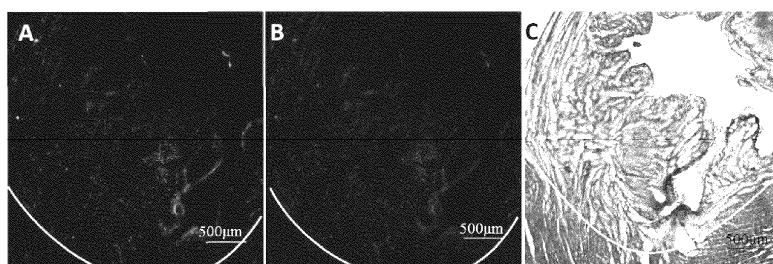
14. Применение по п.13, в котором имплантат покрыт микроэлементом.

15. Применение по п.13 или 14, в котором имплантат выбран из группы, состоящей из стента, пластины и мембраны.

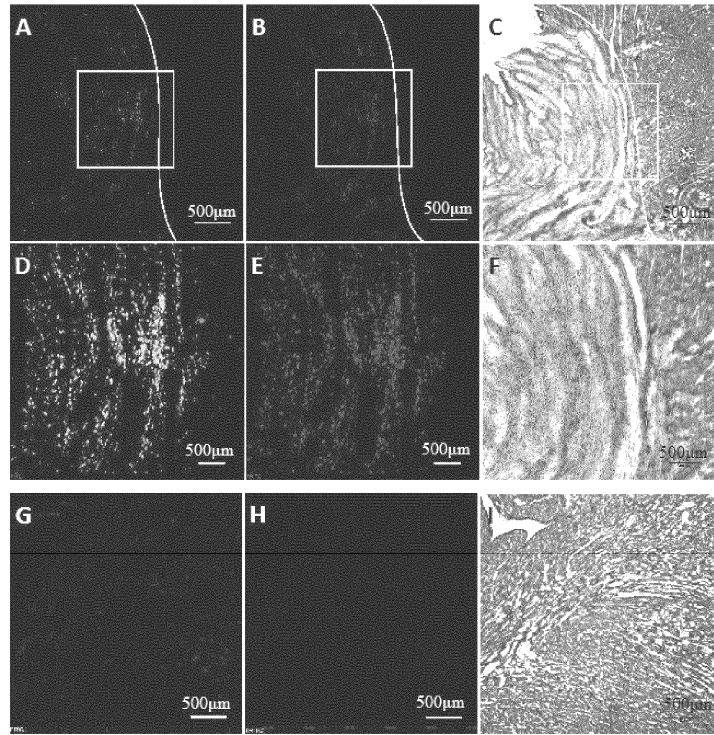
16. Применение по любому из пп.1-15, в котором рост кровеносных сосудов подлежит измерению в месте повреждения.



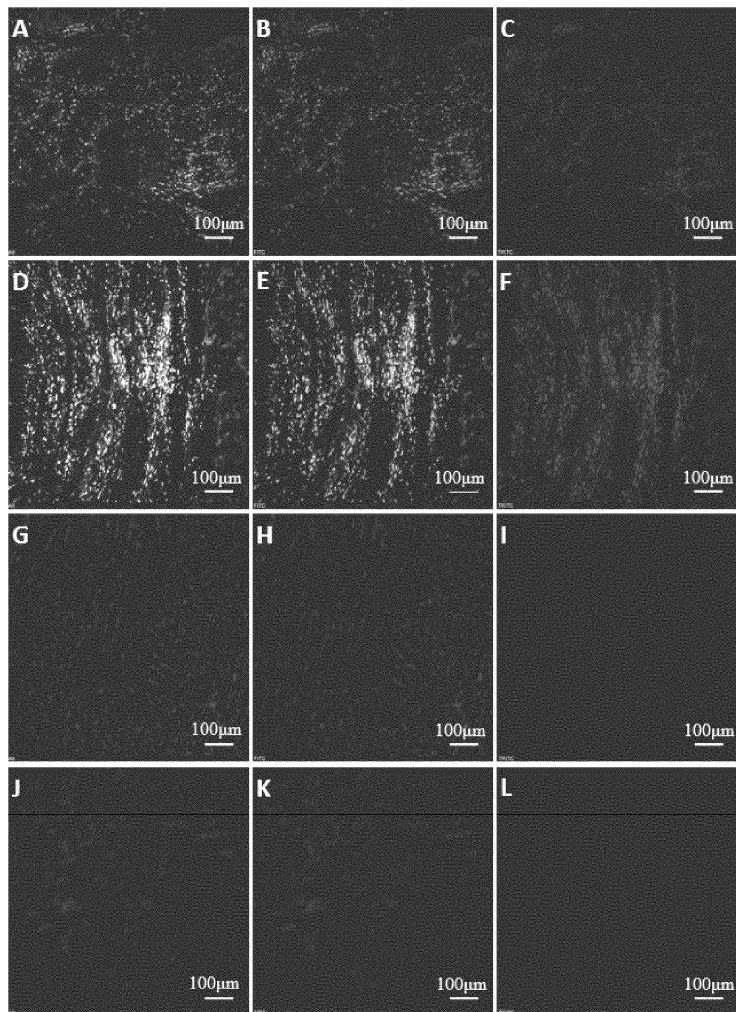
Фиг. 1



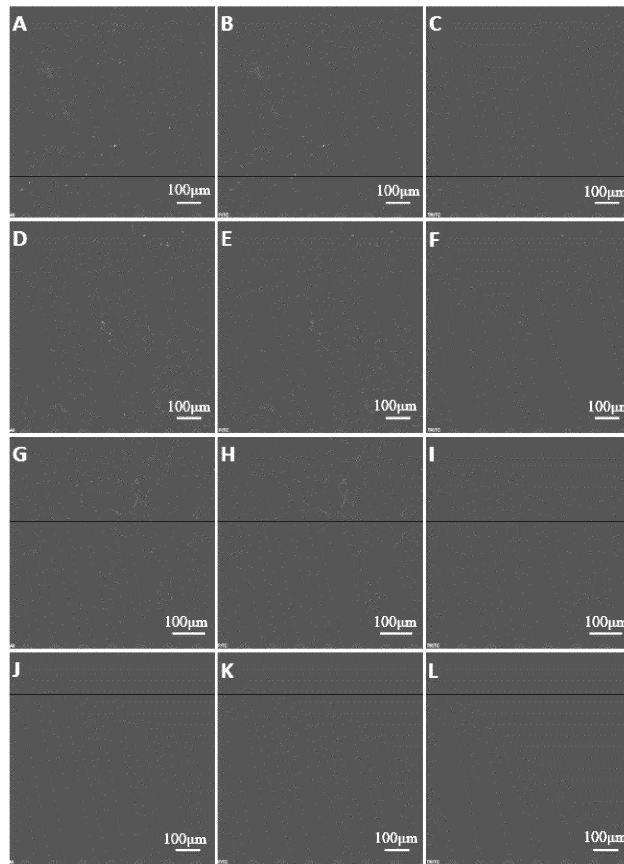
Фиг. 2



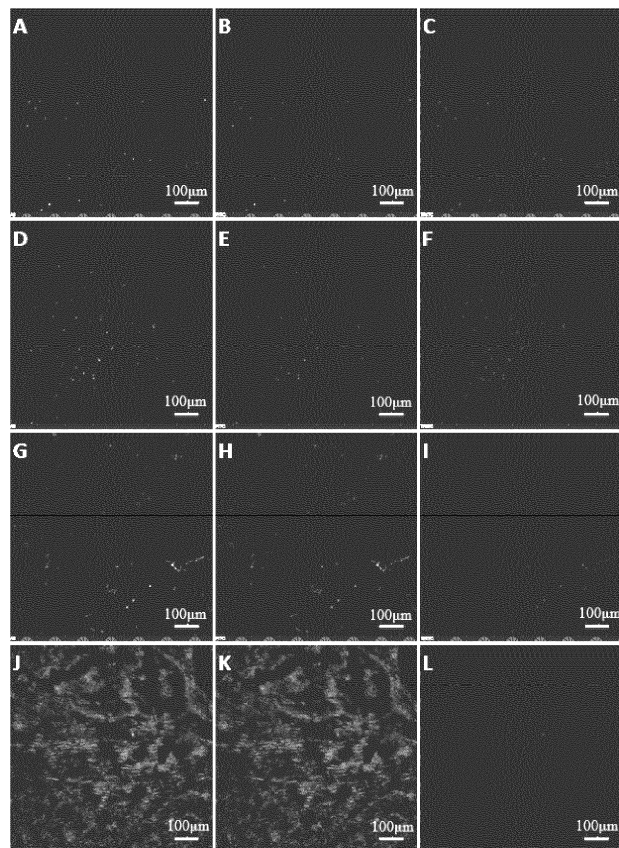
Фиг. 3



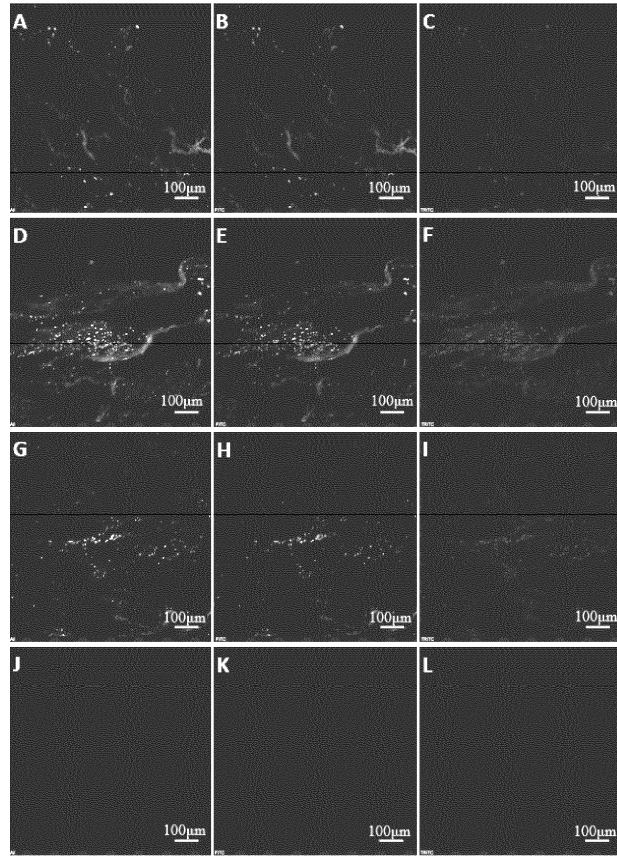
Фиг. 4



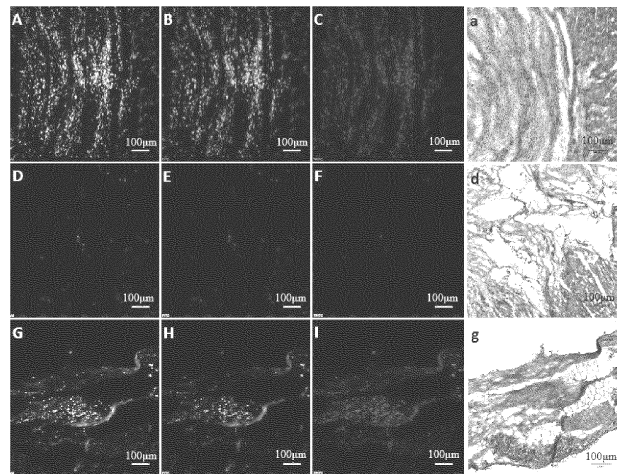
Фиг. 5



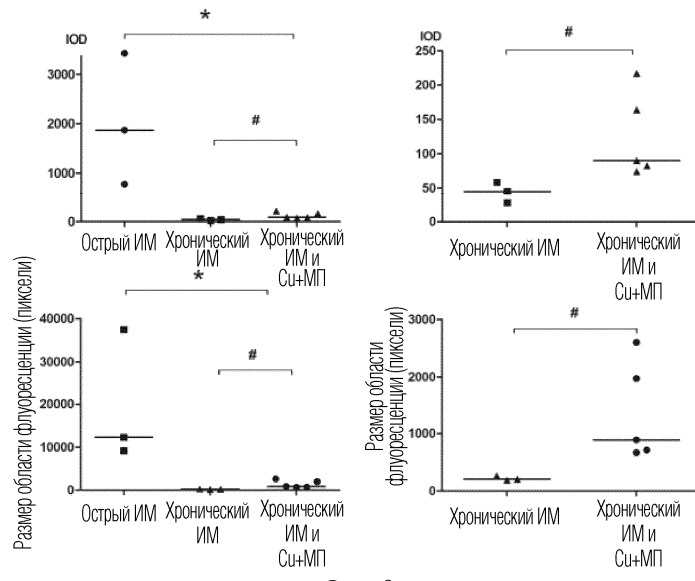
Фиг. 6



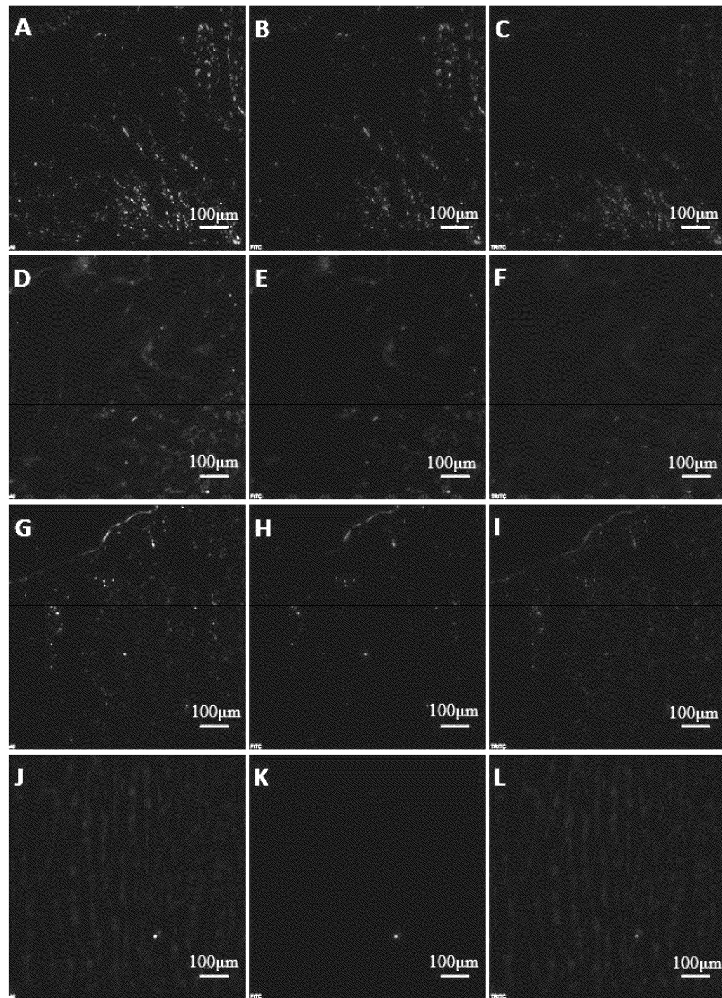
Фиг. 7



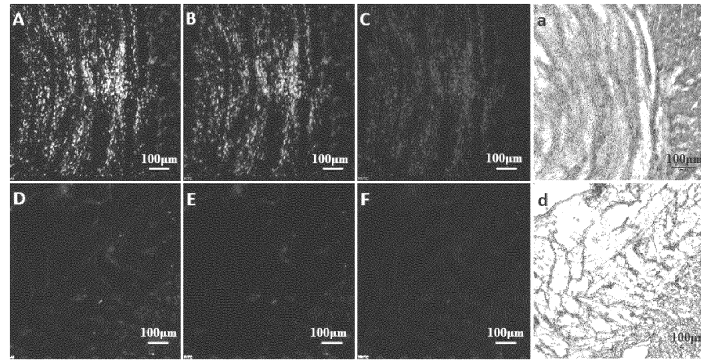
Фиг. 8



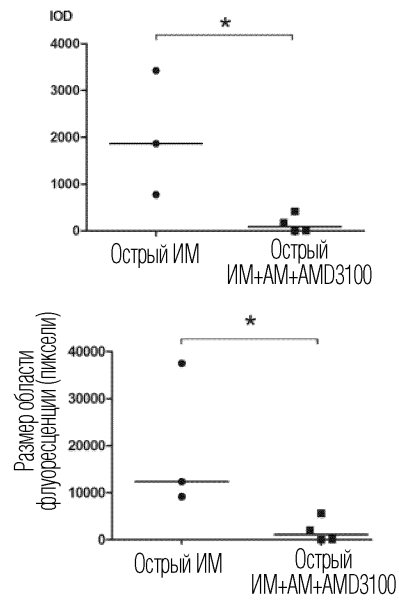
Фиг. 9



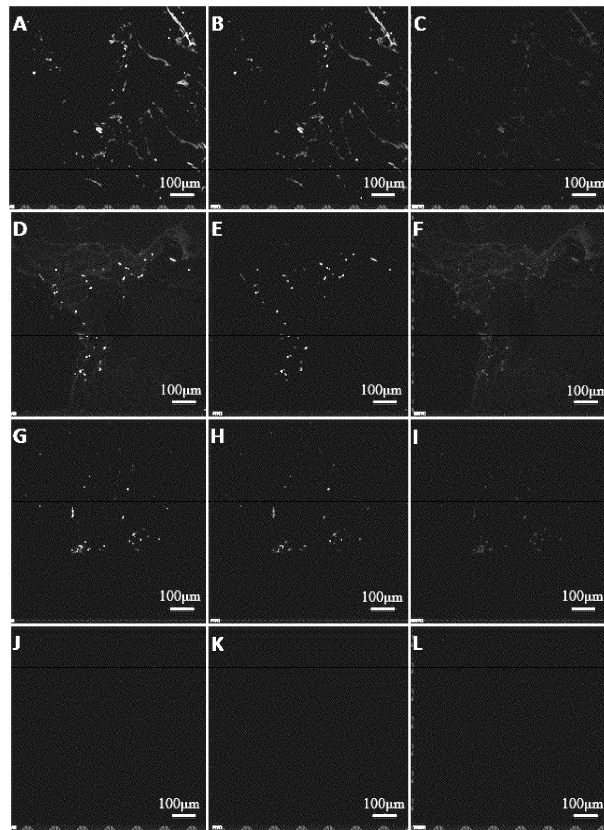
Фиг. 10



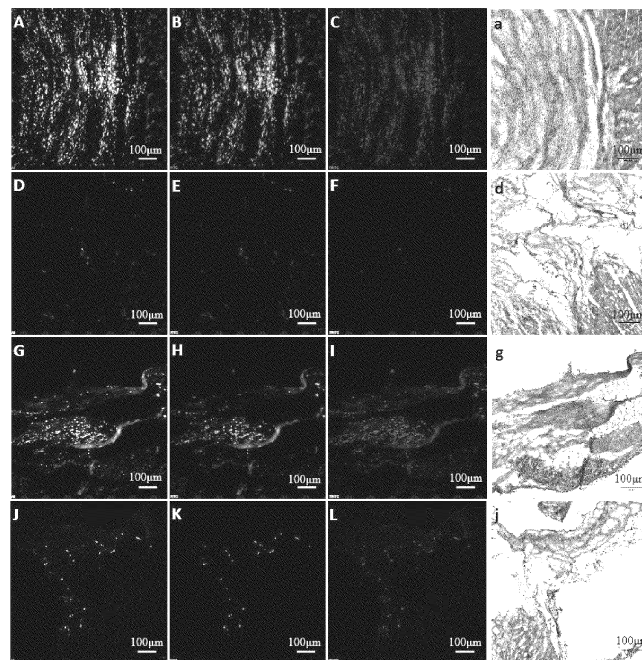
Фиг. 11



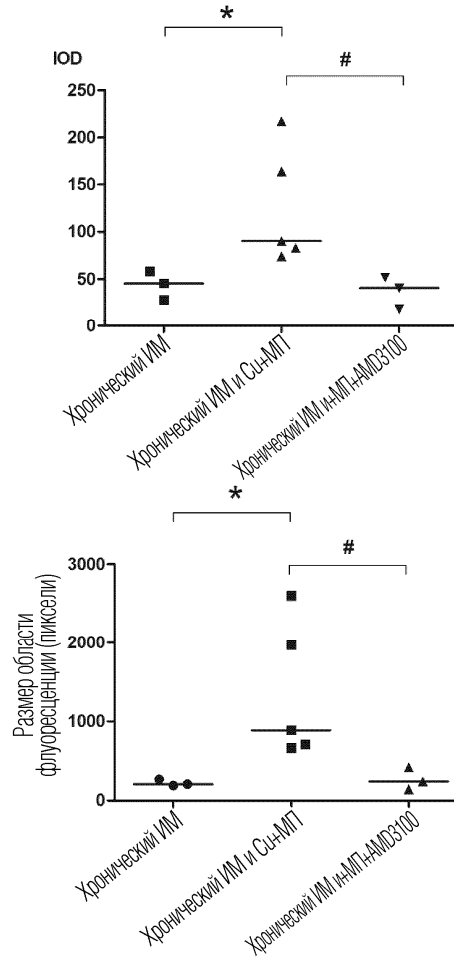
Фиг. 12



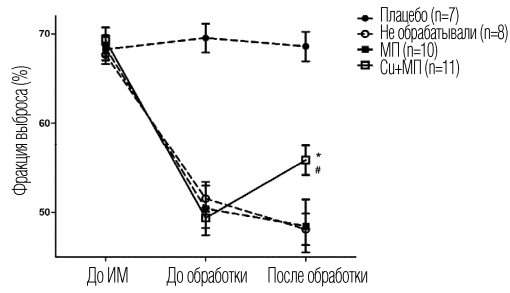
Фиг. 13



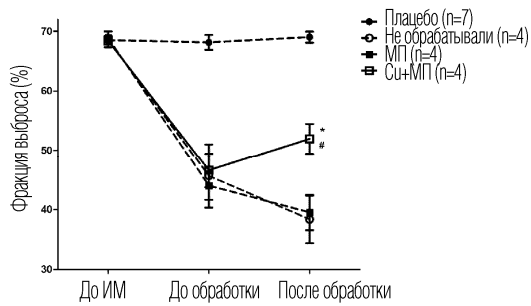
Фиг. 14



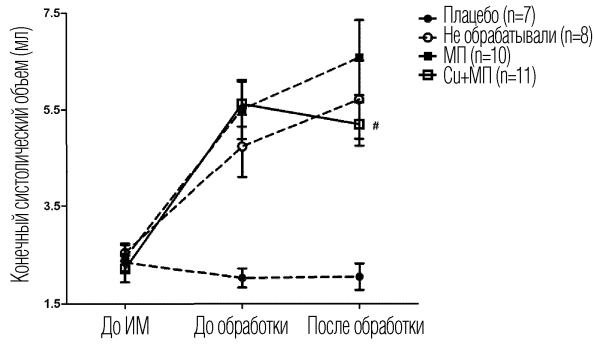
Фиг. 15



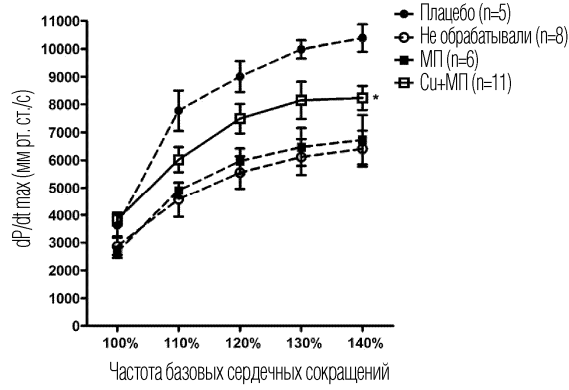
Фиг. 16А



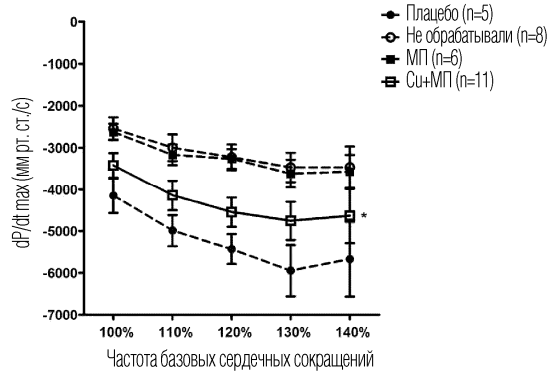
Фиг. 16В



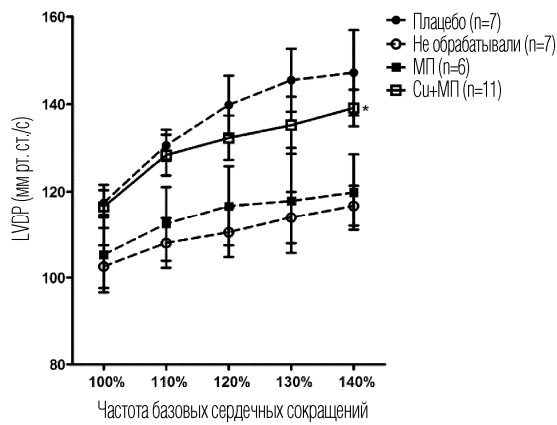
Фиг. 17



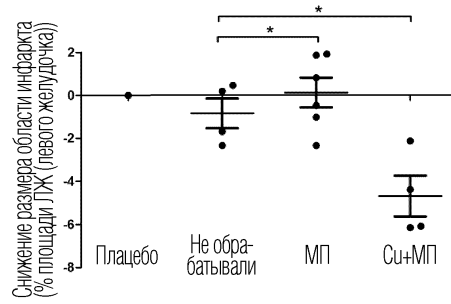
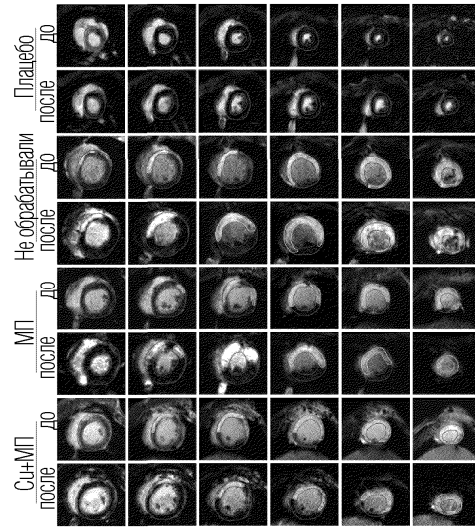
Фиг. 18А



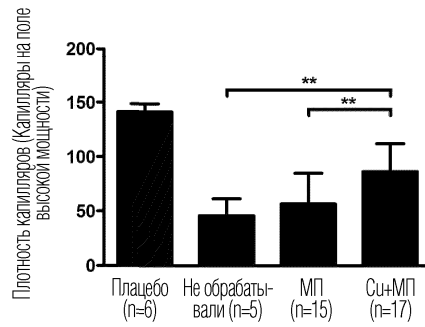
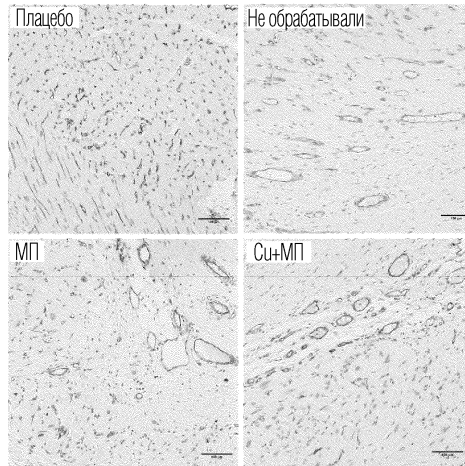
Фиг. 18В



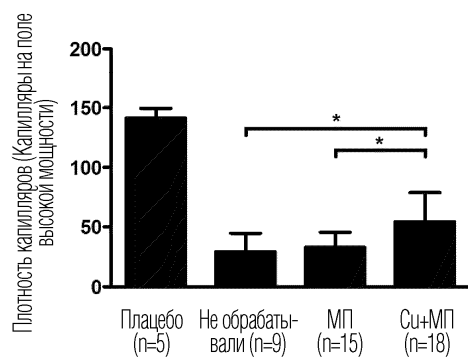
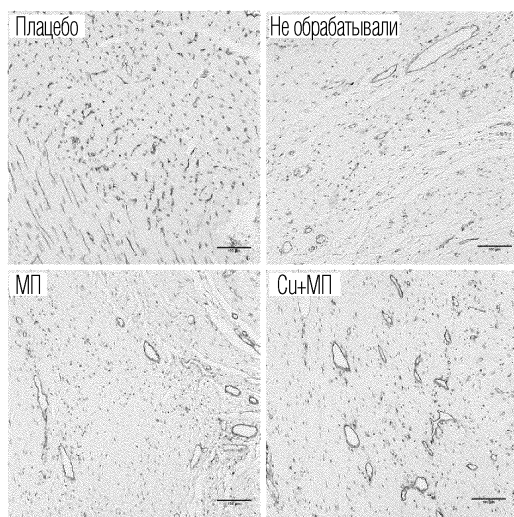
Фиг. 19



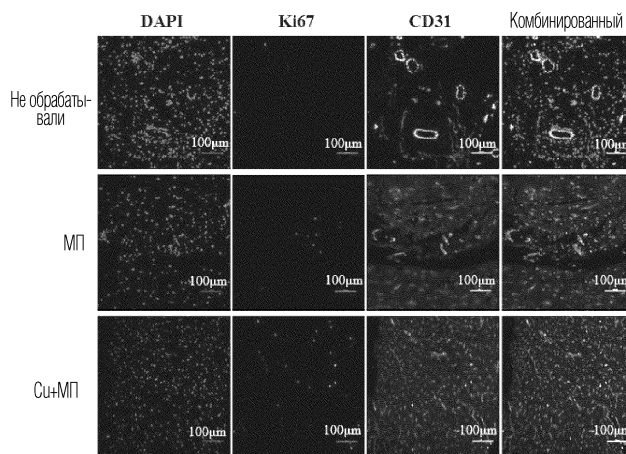
Фиг. 20



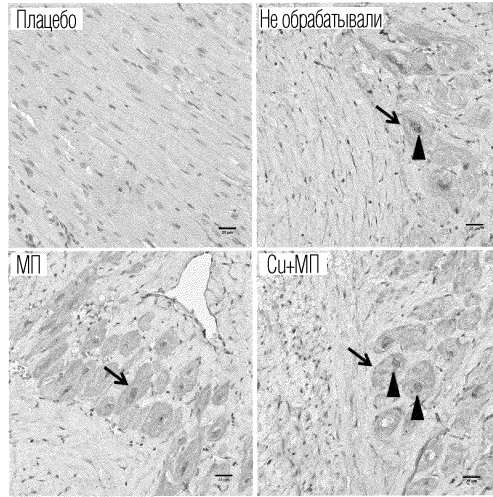
Фиг. 21



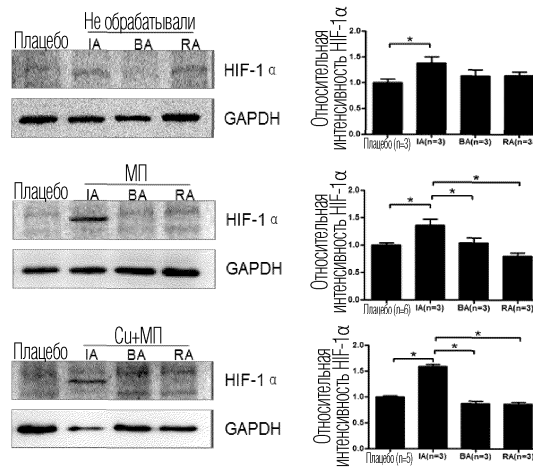
Фиг. 22



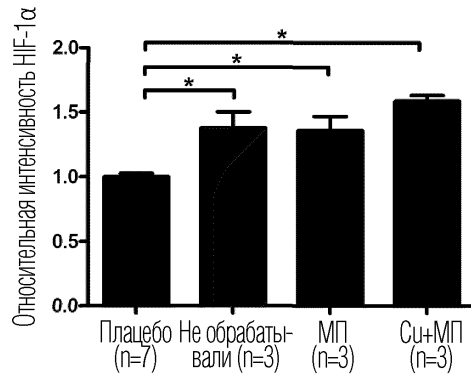
Фиг. 23



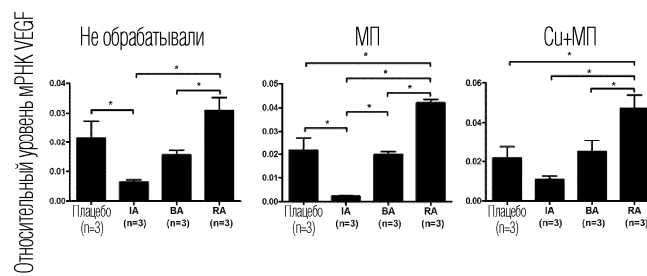
Фиг. 24



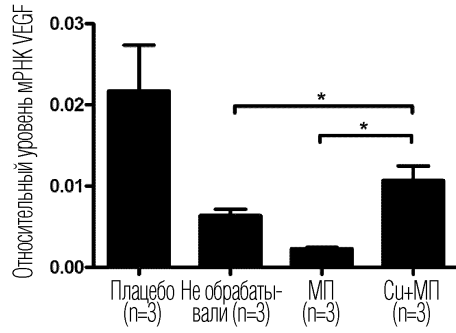
Фиг. 25



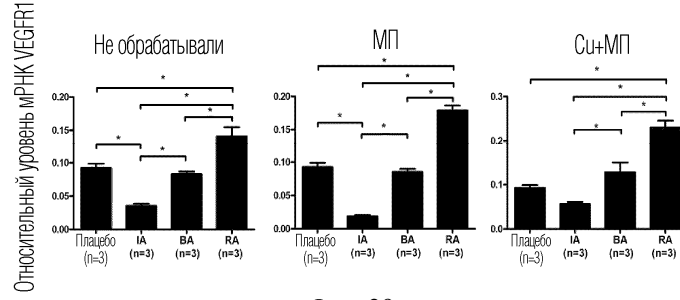
Фиг. 26



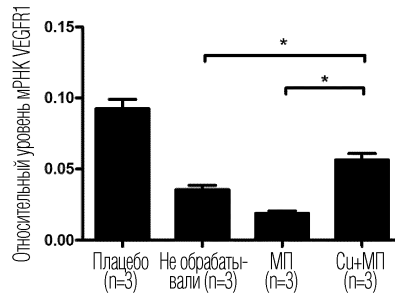
Фиг. 27



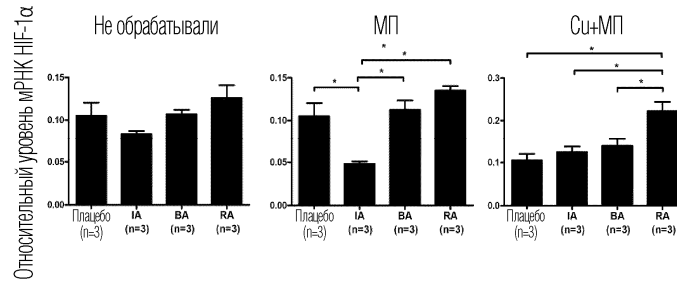
Фиг. 28



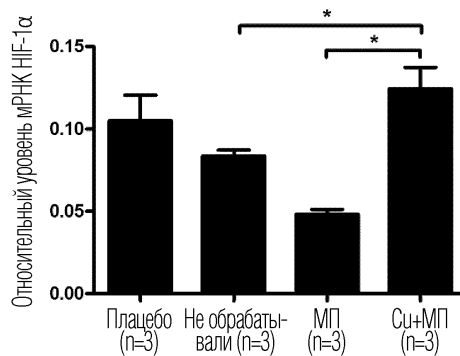
Фиг. 29



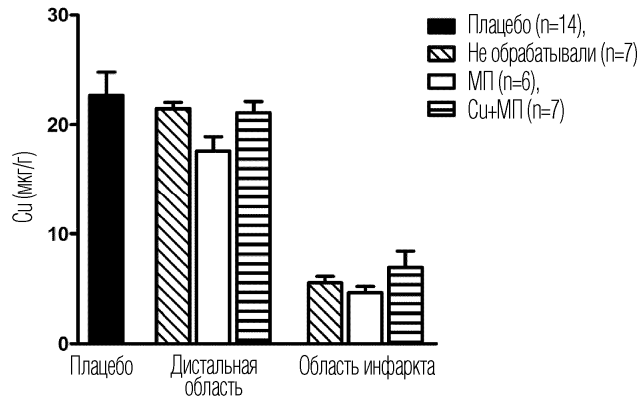
Фиг. 30



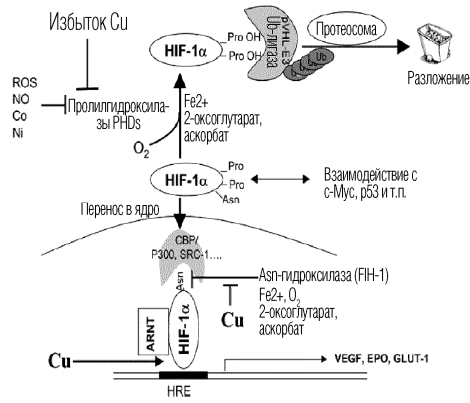
Фиг. 31



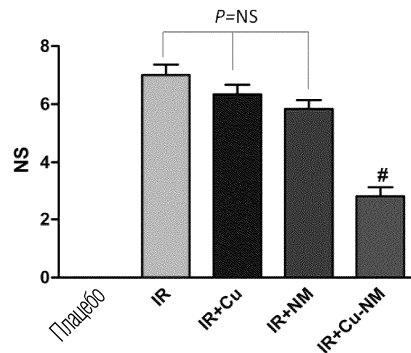
Фиг. 32



Фиг. 33

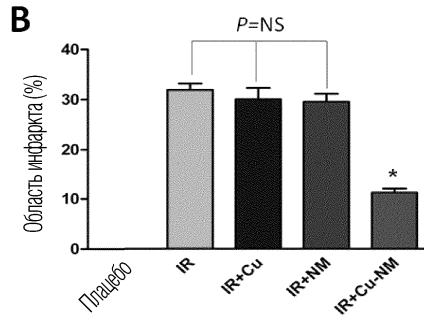
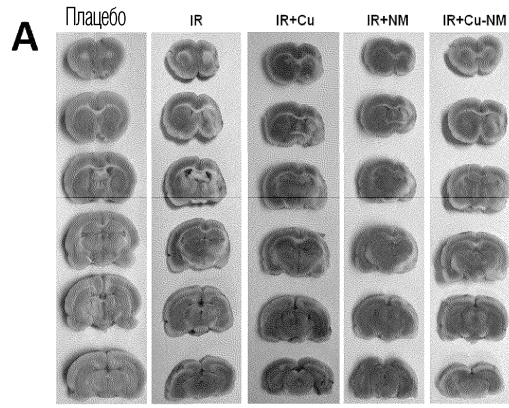


Фиг. 34



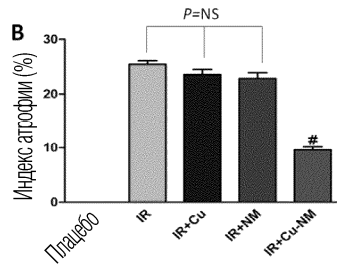
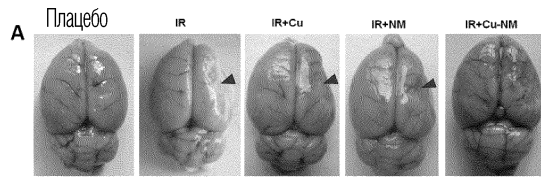
#, P < 0,05 для IR, IR+Cu, IR+NM (n=18)

Фиг. 35



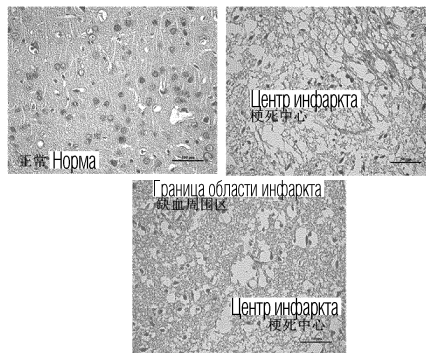
≠#, $P < 0,05$ для IR, IR+Cu, IR+NM (n=18)

Фиг. 36

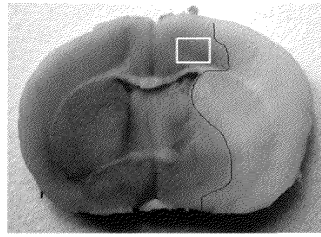


≠#, $P < 0,05$ для IR, IR+Cu, IR+NM (n=18)

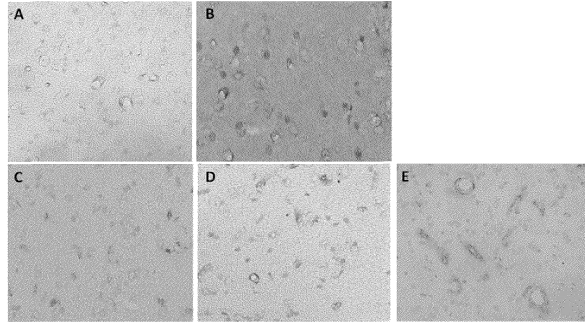
Фиг. 37



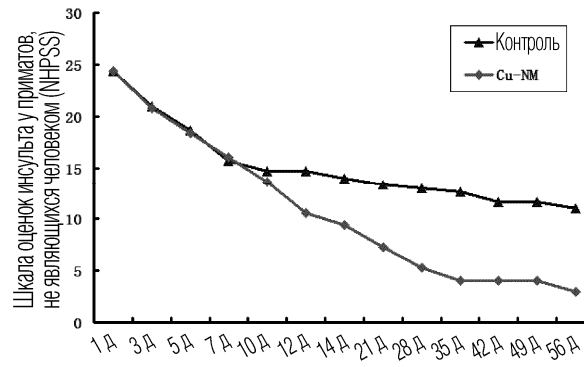
Фиг. 38



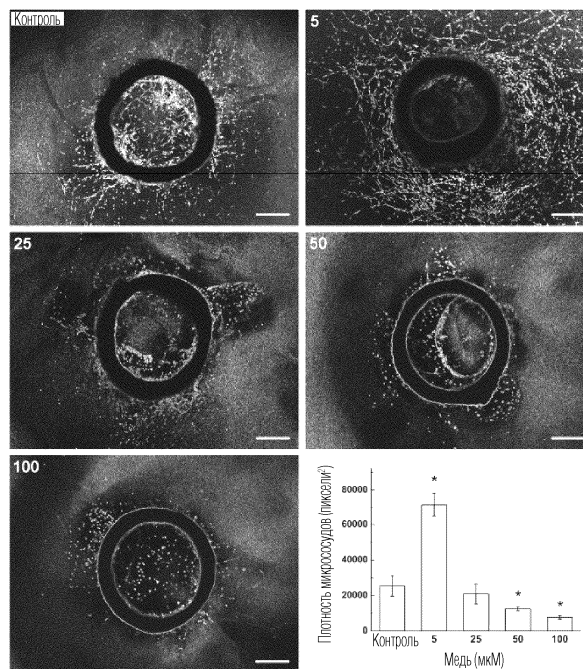
Фиг. 39



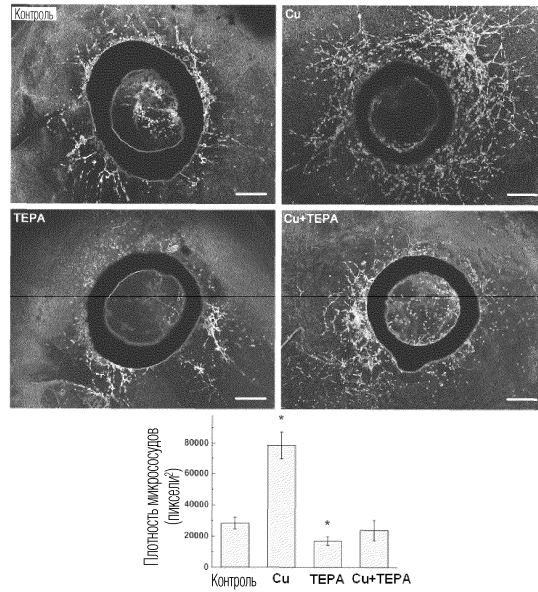
Фиг. 40



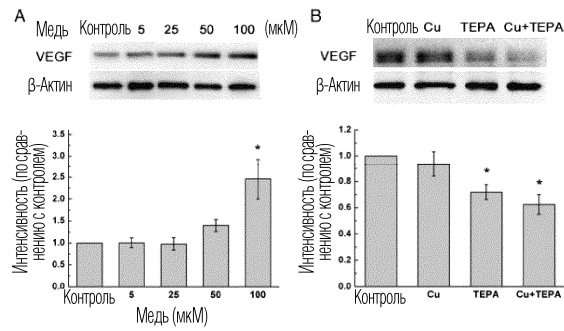
Фиг. 41



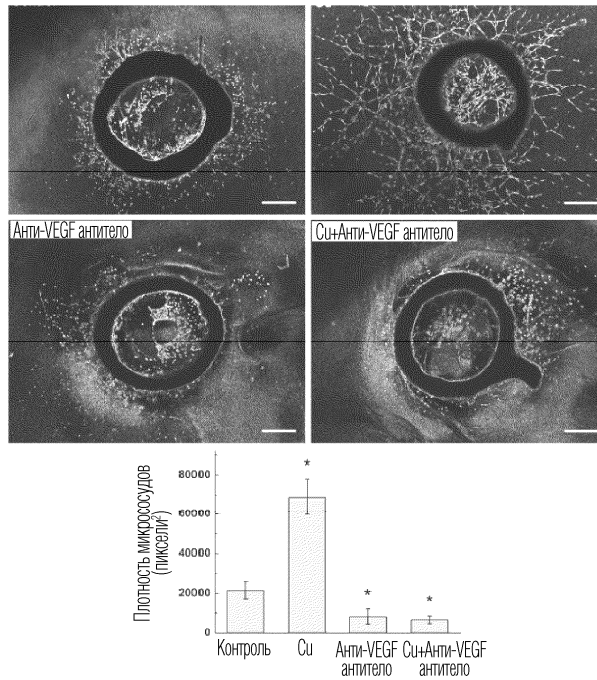
Фиг. 42



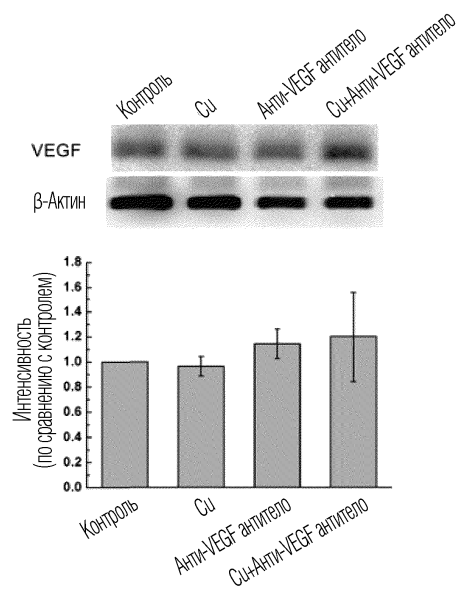
Фиг. 43



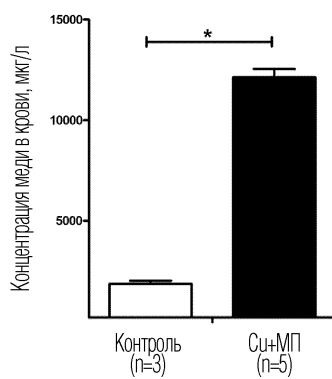
Фиг. 44



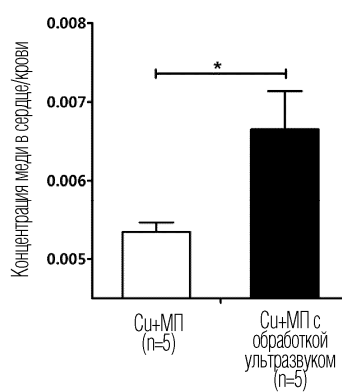
Фиг. 45



Фиг. 46



Фиг. 47



Фиг. 48