

ДЕРЖАВНА УСТАНОВА
“ІНСТИТУТ ГЕНЕТИЧНОЇ ТА РЕГЕНЕРАТИВНОЇ МЕДИЦИНИ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ”

**"Новітні методи застосування стовбурових клітин і біоінженерних
технологій у регенеративній медицині"**

РЕФЕРАТ

Габріелян Артур Володимирович – доктор медичних наук, завідувач відділу трансплантації та хірургії серця, ДУ "Національний інститут хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова НАМН України".

Голюк Євген Леонтійович – кандидат медичних наук, завідувач Науково-практичного центру тканинної та клітинної терапії, ДУ "Інститут травматології та ортопедії НАМН України".

Домбровський Дмитро Борисович – доктор медичних наук, професор, начальник підрозділу хірургії судин, ОКНП "Чернівецька обласна клінічна лікарня".

Кирик Віталій Михайлович – кандидат медичних наук, старший науковий співробітник, завідувач лабораторії клітинних та тканинних культур, ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України".

Медведєв Володимир Вікторович – доктор медичних наук, професор кафедри нейрохірургії, Національний медичний університет імені О. О. Богомольця.

Руденко Сергій Анатолійович – кандидат медичних наук, старший науковий співробітник, завідувач відділу хірургічного лікування ішемічної хвороби серця, ДУ "Національний інститут серцево-судинної хірургії імені М. М. Амосова НАМН України".

Шаблій Володимир Анатолійович – кандидат біологічних наук, заступник директора Кріобанку, Інститут клітинної терапії.

Стан проблеми та її актуальність.

Захворювання серцево-судинної, центральної нервової системи та опорно-рухового апарату посідають провідні місця за показниками інвалідизації та смертності серед працездатного населення. Навіть найсучасніші медикаментозні та хірургічні методи лікування не завжди дозволяють забезпечити компенсацію проявів прогресуючої серцевої недостатності, ішемічного або травматичного пошкодження головного і спинного мозку, атеросклерозу магістральних судин та дегенеративних процесів в хрящах і кістках. Досить часто, єдиною надією для таких пацієнтів залишається складна реваскуляризація, трансплантація серця або протезування суглобів, що потребує значних затрат на лікування та тривалу медичну і соціальну реабілітацію. Саме тому у сучасній регенеративній медицині стовбурові клітини привертають особливий інтерес клініцистів як новий ефективний інструмент для регенерації пошкоджених тканин різних типів. Новітні клітинні та біоінженерні технології є перспективним методом лікування багатьох важких захворювань, для яких існуючі медикаментозні та хірургічні підходи залишаються малоефективними.

Метою роботи є підвищення безпеки і ефективності лікування захворювань серцево-судинної, нервової системи та опорно-рухового апарату шляхом розробки та впровадження новітніх методів застосування стовбурових клітин і біоінженерних технологій.

Зміст роботи.

Розроблено протоколи виділення та детальної характеристики культур стовбурових клітин з кісткового мозку, жирової тканини, плаценти, міокарда тварин та людини для подальшого доклінічного дослідження їх властивостей та регенеративного потенціалу на моделях пошкодження тканин *in vitro* та *in vivo*.

Досліджено молекулярно-біологічні властивості гетерогенної культури та високопроліферативної субпопуляції мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин (ММСК) плаценти людини. Оцінено вплив різних комбінацій кріопротекторів на життєздатність ММСК та гемопоетичних прогеніторних клітин з фрагментів тканини плаценти за умов

низькотемпературного кріоконсервування. Досліджено вплив ксено- та алогенної трансплантації ММСК на перебіг кардіоміопатії у тварин, показано приживлення цих клітин в тканині міокарда, встановлено позитивну динаміку за даними електрофізіологічного та морфогістологічного дослідження.

Досліджено вплив алотрансплантації тканини фетального мозочка, нюхової цибулини і фетальної нирки на відновлення рухової функції після травми мозочка у щурів, морфологію зони травми, стан клітинної ланки імунної системи і рівень нейротропних аутоантитіл. За допомогою оцінки рухової активності і рівня спастичності м'язів паретичної кінцівки визначено регенеративні ефекти фетальних тканин на моделі половинного перетину спинного мозку у щурів. Також встановлено біосумісність та доклінічну безпеку макропористого гідрогелю, заселеного нейрогенними та мультипотентними стромальними стовбуровими клітинами, при його імплантації у ділянку пошкодження спинного мозку. Отримано дані щодо ефективності трьох поколінь нейротрансплантаційних втручань у відновленні функції пошкодженого спинного мозку щура.

Досліджено потенціал ендотеліального диференціювання ММСК жирової тканини *in vitro*, а також регенеративні ефекти клітин стромально-васкулярної фракції жирової тканини на моделі критичної ішемії нижніх кінцівок. Використовуючи методи гістологічного, імуногістохімічного та електронно-мікроскопічного дослідження, визначено особливості регенераторно-відновних процесів та неоангіогенезу в м'язовій тканині після трансплантації ММСК жирової тканини у 26 хворих з облітеруючими захворюваннями артерій, що проявлялись хронічною ішемією кінцівок.

Оцінено ефективність та безпеку комплексної корекції насосної функцій серця із застосуванням стовбурових клітин пуповинної крові у хворих з хронічною серцевою недостатністю та зниженою скоротливою функцією лівого шлуночка, що перебувають в листі очікування трансплантації серця. За допомогою клінічних, функціональних та імунологічних методів проведено порівняльний аналіз результатів лікування в залежності від етіології захворювання та методу втручання. Оцінено рівень серцево-судинної та

загальної смертності при проспективному 1-річному спостереженні. В клінічному дослідженні на 11 пацієнтах з важкими формами серцевої недостатності визначено безпеку та первинну ефективність інтраміокардіальної трансплантації ММСК плаценти протягом 18 міс спостереження.

В клінічному дослідженні на 127 пацієнтах з остеоартрозом колінного суглоба оцінено ефективність регенеративної ін'єкційної терапії. В клінічному дослідженні 540 пацієнтів дитячого та підліткового віку з юнацьким епіфізеолізом головки стегнової кістки, хворобою Пертеса, спастичним звихом стегна, хворобою Блаунта розроблено методики оцінки скелетної зрілості за рентгенограмами кульшового та колінного суглобів, як біомаркера регенеративних процесів у дітей та підлітків. Модифіковано методики виробництва кісткових скаффолдів за технологією локального кісткового банку. Розроблені біоінженерні технології із застосуванням кісткових скаффолдів в поєднанні з аутологічними біотехнологічними продуктами крові, жирової клітковини та аспірату кісткового мозку були застосовані у 150 пацієнтів з кістковими дефектами.

Основні науково-технічні результати.

Були встановлені критерії безпеки клітинних препаратів гемопоетичних, мезенхімальних та тканинспецифічних стовбурових клітин людини з кісткового мозку, жирової тканини, плаценти, пуповинної крові, пупочного канатика, міокарда. Було розроблено та валідовано стандартні операційні процедури, що регламентують усі технологічні етапи виробництва клітинних препаратів для клінічного використання: критерії первинного скринінгу донорів, мікробіологічне та ПЛР-дослідження тканин фето-плацентарного походження, процесинг тканин для введення в первинну культуру клітин, їх пасажування, підготовка до кріоконсервування. Розроблено критерії контролю якості клітинних препаратів шляхом оцінки їх життєздатності, проліферації та імунофенотипу.

Запропоновано новітні методи тривимірного культивування клітин і тканин, а також їх контактного і безконтактного співкультивування. На моделі критичної ішемії нижньої кінцівки за допомогою морфологічних та

інструментальних методів дослідження встановлено регенеративний потенціал трансплантатів гідрогелів, заселених ММСК жирової тканини, та ендотеліальних клітин-попередників з аорти, що проявлявся у відновленні перфузії ішемізованих тканин та покращенні їх гістологічних показників. Доведений потенціал ММСК жирової тканини людини до формування в товщі гідрогелю тривимірних капіляроподібних структур *in vitro* у відповідь на фактори, що індукують ендотеліальне диференціювання.

Показано, що у тварин з травмою мозочка ранній позитивний ефект трансплантації тканини нюхової цибулини обумовлений проангіогенним впливом трансплантата, а ефект тканини фетального мозочка пов'язаний з активацією пластичності нейронних мереж реципієнта. Встановлено, що трансплантація тканини нюхової цибулини потенцією больовий синдром у віддаленому періоді травми спинного мозку завдяки ранньому протекторному ГАМК-ергічному впливу, а застосування тканини фетального мозочка зменшує біль, що може бути пов'язано з ексайтотоксичною глутаматергічною елімінацією центральних ноцицептивних нейронів драглистої речовини.

Показано, що плацента людини є багатим джерелом різних популяцій стовбурових/прогеніторних клітин, які можуть використовуватися для виготовлення біотехнологічних препаратів. Розроблено протоколи кріоконсервування тканини плаценти людини, що дозволяють виділяти плацентарні ММСК із розморожених зразків. Виявлено, що внутрішньовенна трансплантація плацентарних ММСК щурам з диметилгідразин-індукованим канцерогенезом кишківника стимулює прогресію раку і підвищує смертність тварин, що підтверджує необхідність онкологічного скринінгу пацієнтів при клінічних дослідженнях клітинної терапії.

Створено низькотемпературний банк клітинних препаратів, які виготовляють та тестують відповідно до міжнародних стандартів та директив Європейської комісії. У відповідності з вітчизняним законодавством розпочато клінічні дослідження по застосуванню препаратів пуповинної крові, ММСК з плаценти, пуповини, жирової тканини і кісткового мозку в лікуванні ішемічної кардіопатії, остеоартрозу колінного суглоба та пневмонії при COVID-19.

Показано, що трансплантація кріоконсервованої амніотичної мембрани хворим на кератити різної етіології зменшує запалення рогівки, сприяє її епітелізації, регресу васкуляризації та збереженню гостроти зору.

Комплексне лікування пацієнтів з ішемічною кардіоміопатією із застосуванням хірургічної реваскуляризації та трансплантації стовбурових клітин пуповинної крові через 12 міс дозволило покращити якість життя хворих на 50 % порівняно з вихідним рівнем. При цьому доведено зниження серцево-судинної та загальної смертності на 10 % в порівнянні з групою консервативної терапії, на 18,9 % – порівняно з коронарним шунтуванням та на 18,6 % – порівняно зі стентуванням. Шанси виживаності при доповненні хірургічної реваскуляризації трансплантацією стовбурових клітин пуповинної крові підвищувались в 1,6 рази при коронарному шунтування, в 1,7 рази при стентування, в 6 разів при консервативній терапії.

Після інтраміокардіальної трансплантації ММСК плаценти хворі з ішемічною кардіоміопатією вже через місяць відмічали суттєве зменшення симптомів серцевої недостатності та покращення якості життя. Протягом перших 3 міс. після трансплантації було показано суттєве покращення скоротливої функції серця за показником фракції викиду лівого шлуночка, а також зменшення дилатації серця за кінцево-систоличним та кінцево-діастолічним об'ємами. Ці дані корелювали з поліпшенням регіонарної скоротливості міокарда, особливо в зонах, куди безпосередньо вводили клітини. Через 12 міс після трансплантації продемонстровано значне покращення якості життя за даними опитувальників.

За результатами ультраструктурного дослідження у пацієнтів з критичною ішемією нижніх кінцівок, яким трансплантували ММСК жирової тканини, доведено, що в процесі репаративного ангіогенезу послідовно відбувається брунькування, анастомозування, ремоделювання і диференціювання сегментів новоутвореної судинної мережі.

У пацієнтів з остеоартрозом найбільшу клінічну ефективність отримали при застосуванні аутологічної збагаченої тромбоцитами плазми та аутологічного кріолізату тромбоцитів у комбінації з гіалуроновою кислотою.

Відмічено суттєве покращення показників якості життя на 65,9 % та 60,3 % відповідно у порівнянні з початковими значеннями. В клінічному дослідженні з оцінки безпеки та ефективності ММСК плаценти у пацієнтів з остеоартрозом через 6 міс встановлено достовірне зменшення альгофункціонального індексу та індексу остеоартриту.

Наукова новизна.

Вперше розроблено протоколи виділення клітин-попередників з різних відділів міокарда людини, охарактеризовано їх проліферативний потенціал, експресію специфічних маркерів та встановлено оптимальні параметри культивування. Вперше продемонстровано нейропротекторний вплив трансплантації фетальних нейральних прогеніторів, а також їх здатність мігрувати в осередок ішемічного пошкодження гіпокампа та диференціюватись по нейрональному і гліальному типу, утворюючи синаптичні контакти з клітинами реципієнта у віддалені строки після трансплантації. Встановлено нейропротекторні ефекти ММСК кісткового мозку та жирової клітковини в умовах контактного та безконтактного співкультивування з нервовою тканиною. Вперше виявлено протилежний вплив трансплантації тканини фетального мозочка і нюхової цибулини на маніфестацію спастичності і больового синдрому при травмі спинного мозку і на відновлення функції травмованого мозочка. Вперше продемонстровано ефективність трансплантації нейральних стовбурових клітин у комплексі з макропористим гідрогелем на динаміку спастичності і рухової функції паретичної кінцівки після спінальної травми. Вперше визначено маркери високопроліферативної популяції ММСК з плаценти людини, як в культурі клітин, так і *in situ*.

Вперше у світі продемонстровано позитивні первинні результати у пацієнтів з ішемічною кардіоміопатією та серцевою недостатністю, яким виконували інтраміокардіальне введення ММСК плаценти. Вперше розроблена технологія комплексної корекції насосної функції серця із застосуванням стовбурових клітин пуповинної крові у хворих з хронічною серцевою недостатністю, що знаходяться в листі очікування трансплантації серця. Вперше розроблена і впроваджена оригінальна методика, встановлені покази до

трансплантації клітинних препаратів на основі ММСК жирової тканини хворим з нереконструктабельним ураженням периферичного артеріального русла.

Вперше встановлено, що аутологічні біотехнологічні продукти на основі тромбоцитів є ефективним засобом активації протизапального метаболічного профілю фагоцитів, необхідного у процесах регенерації, реконструкції і репарації тканин опорно-рухового апарату, незалежно від віку та статі. Вперше розроблено біотехнологічні підходи до лікування остеоартрозу та асептичного некрозу кульшового та колінного суглобів шляхом застосування різних методик регенеративної ін'єкційної терапії, а також заміщення кісткових дефектів за допомогою комбінації алогенних кісткових скаффолдів та аутологічних біотехнологічних продуктів крові, аспірату кісткового мозку та жирової тканини. Вперше розроблено диференційований підхід до застосування регенеративних технологій у пацієнтів дитячого та підліткового віку з патологією кульшових і колінних суглобів.

Обсяг впровадження роботи.

Для доклінічної оцінки терапевтичного потенціалу стовбурових клітин впроваджено численні моделі захворювань та пошкоджень тканин. Запропоновано спосіб лікування експериментального забиття мозочка шляхом трансплантації фетальної тканини мозочка, нюхової цибулини та нирки. На основі проведеного аналізу результатів експериментів сформовано концепцію визначення критеріїв безпеки та якості клітинних трансплантатів для доклінічних та клінічних досліджень.

Запропоновано алгоритм лікування та прогностичну модель виживання пацієнтів при комплексній корекції скоротливої функції лівого шлуночка із застосуванням трансплантації стовбурових клітин пуповинної крові. Сформовано концепцію надання високоспеціалізованої медичної допомоги з використанням клітинних технологій пацієнтам з хронічною критичною ішемією кінцівок. Впроваджено метод лікування асептичного некрозу ділянки кульшового та колінного суглоба шляхом внутрішньокісткового введення моноклеарної фракції аутологічного аспірату кісткового мозку, що є альтернативою ендопротезування суглобів. Впроваджено методику

безоперативного лікування пошкодження менісків колінного суглоба за допомогою ін'єкцій аутологічної збагаченої тромбоцитами плазми та кріолізату тромбоцитів. Впроваджені біоінженерні технології на основі скаффолдів в комбінації з аутологічними біотехнологічним продуктами крові, жирової клітковини та кісткового мозку, що дають можливість регенерації кісткових дефектів, зокрема несправжніх суглобів, які не піддаються лікуванню класичними методами.

Результати роботи широко використовуються в доклінічних дослідженнях у ДУ "Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України", ДУ "Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН України", ДУ "Інститут нейрохірургії ім. акад. А.П. Ромоданова НАМН України", Інституті фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України. Практичне впровадження в лікувальному процесі реалізовано у ДУ "Національний інститут хірургії та трансплантології ім. О. О. Шалімова НАМН України", ДУ "Інститут серцево-судинної хірургії ім. М. М. Амосова НАМН України", обласній клінічній лікарні м. Чернівці, ДУ "Інститут травматології та ортопедії НАМН України". Результати дослідження включені в навчальний процес Національного університету охорони здоров'я України ім. П. Л. Шупика та Національного медичного університету імені О. О. Богомольця. Розроблено "Ліцензійні умови провадження господарської діяльності банків пуповинної крові, інших тканин і клітин людини" (Постанова Кабінету Міністрів України №286 від 02.03.2016 р.). За темою роботи авторами отримано 40 деклараційних патентів та запропоновано 7 нововведень, видано 1 методичні рекомендації, захищені 3 дисертації на здобуття наукового ступеня доктора медичних наук, 3 дисертації на здобуття ступеня кандидата медичних і 1 – біологічних наук.

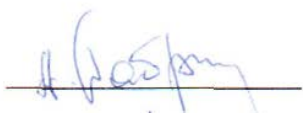



Досягнутий ефект виконаної роботи.




Запропонована технологія комплексної корекції насосної функції серця за допомогою трансплантації стовбурових клітин різного типу дозволяє покращити скоротливу здатність міокарда, попередити поліорганну недостатність, підвищити якість життя та дочекатись трансплантації серця. У деяких пацієнтів розроблена методика може бути остаточним методом

лікування та дозволяє зняти хворих з листа очікування. Технологія виробництва кісткових скаффолдів вирішує питання пластики великих кісткових дефектів, зокрема при ревізійному ендопротезуванні суглобів, бойовій травмі, при посттравматичних та остеомієлітичних дефектах кісток. Технології регенеративної медицини є принципово новим підходом в лікуванні пацієнтів дитячого та підліткового віку із захворюваннями кульшового та колінного суглобів, що дозволяє проводити профілактику вторинного остеоартрозу, а отже, значно зменшує потребу в ендопротезуванні.

В підсумку, результатом роботи є вирішення важливої наукової та прикладної проблеми – впровадження новітніх методів застосування стовбурових клітин і біоінженерних технологій дозволило підвищити безпеку та ефективність високоспеціалізованої медичної допомоги населенню при лікуванні захворювань серцево-судинної, нервової системи та опорно-рухового апарату, а також знизити показники інвалідизації та смертності, що має суттєве соціальне та економічне значення. Розрахований економічний ефект впроваджених клітинних та біоінженерних технологій складає понад 260 млн гривень на рік.

Публікації і цитування результатів роботи. Результати роботи висвітлені у 188 статтях у провідних наукових виданнях, 6 монографіях, 1 підручнику, 1 методичних рекомендаціях, а також їх було представлено на численних вітчизняних та міжнародних конференціях і конгресах (США, Японія, Німеччина, Іспанія, Швеція). Публікації цитуються 43 рази за даними Web of Science, 57 – в Scopus та 557 – в Google Scholar. Колективний h-індекс виконавців складає 11 для Google Scholar та 4 для Scopus і Web of Science.


А. В. Габрієлян

С. Л. Голук

Д. Б. Домбровський

В. М. Кирик


В. В. Медведєв

С. А. Руденко

В. А. Шаблій