

ДОДАТОК

Тези
науково-практичної конференції
з міжнародною участю
«Інноваційні напрями в генетичній
та регенеративній медицині»

9-10 листопада 2017 р., м. Київ, Україна

SUPPLEMENT

Conference Abstracts
Innovative trends in genetic and regenerative medicine

November 9-10, 2017, Kyiv, Ukraine

Stem cell products and products of tissue engineering
for personalized regenerative medicine



Shibashish Giri

*Applied Stem Cell Biology and Cell Technology, Biomedical and Biotechnological Center (BBZ), Medical Faculty,
University of Leipzig, Leipzig, Germany*

Endogenous stem cells have broad therapeutic implications on tissue and organ repair. Adult stem cell therapies have been routine clinical approaches for treatment of several diseases which greatly improve the survival and quality of life to millions of patients around the world. But the bacterial, viral, fungal infection and several more health complication including poor patient satisfactory outcomes are negative factors in stem cell treatments. We have developed new stem cell therapy concept to overcome those existing limitations with high patient satisfactory outcomes. We have evaluated the clinical benefits of our approaches in diabetic wounds, burned skin, antiaging treatments, spinal cord injuries and other cases in human clinical setting as well as in preclinical models. Nonhuman models are routinely used for disease modeling in the drug discovery process, but the human response is not to predict from these models. Patient-derived induced pluripotent stem cell technology is a low cost and high quality new drug discovery process, which could replace millions of animals currently sacrificed in preclinical drug development process. Toxicity assessments and clinical efficacy of drug candidates using patient-derived induced pluripotent stem cell technology is an efficient frontier approach to save money and time before moved into costly and lengthy preclinical and clinical trials, eventually, provide an impeccable route to new safer pharmaceutical products. These above approaches, which are in current clinical development that have the potential to impact clinical and antiaging benefits in near future.

Practical aspects and prospects of applications of tissue-
engineered constructions manufactured with not using matrices-
scaffolds in regenerative medicine (scaffold-free technology)



Ponomarev I.¹, Reuter T.², Antonova L.V.³, Zubov D. A.⁴, Vasyliov R. G.⁴, Barnewitz D.¹

¹Research Centre of Medical Technology and Biotechnology, Bad Langensalza, Germany

²ICM – Institut Chemnitzer Maschinen- und Anlagenbau e.V., Chemnitz, Germany

³Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

⁴State Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

The purpose of this study is to review the results obtained in the process of development and application of the technology of manufacturing three-dimensional tissue engineered equivalents (regenerates) with no use of any matrices/scaffolds (scaffold-free technology). We're presenting here our results and perspective challenges based on our studies within the frame of international cooperation. ▶

█ Tissue engineering, as one of the directions of regenerative medicine, involves the creation of tissue regenerates *ex vivo* with subsequent implantation into the defect site. To maintain the three-dimensional cell behavior and functioning under *in vitro* conditions, as a rule various artificial materials – matrices (e.g., MACT-technology), are used. The method developed by us makes the possibility to create 3D tissue regenerates with no using matrices/scaffolds. The first purpose of current development and practical application of this technology is non-reparative hyaline (articular) cartilage under native conditions. The basics for creating chondrogenic structures are the use of manual mechanical (compression) stimulation of newly created cell aggregates. The basic principles for the creation of 3D cartilaginous structures from differentiated cells, as well as from undifferentiated cells of bone marrow stroma, were developed and tested. When conducting comparative studies between our original method and MACT, a 15-fold excess of the content of the main components of the cartilage matrix was found in structures manufactured with no use of matrices/scaffolds. The conducted experiments on large animals (23 horses, 50 sheep) showed the full validity of the developed technology in the treatment of full-thickness lesions of hyaline cartilage. A further stage in the development of technology was the creation of *in vitro* model for studying the mechanisms of osteoarthritis. This direction was developed in connection with the EU requirements to reduce the number of experimental animals by using *in vitro* cell-based models.

Later, a method for creating osteogenic structures for modeling and studying mechanisms of the initial phase of bone fracture repair was developed. The implementation of the mechanisms of primary osteogenesis in the model led to the idea of using these constructs in the treatment of complex high energy fracture non-unions and critical sized bone defects. Pilot experimental data indicate the prospects for the development of this direction.

The obtained positive results initiated the expansion of the spectrum of application of this technology with respect to other types of connective tissue. In cooperation with State Institute of Genetic and Regenerative Medicine (Kyiv, Ukraine), a project was developed and prepared for the study of morphogenesis and reparative capabilities of technology for restoring the tendon-ligament apparatus using various cell types. There are primary positive results on the use of this technology in the cardiac and vascular fields. In cooperation with Research Institute of Complex Problems of Cardiovascular Diseases (Kemerovo, Russia), vital prototypes of the heart valves have been created and characterized. The method of manufacturing the hollow structures simulating blood vessels for their subsequent testing and studying the possibility of creating this type of regenerates was also worked out. The above mentioned practical results and prospects for the development of new types of tissue structures testify to the significant scientific and practical potential of the proposed technology for manufacturing connective tissue regenerates with no use of artificial matrices/scaffolds.

A new heterologous fibrin sealant in regenerative medicine



Kyrylenko S.^{1,2}, Pogorielov M.¹, Barraviera B.², Ferreira R. S. Junior²

¹Medical Institute, Sumy State University, Sumy, Ukraine

²Center for Studying Venoms and Poisonous Animals, Sao Paulo State University (CEVAP-UNESP), Botucatu, SP, Brazil

Fibrin Sealant (FS) is a medical product based on fibrinogen and thrombin which together act to form a biogel. FS is widely used in medicine and biotechnology, while its applications are growing exponentially. Nowadays, commercial preparations of FS are obtained mainly from human blood serum. The human blood however is not an ideal source of medical products. First, it is never completely safe. On the other hand, it is not cheap and neither it is scalable. It was therefore thought to replace components of FS with products from alternative sources.

Thus, the Center for Studies of Venoms and Poisonous Animals at Sao Paulo State University (CEVAP-UNESP) in Brazil offered a solution in a form of animal based, heterologous FS (hgFS), where fibrinogen component is obtained from serum of buffalo, and thrombin-like protein is purified from rattlesnake venom. It is a safe and scalable alternative for a product of a high demand, which will be 5-10 folds cheaper than the current version. We believe the hgFS is destined to achieve substantial marketing success in future. The hgFS is now undergoing a phase II clinical trial in Brazil for treatment of venous ulcers in human patients. In addition, the hgFS is currently being investigated in regenerative medicine in various experimental setups in animal models; including usage of the hgFS as a 3D biomatrix for stem cells. Thus, at the University of Campinas in Brazil we conducted a series of experiments in order to investigate regenerative properties of hgFS in combination with bioengineered human embryonic stem cells to support neuronal regeneration in animal models of neuronal injuries. We also assumed that the hgFS can be beneficial for treatment of skin burns, including battlefield related injuries.

We therefore initiated a joint Ukrainian-Brazilian research project to investigate applicability of the Brazilian hgFS for medical applications in Europe, including for Ukrainian war related medical needs. Initially, we aim at studying potential regenerative effects of the new hgFS in animal models of skin burn injuries; with future translation into clinical setups. We will also concentrate on potential molecular mechanisms of the effects of the hgFS in regeneration of injuries. Importantly, the hgFS has not yet been tested in models of skin burns; and neither was it thought yet for any combat related applications.

Initially, we plan to demonstrate safety and efficiency of hgFS for skin wound healing in *in vivo* experiments in rats. We will then modify the hgFS matrix by combining it with chitosan, and then with stabilized form of human recombinant fibroblast growth factor 2, in order to improve the healing characteristics of the product. Consequently, we will investigate involvement of parameters of metabolic homeostasis in molecular mechanisms of healing. In future we will focus on organizing possible clinical trials in human patients.

Thus, this project will potentially lead to widespread research applications and commercialization of the new biotechnological medical product on European market. It will also lead to development of next generation fibrin sealants.

Cell immobilization in alginate hydrogel: prospect for short-term storage/transportation



Tarusin D., Mazur S., Volkova N., Petrenko Yu., Zaikov V., Petrenko A.
Institute for Problems of Cryobiology and Cryomedicine of the NAS of Ukraine, Kharkiv, Ukraine

Stem cells are increasingly frequently find application in transplantation and regenerative medicine. In this regard, a principal issue is to develop simple and effective method for cell short-term storage/transportation, as an approach to cryopreservation is technically challenging and financially expensive. Immobilization of the cells in alginate hydrogel can be promising for these purposes.

The aim of this work was to study the stability of mesenchymal stromal cells in alginate beads to short-term storage at positive temperatures in different media.

Experiments were performed in human adult dermal multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs). Cell immobilization was performed by «encapsulation» in inhomogeneous core alginate-calcium beads using the electrospray approach. After immobilization in alginate beads cell viability, morphology, functional and metabolic activities were investigated. MSCs in alginate beads stored in the various media: a culture medium, sucrose-based solution (SBS) or the University of Wisconsin solution (UW) in a sealed cryovials up to 7 days at positive temperatures (4, 22 or 37 °C). After storage, the alginate beads were dissolved, followed monolayer culturing of the cells. Viability was determined by MTT-test and ability to adhere to the plastic. Metabolic activity was measured by AlamarBlue (AB) test. To assess mitochondrial potential was used fluorescent dye JC-1. Differentiation potential was evaluated after cells induction to osteogenic and adipogenic directions.

It was shown that the storage of the MSCs in suspension at all the temperatures in standard culture medium resulted in a rapid decrease in viability and functional activity as well as led to the cells aggregation and culture medium acidification. Storage of the immobilized MSCs in alginate beads at 22 and 37 °C for 3 days resulted in a high viability (78 and 87 %, respectively), kept the subsequent attachment properties (62 and 70 %), metabolic activity (79 and 75 %) and ability to differentiation. Moreover, immobilization of cells in alginate beads prevented aggregation and allowed to keep cells in a separate state from each other. However, storage of immobilized cells at 4 °C resulted in a rapid decrease in their viability. The substitution of culture medium for UW or SBS preservation solutions maintained the MSCs viability and metabolic activity following hypothermic storage (4 °C) within 7 days, providing opportunity to prolong the short term/transportation time window of cells at these conditions.

The results indicate that the mesenchymal stromal cells immobilized in alginate beads are high resistant to storage conditions at positive temperatures. We assume that these positive results caused by reduction of metabolic and lack of adhesive activities of the cells under immobilized conditions.

Own experience of development and applications of innovative biomedical cell-based and tissue-engineered products for regeneration of bone and cartilage in Ukraine



Zubov D. A.^{1,2}, Vasyliiev R. G.^{1,2}, Kostogryz O. A.³, Oksymets V. M.², Rodnichenko A. E.^{1,2}, Zlatska A. V.^{1,2}, Gubar O. S.^{2,4}

¹State Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²Medical company *ilaya*®, Kyiv, Ukraine

³State Institute of Traumatology and Orthopaedics NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

⁴Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

At the moment, the most common somatic (adult) stem cells used in regenerative medicine, are the multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs). Initially, they were discovered by Alexander Friedenstein in the bone marrow [Friedenstein A. J. *et al.*, 1968]. Their characteristic feature is an ability to differentiate into mesenchymal cell types such as adipocytes, osteoblasts and chondrocytes (three orthodox differentiation directions), and they possess noticeable immunomodulatory properties [Dominici M. *et al.*, 2006]. In 2001, P. Zuk *et al.* have isolated MSCs from adipose tissue, where their number was larger than in the bone marrow and tissue collection procedure is less invasive and safer to the patient [Zuk P.A. *et al.*, 2001]. M. Brittberg has firstly used autologous cultured articular chondrocytes for full-thickness defects of articular cartilage pioneer treatment in 1994 [Brittberg M. *et al.*, 1994]. According to ClinicalTrials.gov, about 4500 clinical trials involving MSCs are registered in the world today. In other words, different degree-manipulated stem cells, by European Medicines Agency (EMA), are classified as «Human cell-based medicinal products» (CBMPs) being a part of Advanced-Therapy Medicinal Products (ATMPs) [EMA/CHMP/410869/2006]. The cells may be used for therapy alone or combined with structural materials – scaffolds, and thus might be classified as combined ATMPs. Prior to wide range application of cell therapies and ATMP Marketing Authorization the clinical trials to determine the biosafety and effectiveness of their use must be conducted. As to any biomedical product intended for application in humans, a number of stringent quality requirements are imposed to CBMPs.

Own manufactured CBMPs are based on cultured BM-MSCs, periosteal progenitor cells, endothelial progenitor cells, articular chondrocytes and intended to be used for bone and cartilage regeneration in critical-sized bone defects, fracture non-unions, AVNs, knee cartilage defects. The following criteria are implemented in the biotechnology laboratory *ilaya.regeneration* for cultured cells of different origin both for autologous and allogeneic use:

1. Donor infection screening by peripheral blood.
2. Viability assay of cultured cells by trypan blue stain exclusion.
3. Cultured cells screening for absence of bacteria, fungi, viruses and mycoplasma.
4. Immunophenotyping of cultured cells for minimal set of MSCs positive markers (CD73⁺CD105⁺CD90⁺) and MSCs negative markers (CD34-CD45-HLA-DR⁻) to identify the cultured cell type.
5. The functional CFU-F assay and cell culture kinetics.
6. Functional assay for MSCs multipotency: directed multilineage differentiation into the adipogenic, osteogenic and chondrogenic directions.
7. Assay for stress-induced cell culture senescence (SA-β-galactosidase assay).
8. Cytogenetic analysis of cultured cells for karyotype stability (GTG banding).
9. Quality and cell viability assay for scaffolds seeded with cultured cells by combination staining with FDA/PI and histology assay.
10. The results of assays performed are reflected in the CBMP Passport.

Регенеративні технології в травматології та ортопедії: можливості та перспективи



Гайко Г. В.

ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ, Україна

Офіційне зародження трансплантологічного напрямку в українській травматології та ортопедії відбулося в січні 1956 року, коли було створено лабораторію консервування трупних тканин, що стала аналогом сучасних тканинних банків. За 10 років існування діяльність лабораторії вийшла за межі України та, за сьогоднішніми мірками, набула справді фантастичного розмаху. В 1999 році в Україні було прийнято Закон «Про трансплантацію органів та інших анатомічних матеріалів людини», завданням якого було регулювання відносин у сфері трансплантології згідно з міжнародними нормами. Натомість фактично він призвів до занепаду, а подекуди навіть знищення життєво необхідної галузі медицини в нашій державі.

В Україні близько 5000 пацієнтів, які щороку оперуються з приводу патології опорно-рухового апарату, потребують застосування кісткової пластики (ендопротезування великих суглобів, реконструктивні оперативні втручання в дорослій та дитячій ортопедії, кісткова онкологія). В травматології та ортопедії трансплантація є повсякденним, рутинним засобом допомоги пацієнту. Надію на позитивні зміни надав бурхливий розвиток регенеративної медицини та позитивні зрушення у вітчизняному медичному законодавстві, що дозволило замінити відомі всім кісткові алотрансплантати від померлих донорів на аутологічні біотехнологічні продукти та кісткові алотрансплантати від живих донорів.

Аутологічні продукти біотехнологій можна поділити на чотири групи: біотехнологічні продукти, які містять «фактори росту»; ті, що містять стовбурові клітини; біотехнологічні продукти, отримані шляхом культивування клітин (мезенхімальні стовбурові клітини, фібробласти, хондроцити тощо) та фармпрепарати на основі цитокінів, стовбурових клітин, генноінженерні препарати. Алогенні кісткові трансплантати від живих донорів представлені головками стегнової кістки, видаленими під час ендопротезування кульшових суглобів.

Отже, синтез сучасних знань та можливостей у сфері трансплантології та регенеративної медицини створює принципово новий підхід до відновлення тканин опорно-рухового апарату, який полягає в динамічному впливі на процес регенерації за допомогою біотехнологій та дає можливість керувати нею.

Продукти біотехнологій у сучасній медицині та можливості їх застосування в травматології та ортопедії



Пихтєєв Д. М.

Біотехнологічна лабораторія «SmartCell», Одеса, Україна

Сучасні досягнення світової медичної науки та потреби сучасної медичної практики обумовлюють активне використання найновітніших медичних технологій. На цей час біотехнологія вважається одним із головних напрямків розвитку суспільства. На перше місце виходять напрямки медичної біотехнології, зокрема тканинна інженерія на основі стовбурових клітин та тканин. Однак обізнаність практикуючих лікарів щодо стану розвитку та можливостей біотехнологічних лабораторій є вкрай незадовільною.

В доповіді представлені результати більш ніж п'ятирічного досвіду біотехнологічної лабораторії «СмартСелл» щодо виробництва біотехнологічних продуктів, які запропоновані для застосування в галузі травматології та ортопедії. Насамперед, це аутологічні продукти, які виробляються із крові пацієнтів, такі як препарат АМК, а також препарати мезенхімальних стовбурових клітин як адипогенного, так і кістково-мозкового походження. Продемонстровано результати застосування препаратів біотехнологічної компанії «СмартСелл» в клінічній практиці, а також дані щодо потенційного використання цих препаратів для травматології та ортопедії.

Збагачена тромбоцитами плазма: роль та місце в регенерації ушкоджених тканин



Холодкова О. Л.
Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна

Біологічні властивості тромбоцитів обумовлені вмістом в них кількох видів гранул біологічно активних речовин: тромбоцитарного фактору росту (PDGF), судинного ендотеліального фактору росту (VEGF), фактору росту гепатоцитів (HGF) та ін. Крім того, тромбоцити здатні накопичувати серотонін з сироватки крові. Найкраще досліджена роль тромбоцитів при гемостазі та патології системи згортання, хоча доведена їх значущість й за умов патологічних процесів в різних органах. Найбільш потужний регенеративний ефект дослідники виявили при застосуванні технології отримання збагаченої тромбоцитами плазми (ЗТП), коли шляхом двоетапного центрифугування цільної крові видалялися еритроцити, більшість лейкоцитів та зруйновані клітини, залишаючи в 1 мл плазми не менш як 10^6 тромбоцитів та певну кількість стовбурових й прогеніторних клітин. При цьому в ЗТП виявляли у значній концентрації VEGF, PDGF, епідермальний фактор росту, основний фактор росту фібробластів та ін.

Клінічне застосування ЗТП розпочалося в травматології, стоматології та косметології з метою кращого приживлення трансплантатів, загоєння ран та норичь.

Базуючись на даних, що ЗТП може підсилювати процеси ангіогенезу, має проліферативні та протизапальні властивості, ми провели серію дослідів з використанням ЗТП за умов контактного дерматиту, остеохондрозу, хронічного гепатиту, цирозу печінки. Були відпрацьовані дози, кратність введення, кількість та локалізація ін'єкцій. З'ясовано, що введення ЗТП з подальшою дегрануляцією тромбоцитів і виділенням факторів росту, сприяє швидкому відтворенню морфологічної та функціональної здатності уражених тканин, при цьому спостерігаються процеси, що є характерними для фізіологічної регенерації.

Отримані нами результати підтверджують висновки дослідників про те, що ЗТП здатна до підсилення росту судин та стимуляції проліферації та диференціації клітин-попередників ендотеліоцитів, а також до формування фібринового матриксу в пошкоджених органах для створення оптимальних умов неангіогенезу та регенерації.

Досвід застосування методик пролотерапії при патології опорно-рухового апарату



Голюк Є. Л., Пшеничний Т. Є., Маслова Т. С., Ліненко О. М.
Науково-практичний центр тканинної та клітинної терапії ДУ ІТО НАМН України, Київ, Україна

Пролотерапія – метод лікування, в основі якого лежить використання засобів, здатних викликати локальне запалення і таким чином стимулювати ендогенні регенеративні процеси та ріст сполучної тканини. Як засіб альтернативної медицини даний напрямок набуває популярності в Європі та Північній Америці. Найчастіше та найбільш широко застосовується при остеоартрозі, тендинітах та тендінопатіях, ушкодженнях м'язів, уповільненні консолидації тощо

МЕТА. Оцінити результати лікування, а саме – покращення якості життя у пацієнтів з патологією опорно-рухового апарату при застосуванні пролотерапії.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Дослідження базується на використанні пролотерапії у 97 пацієнтів, що звертались за допомогою до відділу клітинної та тканинної терапії ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», а саме з: гонартрозом 1-3 ступеня (25 хворих), коксартрозом 1-3 ступеня (12 пацієнтів), пошкодженням м'язів колінного суглоба (27 хворих), адгезивним капсулітом плечового суглоба (8 пацієнтів), переломами з уповільненою консолидацією та хибними суглобами (7 пацієнтів), тендинітом та тендінопатіями (18 пацієнтів). З метою лікування нами використовувався гіпертонічний розчин декстрази у 39 пацієнтів, PRP та АМК у 47 та 11 пацієнтів відповідно. Для оцінки результатів лікування використовувались шкали та опитувальники ВАШ, Lysholm, Oxford WOMAC, Mayo, Harris. Результати лікування оцінювались як відмінні, добрі та незадовільні. Оцінка результатів проводилась до початку лікування через 2-5 днів після першої ін'єкції, потім – кожні 2 тижні. Перед початком лікування всім хворим проводили обстеження, що включали в себе загальноклінічні лабораторні обстеження та обстеження на виявлення трансмісивних інфекцій. Також рекомендували припинити прийом антикоагулянтів за 5 діб та НСПЗП за 48 годин до проведення процедури.

ОТРИМАНІ РЕЗУЛЬТАТИ. Більшість пацієнтів (56 пацієнтів), незалежно від патології, відзначали помітне загострення болювого синдрому за шкалою ВАШ протягом перших 2-4 днів після ін'єкції. З метою зменшення болювого синдрому в постпроцедурний період призначали холод на ділянку введення протягом 10-20 хв, обмеження навантаження на кінцівку (хода за допомогою милиць, палички, брейси на ліктьовий суглоб, ортопедичні устілки тощо). Загалом, запропонований підхід дозволив отримати відмінні результати у 59 пацієнтів (60 % випадків), добрі – у 34 пацієнтів (35 % випадків) та незадовільні лише у 4 пацієнтів (5 % випадків). Незадовільні результати лікування було отримано у хворого з коксартрозом 3 ст. (від подальшого лікування хворий відмовився), у 2 пацієнтів з енетезопатіями (відсутність клінічного ефекту, наростання симптоматики, що викликало необхідність проведення оперативного втручання та у хворої з адгезивним капсулітом плечового суглоба.

ВИСНОВОК. Отримані результати застосування проліферативних методик у хворих з порушеннями опорно-рухового апарату свідчать про перспективність напрямку як альтернативи хірургічному лікуванню, але разом з тим потребують розробки диференційованого підходу до використання методу та подальшого аналізу.

Застосування регенеративних ін'єкційних технік у пацієнтів ортопедо-травматологічного профілю



Гольок Є. Л., Пшеничний Т. Є., Маслова Т. С., Бондарев Г. Г.
ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ, Україна
Науково-практичний центр тканинної та клітинної терапії

Регенеративні ін'єкційні техніки – це комплекс методик лікування в ортопедії та травматології, яка набирає популярності в Європі та Америці і полягає у введенні в місце розчинів декстрази, тромбоконтратів, стовбурових клітин. Засновниками сучасних методик є Д. С. Хакетт та Г. А. Хемвалл, які почали застосовувати ін'єкції в 1950-х роках.

Патологія опорно-рухового апарату, при якій застосовуються регенеративні ін'єкційні техніки: остеоартроз, пошкодження та захворювання м'язів тканин (часткове пошкодження сухожильно-зв'язкового апарату, ентезопатії тощо), для регенерації при пошкодженні суглобового хряща та кістки (несправжні суглоби та переломи з сповільненою консолидацією), дисплазія сполучної тканини (гіпермобільність суглобів, що супроводжується їх нестабільністю), вертеброгенний больовий синдром різної етіології.

Засоби для регенеративних ін'єкційних технік ми розділили на 5 груп (ліній): 1 лінія – засоби, які стимулюють виділення організмом власних факторів росту (розчини декстрази, фенолу, гліцерину, глюкози, озону тощо); 2 лінія – біотехнологічні продукти, які містять «фактори росту», – збагачена тромбоцитами плазма та її похідні; 3 лінія – біотехнологічні продукти, що містять стовбурові клітини (концентрати жирової клітковини та кісткового мозку); 4 лінія – біотехнологічні продукти, отримані шляхом культивування клітин (мезенхімальні стовбурові клітини, фібробласти, хондроцити тощо); 5 лінія – фармпрепарати на основі цитокінів, стовбурових клітин, генноінженерні препарати. Ефективність використання розчинів декстрази для лікування остеоартрозу, міофасціального больового синдрому, тендінопатій та вертеброгенного больового синдрому має 1-й та 2-й рівень доказовості, а використання пролотерапії декстразою для лікування м'язово-скелетного больового синдрому, пов'язаного з патологією хребта та суглобів має 3-й рівень доказовості.

Концепція регенеративних ін'єкційних технік полягає в її альтернативі оперативним втручанням (R. Hauser), але часто ін'єкції використовують паралельно з хірургією.

Регенеративні методи в системі лікування пацієнтів з остеохондральними пошкодженнями гомілковостопного суглоба та їх наслідками



Омельченко Т. М.¹, Бур'янов О. А.¹, Лях А. П.², Соболевський Ю. Л.¹, Нечипоренко Р. В.²

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна

²ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ, Україна

МЕТОЮ РОБОТИ було оцінити ефективність використання регенеративних технологій, таких як застосування плазми, збагаченої тромбоцитами або тромбоцитарними факторами росту, мікрофрактури та тунелізація, остеохондральна аутографтація та ін. при лікуванні пацієнтів з післятравматичними остеохондральними дефектами гомілковостопного суглоба.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Із застосуванням вказаних регенеративних методів було проліковано 36 пацієнтів з посттравматичними остеохондральними пошкодженнями та дефектами блоку таранної кістки. Вік пацієнтів коливався від 21 до 67 років. Переважали пацієнти жіночої статі – 23, чоловіків було 13. У 27 пацієнтів з хондральними та остеохондральними пошкодженнями блоку таранної кістки було виконано лікувальну артроскопію гомілковостопного суглоба – лаваж, видалення вільних остеохондральних тіл, дебрідмент в межах неураженого хряща та кістки, тунелізацію в зоні ураження з подальшим застосуванням PRP. У 9 пацієнтів вищевказані процедури були виконані при артротомії з остеотомією медіальної кісточки та проведено кістково-хрящову аутографтацію для усунення кістково-хрящового дефекту. При аутографтації кістково-хрящового фрагменту ложе дефекту заповнювали PRP. В післяопераційному періоді у з 3-5 доби в комплексному лікуванні застосовували триразове внутрішньосуглобове введення PRP з інтервалом 5 днів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ВИСНОВКИ. Функціональний стан гомілковостопного суглоба оцінювали до початку лікування, через 1 та 3 місяці після початку лікування. При цьому визначали інтенсивність больового синдрому за VAS, а також функцію гомілковостопного суглоба та заднього відділу стопи за AOFAS. В групі артроскопічного лікування через 1 місяць відмічено зменшення больового синдрому за VAS з $6,4 \pm 0,4$ до $2,3 \pm 0,3$, а через 3 місяці до $1,7 \pm 0,2$. За AOFAS функція суглоба зросла з $35 \pm 5,4$ балів до $73 \pm 4,7$ балів через 1 місяць, та до $84 \pm 2,9$ через 3 місяці.

В групі пацієнтів з остеохондральною аутографтацією біль за VAS до лікування складав $8,1 \pm 0,6$, через 1 місяць після лікування больовий синдром зменшився до $3,6 \pm 1,8$, а через 3 місяці – $2,1 \pm 0,3$. Функція суглоба за AOFAS з $34 \pm 2,8$ балів через 1 місяць зросла до $67 \pm 4,1$, а через 3 місяці склала $83 \pm 2,9$.

Отже, диференційований підхід до вибору тактики лікування та застосування в системі лікування регенеративних технологій дозволили отримати добрі результати лікування у мінімальні строки спостереження для обраної категорії пацієнтів.

Наш опыт применения аутокриолизата тромбоцитов и аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в комплексном лечении заболеваний опорно-двигательного аппарата



Бибиков А. А.

Институт пластической хирургии «Виртус», Одесса, Украина

Заболевания опорно-двигательного аппарата, в частности остеоартрит (ОА), являются наиболее распространенной патологией, приводящей к существенному ограничению двигательной активности и нередко инвалидизации. Более 80 % населения в возрасте 50-60 лет болеет ОА, а в возрасте после 80 лет – 100 %. Неудовлетворенность существующими традиционными методами лечения заключается в их направленности на ограничения прогрессирования ОА, а не возвращение утраченной функции. Одним из перспективных подходов в лечении ОА является клеточная терапия с использованием аутологичных факторов роста и стволовых клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В период с 2014 по 2017 гг. в клинике «Виртус» комплексное лечение с применением аутологичных факторов роста, мезенхимальных стволовых клеток и остеобластов получил 51 пациент (остеоартрит – 34, ложный сустав – 1, хронический остеомиелит – 1, повреждения мышечной ткани – 3, плантарный фасцит – 5, синовит и бурсит – 4, эпикондилит – 3) в возрасте от 18 до 70 лет.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Во всех случаях с применением аутокриолизата тромбоцитов больные отмечают субъективное улучшение состояния с первых дней от начала лечения, что проявляется в уменьшении болевого синдрома, увеличении амплитуды движений и снижении количества употребляемых обезболивающих препаратов. Объективными подтверждениями служит УЗИ, рентгенография. Не было зафиксировано ни одного случая побочных эффектов, аллергических реакций или общего ухудшения состояния пациентов.

ВЫВОДЫ. Применение АМК, МСК в лечении заболеваний опорно-двигательной системы является наиболее перспективным, т.к. позволяет сокращать сроки лечения, восстанавливать утраченные функции.

Експериментальне дослідження застосування тромбоцитарної плазми в лікуванні остеоартрозу



Бур'янов О. А.¹, Хіміон Л. В.³, Дедух Н. В.², Смоліна Л. О.³, Омельченко Т. М.¹

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна

²ДУ «Інститут патології хребта та суглобів імені М. І. Ситенка НАМН України», Київ, Україна

³Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, Київ, Україна

Відомо, що плазма, збагачена тромбоцитами (platelet-rich plasma - PRP), стимулює біосинтез протеогліканів, колагену 2 типу, сприяє хондрогенезу мезенхімальні стовбурові клітини, проліферації, диференціюванню та адгезії хондроцитів, що підвищує репаративні потенції суглобового хряща [Cugat R. et al., 2006, Gobbi A., 2009, Li H., 2016]. Експериментальне дослідження застосування PRP з морфометричним аналізом регенерату, що формується в зоні ураженого хряща під впливом лікування, дозволить оцінити ефективність та обґрунтувати методику лікування.

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ. В експерименті на лабораторних тваринах вивчити морфологічні особливості регенерації суглобового хряща при застосуванні локальної ін'єкційної PRP терапії при змодельованому гострому пошкодженні суглобового хряща колінного суглоба.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Проведено 2 серії експериментів, які виконані на 24 кролях. В обох групах тварин відтворювали стандартний дірчастий трансхондральний дефект (1-2 мм) в виростках стегнової кістки. В дослідній групі (n1 = 12) застосували введення фізіологічного розчину (плацебо); в групі контролю (n2 = 12) – остеохондральний дефект заповнювали фібрином, збагаченим тромбоцитами. Тварини обох груп виводилися з експерименту на 10 добу (по 5 з кожної групи) та на 39 добу (по 7 з кожної групи). Підготовку гістологічного препарату виконували за стандартною методикою. На санному мікроскопі виготовляли серійні гістологічні зрізи товщиною 7-9 мкм, які фарбували залізним гематоксиліном Вейгерта та еозином, а також пікрофуксином за Ван Гізон. Забарвлені зрізи аналізували в мікроскопі Axiostar Plus та Olympus BX53. Виразність розвитку деструктивно-дистрофічного процесу оцінювали за якістю та поширеністю проявів патологічних змін в структурі суглобового хряща. За основу взята модифікована нами шкала оцінки, що подана в методичних рекомендаціях з експериментального дослідження та клінічного вивчення протиартрозних лікарських засобів, затверджених ДЕК МОЗ України та шкали оцінки, що запропонована O'Driscoll S. W., Frenkel S. R. et al.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ. Аналіз результатів дослідження з використанням шкал оцінки показав, що гіаліновий хрящ був присутній тільки в регенераті тварин досліджуваної групи, розшарування поверхні у цих тварин не виявлено, структурна інтегрованість була високою, щільність суглобового хряща навколо країв дефекту значно перевищувала показники контролю. Зв'язок регенерату з краями дефекту суглобового хряща, що оточував дефект, фіксували практично на всій площі крайових відділів суглобового хряща. Дегенеративні зміни хондроцитів переважали в контрольній групі тварин. Перебудова субхондральної кістки під зоною дефекту була практично однаковою у дослідній та контрольній групі кролів. При статистичному аналізі порівняння усіх складових контрольної та дослідної групи виявлено вірогідну різницю ($p < 0,001$, $t = 4,8$).

ВИСНОВОК. Було відтворено травматичне ушкодження суглобового хряща у вигляді змодельованого повношарового кістково-хрящового дефекту. Експериментально доведено, що при застосуванні фібрину, збагаченого тромбоцитами, в зоні кістково-хрящового дефекту формується хрящовий регенерат, що має наближені до норми морфометричні характеристики, високий ступінь адаптації та інтеграції до ложа дефекту.

Аутопластика кісткових дефектів із застосуванням технології PRP та PRF в експерименті



Бур'янов О. А.¹, Дедух Н. В.², Ярмольок Ю. О.³, Вакулич М. В.¹

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна

²ДУ «Інститут патології хребта та суглобів імені М. І. Ситенка НАМН України», Київ, Україна

³НВМКЦ «Головний військовий клінічний госпіталь» МО України, Київ, Україна

МЕТОЮ РОБОТИ було дослідити в експерименті та проаналізувати застосування різних комбінацій регенераторних технологій у лікуванні дефектів кісткової тканини шляхом вивчення морфологічних особливостей регенерації діафізарного дефекту великогомілкової кістки експериментальної тварини (кроля) в умовах введення фібрину, збагаченого тромбоцитами (PRF).

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Проведено 3 серії експериментів, які виконані на 36 кроликах (середня маса $4100 \pm 83,6$ г). У всіх групах досліджень відтворювали стандартний дірчастий транскортикальний дефект (3 мм) в великогомілковій кістці: в першій серії – без заміщення; друга серія – кістковий дефект заповнювали фібрином, збагаченим тромбоцитами; третя серія – губчасто-кістковий аутоотрансплантат змішували з фібрином, збагаченим тромбоцитами (співвідношення 1:1). Тварини всіх серій були виведені з експерименту на 39 добу. Підготовку гістологічного препарату виконували за стандартною методикою.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ. Трабекулярна кісткова тканина була присутня тільки в контрольній серії і у тварин, дефекти яких були заповнені аутокісткою, проте в цій серії площа її була менша на 37,2 % ($P < 0,001$) в порівнянні з контролем. Сполучної тканини було на 27 % ($P < 0,001$) менше в дефектах тварин в серії експерименту з аутокісткою в порівнянні з тваринами контрольної серії. Фрагменти кісткової стружки були щільно спаяні з пластинчастою кістковою тканиною і перебудовувалися з її заміщенням кістковою тканиною. В мікрофрагментах була оцінена загальна площа. Пластинчаста кісткова тканина розташовувалася тільки в дефектах, заповнених кістковим аутоотрансплантатом ($64,1 \pm 1,8$), а також аутокісткою в поєднанні з PRF ($87,93 \pm 2,38$), в якій показник площі був підвищений на 23,9 % ($P < 0,001$).

ВИСНОВКИ. Заповнення дефекту аутокісткою в поєднанні з PRF сприяє стимуляції репаративного остеогенезу. В області травматичного пошкодження розташовувалася зріла пластинчаста кісткова тканина, спаяна з кістковою стружкою, які формували єдиний масив.

Вплив збагаченої тромбоцитами плазми різної концентрації на експресію генів хондрогенних маркерів в клітинах пульпозного ядра в умовах моделювання травми *in vitro*



Педаченко Є. Г., Васильєва І. Г., Хижняк М. В., Чопик Н. Г., Педаченко Ю. Є., Олексенко Н. П.,

Шуба І. М., Галанта О. С., Цюбко О. І., Сніцар Н. Д.

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України», Київ, Україна

Проведення досліджень з використанням системи *in vitro* з метою розробки та впровадження у клінічну практику новітніх клітинних технологій для лікування хворих з дегенеративними та травматичними ураженнями хребта з огляду на їх високу частоту та тривалість ускладнень є актуальним завданням сучасної медицини та спінальної нейрохірургії зокрема. **МЕТОЮ** даної роботи було вивчення особливостей взаємодії між хондроцитами пульпозного ядра (ПЯ) та збагаченою тромбоцитами плазмою (ЗТП) в залежності від її концентрації та динаміки застосування на основі дослідження експресії генів хондрогенних та матриксних маркерів в умовах моделювання травми *in vitro*.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Роботу проводили на тканинах дорослого щура. ЗТП виділяли із отриманих зразків крові, додавали до суспензії клітин ПЯ. Концентрація тромбоцитів становила в різних серіях експерименту 3, 10 та 20 %. Культивування хондробластів, виділених із ПЯ хвостових хребців щурів, здійснювали у відповідності з методом С. Lööf, який є моделлю травматичного ураження в умовах *in vitro*, протягом 3, 7 та 14 діб. Крім того, порівнювали вплив одноразового та багаторазового додавання ЗТП при максимальній її концентрації (20 %). Рівень експресії генів колагену II (col2), агрегану (асап), гліпікану (grc3), анексину (апх3) та віментину (vīm) в культурі клітин визначали методом полімеразної ланцюгової реакції.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ. Чисельність живих клітин ПЯ при виділенні становила 66 %. На 3-тю добу культивування їх вміст в контрольних зразках падав до 28 %, натомість при додаванні ЗТП складав 50 % (ЗТП 3 %), та 60-65 % (ЗТП 10 та 20 %). На 7 добу в контрольних зразках фракція живих клітин становила 30 %, при додаванні ЗТП (20 %) – 70 %. На 14 добу культивування кількість живих клітин в усіх зразках залишалася без змін. Навколо клітин зберігався щільний шар тромбоцитів, при одноразовому введенні він був значно менший, ніж при багаторазовому. При цьому клітини змінювали форму – ставали овальними, веретеноподібними, полігональними, у деяких випадках з'являлися відростки. В контрольних зразках подібних змін не спостерігалось.

Експресія генів хондрогенних та матриксних маркерів в суспензії клітин ПЯ змінювалася наступним чином: на 3-тю добу культивування рівень експресії всіх досліджених генів знижувався в 1,5-6,5 разу порівняно з контрольними зразками, на 7-му добу спостерігалось подальше зниження цих показників; при цьому експресія двох генів (col2 та апха), а на 14-ту добу чотирьох генів (col2, асап, апха, grc) не визначалась взагалі. При додаванні ЗТП у концентрації 3, 10 або 20 % по відношенню до суспензії клітин пульпозного ядра рівень експресії всіх зазначених генів у більшості випадків зростав в 1,5-6 разів і повертався до рівня експресії відповідних генів нативної суспензії клітин. ▶

Найбільш виражений активуючий ефект спостерігався при максимальній концентрації ЗТП (20 %) і, зокрема, при багаторазовому її введенні.

ВИСНОВКИ. Таким чином, ЗТП проявляє дозозалежний активуючий вплив на виживання хондрогенних клітин ПЯ щурів та експресію генів хондрогенних та матричних білків за даної моделі травматичного ураження в умовах *in vitro*.

Опыт применения PRP-терапии в лечении заболеваний и травм опорно-двигательного аппарата



Кузьмин М. В., Шевченко И. А., Вяткин А. В.
КУ «ДГКБ №2» ДОР, МЦ «Добробут нації», Днепр, Україна

Несмотря на развитие современных методов стимуляции регенеративных возможностей тканей опорно-двигательного аппарата при различных заболеваниях и травмах, поиск эффективных методик остается актуальным. В частности, по данным научной литературы, богатая тромбоцитами плазма (Platelet-rich plasma – PRP) дает возможность влиять на биологическую регенерацию тканей пациента локально в области патологического процесса, так как в тромбоцитах содержатся биологически активные вещества – факторы роста, которые являются катализатором для обновления и восстановления тканей организма.

Целью работы является оценка эффективности и безопасности применения локальной инъекционной PRP-технологии в лечении и профилактике заболеваний и травм опорно-двигательного аппарата у различных групп пациентов независимо от стадии, длительности и выраженности клинических проявлений заболевания, локализации патологического процесса, возрастных, демографических и социальных показателей на данных опыта применения нами данной технологии.

Методика заключается в инъекционном введении аутоплазмы, обогащенной тромбоцитами, в патологический очаг, что позволяет запустить каскад процесса обновления клеток опорно-двигательного аппарата. В течение последних трех лет использования нами этого метода пролечено 208 пациентов с заболеваниями и травмами опорно-двигательного аппарата, и на основе клинических наблюдений разработаны рабочие схемы введения PRP как монотерапии, так и в сочетании с другими терапевтическими, физиотерапевтическими и хирургическими методами лечения.

Данный метод мы применили у пациентов с дегенеративно-дистрофическими заболеваниями, такими как: гонартроз – 73 пациента; коксартроз – 28 пациентов; остеохондроз – 16 пациентов; адгезивный капсулит плечевого сустава – 14 пациентов; другие артрозы – 22 пациента; ревматоидный артрит – 3 пациента. У пациентов с травмами опорно-двигательного аппарата метод применили в остром посттравматическом периоде: при переломе костей – 12 пациентов; послеоперационном периоде – 16 пациентов; при вяло-консолидирующихся переломах – 8 пациентов; в реабилитационном периоде – 16 пациентов. Первичный курс получили 162 (78 %) пролеченных пациента, повторный курс – 46 (22 %).

PRP нами вводилась внутрисуставно, параартикулярно, параоссально, паравертебрально, в триггерные зоны и в место перелома. Положительный эффект (3–6 месяцев ремиссии и более) наблюдался у 160 (77 %), положительный эффект (от 1 до 3 месяцев ремиссии) у 42 (20 %), отсутствие эффекта наблюдалось у 6 (3 %), осложнений у пациентов не возникло. Результаты и эффективность оценивались совокупностью способов, рекомендованных OARSI (OsteoArthritis Research Society International):

1. Общая оценка боли по ВАШ;
2. По индексу WOMAC;
3. По шкале боли Bloechle и соавторов;
4. По результатам клинической оценки врачом поврежденного сегмента.

ВЫВОДЫ:

1. Положительный эффект при лечении данным методом у 97 % пациентов говорит о высокой эффективности и безопасности PRP-терапии.
2. Применение PRP-терапии при лечении заболеваний и травм опорно-двигательного аппарата может являться как монометодом, так и составной частью комплексной терапии.

Наш досвід застосування регенеративних технологій в лікуванні синдрому нестабільного коліна



Марциняк С. М., Чорнобай С. П., Бондарев Г. Г.
ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ, Україна

В Україні серед працездатного населення нараховується біля 9 % хворих з патологією колінних суглобів. Серед пацієнтів із захворюваннями в ділянці колінного суглоба 13–42 % страждають хронічним больовим синдромом (за даними центру медичної статистики МОЗ України на 2014 р.). Колінний суглоб, особливо зона його медіальної поверхні, часто залучається в патологічний процес, що пов'язано з великим функціональним навантаженням на сухожильно-м'язовий та зв'язковий апарат. При хронічному перевантаженні і мікротравматизації цих анатомічних структур та особливо місцях їх прикріплення (ентезах) виникають дегенеративно-дистрофічні зміни, які називають терміном ентезопатії. ▶

Ентезопатія – це загальний термін, що не відображає етіологічного чиннику розвитку больового синдрому та його локалізації. Для захворювань колінного суглоба характерним є залучення в патологічний процес міофасціальних структур ішиокруральних м'язів, що формують поверхневу «гусячу лапку» колінного суглоба, яка забезпечує стабільність колінного суглобу, за даними деяких авторів, від 6 % до 8 %. Та не дивлячись на високу розповсюдженість, синдром нестабільного коліна залишається одним із найменш вивчених уражень параартикулярних тканин, особливо на етапах амбулаторної допомоги.

МЕТА. Продемонструвати клінічну та соціальну значимість лікування синдрому нестабільного коліна як для пацієнта, так і для лікаря. Та продемонструвати ефективність різних методів лікування.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Загальна кількість пацієнтів віком від 19 до 78 років – 39. З них – 11 чоловіків та 28 жінок. Для спостереження використовувалось анкетування пацієнтів за шкалою ВАШ та WOMAC. Для діагностики використовувалася клінічний огляд та функціональні методи дослідження (УЗД та рентгенографія). З 39 пацієнтів у 25 основним захворюванням був деформуючий остеопороз; 6 мали пошкодження менисків; 2 – синдром медіапотеллярної складки; 4 – дисплазію колінних суглобів; 2 – наслідки хвороби Озгуда-Шлатера. Особливо треба відмітити, що 21 пацієнт мав ожиріння різного ступеня та 4 – цукровий діабет. Всі результати оброблені статистично в 6 етапів: через 5 днів; через 14 днів; через 21 день; через 1 місяць; через 3 місяці. Застосовувались наступні методи лікування: PRP терапія – 20 пацієнтів; гіалуронова кислота для сухожилків та зв'язок – 8 пацієнтів; бетаметазон – 11 пацієнтів.

РЕЗУЛЬТАТИ. PRP терапія. При цьому методі спостерігалось посилення больового синдрому на другому етапі (2-5 день). Наближаючись до третього етапу (7-14 день), пацієнти спостерігали значне зменшення (або відсутність) больового синдрому.

Гіалуронова кислота для сухожилків та зв'язок. При цьому методі спостерігалось посилення больового синдрому на другому етапі (2-5 день). Наближаючись до третього етапу (7-14 день), пацієнти спостерігали значне зменшення або відсутність больового синдрому.

Бетаметазон. Введення бетаметазону давало пацієнтам швидкий, але не дуже довготривалий ефект, за якого біль зменшувався вже на 3-5 добу. Але при подальших опитуваннях, після місячного терміну пацієнти спостерігали повне відновлення всіх складових синдрому нестабільного коліна. Повторне введення препарату не проводилось.

Підводячи підсумки, відслідковується пролонгованість дії PRP і Гіалурома Тендон з поступовим наростанням ефекту. Депос має швидкий, але не довготривалий ефект, що дозволяє широко використовувати його при підготовці до оперативного лікування.

ВИСНОВКИ. Синдром нестабільного коліна не є окремим захворюванням (95 % випадків), а відноситься до симптомокомплексу захворювань колінного суглобу і є одним з перших синдромів, які нерідко примушують пацієнта звернутись до ортопеда за допомогою. Діагностика та лікування синдрому нестабільного коліна не є складним та, не дивлячись на це, ортопеди нерідко не надають належної уваги синдрому нестабільного коліна, що призводить до хронізації процесу і веде до утруднення терапії. Лікування синдрому нестабільного коліна дозволяє покращити ефект від лікування основного захворювання та безболісно для пацієнта провести підготовку до оперативного лікування основного захворювання та полегшує процес реабілітації після операції, покращує психоемоційний стан пацієнта за рахунок покращення сну. Для консервативного лікування можна застосовувати PRP-терапію чи Гіалуронову кислоту, які в наших спостереженнях показали майже однакові результати. Ін'єкції Депосу, на нашу думку, можливо використовувати для досягнення швидкого та недовготривалого ефекту, який бажаний при підготовці до оперативного лікування загального захворювання.

Наш досвід застосування цитокін-терапії при лікуванні хронічного синовіту колінних суглобів, викликаного сталим фізичним навантаженням



Бондарев Г. Г., Голіук Є. Л.

ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ, Україна

Проблема хронічних синовітів внаслідок постійного навантаження, що спричиняють дегенеративно дистрофічні зміни суглобів, є актуальною на сьогоднішній день.

МЕТА. Продемонструвати ефективність цитокін-терапії у лікуванні хронічних запальних процесів у суглобах пацієнтів, життя яких пов'язане зі сталим щоденним навантаженням нижніх кінцівок.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. В ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України» було обстежено та проліковано 20 пацієнтів. З них 13 чоловіків та 7 жінок. Вік пацієнтів складав від 40 до 55 років. У всіх пацієнтів було зібрано анамнез за шкалами ВАШ, WOMAC. Для діагностики використовувались: клінічний огляд та функціональні методи обстежень, такі як: рентгенографія, УЗД, МРТ. Статистична обробка даних результатів лікування проводилась у 5 етапів: до початку лікування, через 14 днів, через 1 місяць, 3 місяці, 6 місяців та 12 місяців.

Всі пацієнти були проліковані консервативно, 10 осіб – за допомогою внутрішньосуглобової цитокін-терапії курсом 6 ін'єкцій протягом 3 тижнів. 10 пацієнтів приймали перорально нестероїдні протизапальні засоби протягом 10 днів паралельно з фізіотерапевтичними методами. При цьому в першому випадку пацієнти продовжували звичне для них навантаження. У другому випадку навантаження протягом 10 днів лікування максимально обмежувалось.

РЕЗУЛЬТАТИ. Використання цитокін-терпії продемонструвало довготривалий клінічний ефект у вигляді відсутності запального процесу та больового синдрому протягом 10 ± 1 місяців, при тому, що пацієнти продовжували отримувати звичне для них навантаження під час лікування та протягом всього часу після останньої ін'єкції.

Застосування нестероїдних протизапальних препаратів паралельно з фізіотерапевтичними методами дозволило отримати задовільний клінічний ефект терміном лише на 1 місяць за умови обмеження навантаження на суглоби. Далі з початком звичного навантаження запальний процес та больовий синдром з'являлись знову, що потребувало повторного лікування.

ВИСНОВКИ. Цитокін-терапія, на нашу думку, може бути альтернативним методом лікування хронічних синовітів колінних суглобів у пацієнтів, життя яких пов'язане з щоденним навантаженням нижніх кінцівок, що дозволяє мінімізувати прийом протизапальних препаратів протягом повсякденного життя.

Характеристика показників остеогенної активності мезенхімальних (стромальних) стовбурових клітин кісткового мозку стегнової і великогомілкової кісток хворих на ревматоїдний артрит



Герасименко С. І., Панченко Л. М., Бабко А. М., Автомеєнко Є. М.
ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ, Україна

Ревматоїдний артрит (РА) – це системне аутоімунне захворювання сполучної тканини організму, що характеризується прогресуючим хронічним перебігом з переважним ураженням суглобів, розвитком тяжких незворотніх деформацій, значними порушеннями їх функції, які призводять до втрати працездатності та інвалідності. Усунення численних деформацій та відновлення опорно-рухової функції суглобів та кінцівок у цілому і, в такий спосіб, відновлення (повернення) функціональної активності та працездатності пацієнту на пізніх стадіях захворювання можливо лише за допомогою ендопротезування.

МЕТА РОБОТИ – вивчити показники остеогенної активності мезенхімальних (стромальних) стовбурових клітин кісткового мозку (МСК КМ) стегнової та великогомілкової кісток у хворих на РА за наявності фронтальних деформацій.

Клонування МСК КМ кісткового мозку проводили за методикою Фріденштейна О. Я. (1973), в модифікації Астахової В. С. (1982). Матеріалом для дослідження слугувала спонгіозна кістка, забір якої проводився під час оперативного втручання – ендопротезування колінного суглоба з латеральної та медіальної ділянок дистального відділу стегнової та проксимального відділу великогомілкової кісток. Обстежено 37 хворих на РА з ураженням колінного суглоба. Досліджено 168 зразків кісткового мозку, вирощено 204 культури МСК КМ. Остеогенну активність мезенхімальних (стромальних) стовбурових клітин кісткового мозку – колонієутворюючих одиниць фібробластів (КУОФ) оцінювали за такими показниками: загальною кількістю ядромісних клітин в 1 см^3 , кількістю МСК КМ в 1 см^3 спонгіози та ефективністю їх клонування серед 10^5 ядромісних клітин. Останні два показники визначали за формулами.

Виявлені суттєві відмінності параметрів показників остеогенної активності МСК КМ стегнової та великогомілкової кісток. За здатністю до реновації кісткової тканини досліджувані ділянки колінного суглоба хворих на РА можна розташувати по низхідній таким чином: медіальний, латеральний виростки стегнової, латеральний і медіальний виростки великогомілкової кісток.

Найнижча остеогенна активність виявлена у виростках великогомілкової кістки. Ефективність клонування в латеральному виростку дорівнює $3,41 \pm 1,05$, що в 1,3 разу менше за латеральний стегнової кістки, а у медіальному становить $1,91 \pm 0,8$, що у 3,27 разу вірогідно менше за медіальний виросток стегнової кістки.

Проведені дослідження дозволяють об'єктивно оцінити структурно-функціональний стан кісток (*in situ*), що утворюють колінний суглоб хворих на РА, місця майбутнього розташування компонентів ендопротеза.

Отримані результати культуральних досліджень розширюють уявлення про здатність ураженої патологічним процесом кісткової тканини до реновації і спонукають до продовження комплексного (разом з біомеханічними) вивчення структурно-функціонального стану кістки для розробки диференційного підходу до вибору методу ортопедичного лікування.

Методика аспірації та використання кісткового мозку при розладах остеорепарації



Мовчан О. С., Оліфіренко О. І.
Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика, Київ, Україна

Останнім часом в літературних джерелах відмічається підвищений інтерес до використання регенераторних технологій в медицині загалом, та в ортопедії і травматології зокрема. В лабораторних умовах та в клінічній практиці вивчається лікування мезенхімальними стовбуровими клітинами (МСК), збагаченою тромбоцитами плазмою, окремими факторами росту, клітинами хоріона і таке інше. На нашу думку, аспірат червоного кісткового мозку (bone marrow aspirate – BMA) і концентрат кісткового мозку (bone marrow aspirate concentrate – BMAC) є збалансованими природними мультифакторними субстратами і мають знайти своє місце в лікуванні порушень остеорепарації. Пункція кісткового мозку все ширше виконується в ортопедії травматології при лікуванні розладів остеорепарації, дефектах кісток та хрящів, але з технічної точки зору поширені різні підходи до її проведення.

МЕТА РОБОТИ. Оптимізувати методологію пункції кісткового мозку в ортопедії та травматології.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Проведений аналіз літератури за 2007-2017 рр., що присвячена питанню методології отримання аспірату червоного кісткового мозку. Проаналізовано підходи різних авторів і власних досліджень та відпрацьовано найбільш раціональний метод отримання аспірату кісткового мозку.

Принципово важливою складовою BMA є концентрація і кількість мезенхімальних стовбурових клітин, адже дані клітини безпосередньо забезпечують регенерацію кісткової тканини. Автори повідомляють про прямопропорційну залежність між кількістю МСК і терапевтичним впливом на остеорепарацію та об'єм новоутвореної кісткової тканини. Кількість МСК в аспіраті кісткового мозку суттєво відрізняється в залежності від техніки виконання пункції. Для забезпечення кращих характеристик BMA варто дотримуватися певних рекомендацій технічного характеру: ➤

- Пункцію виконувати з крила клубової кістки в сегменті 4–8 см від передньої верхньої ості – якщо маніпуляція виконується під короткотривалим внутрішньовенним наркозом, та в сегменті 0–4 см від задньої верхньої ості – якщо під місцевою анестезією. Аспірат, отриманий з метаепіфізу великогомілкової та п'яtkової кістки, відрізняється нижчим вмістом МСК на 96,4 % та 99,2 % відповідно порівняно з кістковим мозком, отриманим з клубової кістки. Пункція інших сегментів крила клубової кістки несе теоретично більший ризик пошкодження кортикальних шарів та нервово-судинних структур.
- При місцевому інфільтративному знеболенні, для попередження потрапляння анестетика в аспірат і токсичного впливу на клітини кісткового мозку використовувати мінімально-ефективний об'єм анестетика, інфільтрувати потрібно тільки шкіру та окістя.
- Для аспірації використовувати шприци об'ємом 10–20 мл з наповненням до 25–30 %, що забезпечить на 80–90 % клітинною фракцією МСК, якщо порівнювати з аспірацією повного шприца. При необхідності отримання значного об'єму – через один порт поліаксіально виконувати декілька пункцій малого об'єму.
- Обирати кісткові голки максимально можливої товщини (8 Gauge) та конструкції з додатковими бічними портами в стилеті, що, відповідно до законів гідродинаміки має забезпечувати ефективнішу передачу від'ємного тиску поршня шприца на аспіраційний вміст.

ВИСНОВКИ. Таким чином, вже на етапі отримання аспірату кісткового мозку можна суттєво покращити якісні та кількісні його характеристики за рахунок дотримання ряду принципових рекомендацій. Подальше дослідження, оптимізація та уніфікація методології аспірації кісткового мозку на нашу думку є актуальним.

Використання культури клітин хрящового диферону для пластики дефектів суглобового хряща

Малишкіна С. В., Воронцов П. М., Вишнякова І. В., Самойлова К. М.

ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. М. І. Ситенка НАМН України», Харків, Україна

Питання регенерації суглобового хряща – це одна з актуальних проблем сучасної біології та медицини. Тому що, не зважаючи на існування багатьох методів оптимізації регенерації суглобового хряща, кількість хворих з ушкодженнями та дистрофічними ураженнями хряща не зменшується. Регенеративна медицина займає одну з передових позицій в цій галузі, але цей напрямок має багато суперечливих питань і потребує подальшого вивчення.

МЕТА даного дослідження – вивчити можливість використання культивованих клітин хрящового диферону для пластики дефектів ушкодженого суглобового хряща.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Дослідження було виконано на щурах лінії Wistar. Тваринам було змодельовано стандартний дефект суглобового хрящу дистального відділу стегнової кістки (діаметр 2,5 мм). Тварин було поділено на 2 групи: 1 група (контроль) – це дефект без лікування, 2 група – це дослід. Дослідним тваринам в дефект вводили 0,02 мл суспензії культивованих клітин хрящового диферону (концентрація клітин $1 \cdot 10^9$ клітин/мл), дефект заклеювали фібриново-колагеновим покриттям. Клітинна суспензія містила клітини хрящового диферону, які було отримано шляхом культивування скелетогенних клітин зачатків кінцівок 11–12-добових ембріонів щурів упродовж 9 діб. Для культивування використовували культуру високого ступеня щільності, в якій клітини висіювалися у кількості $2 \cdot 10^7$ клітин/мл культурального середовища. Культивування проводили при 37 °C, 95 % вологості та 5 % CO₂. Тварин виводили з експерименту шляхом передозування ефіру на 3, 7, 14, 28 і 90-у добу після операції. В дослідженні отриманого матеріалу використовували гістологічний, гістохімічний, електронно-мікроскопічний методи.

РЕЗУЛЬТАТИ. Метод культивування клітин хрящового диферону високого ступеня щільності дозволяє отримувати клітини хондрогенного типу, трансплантація яких в дефекти суглобового хряща спричиняє позитивний вплив на перебіг репаративного процесу. Було показано, що на 3 та 7 добу після трансплантації щільність клітин сформованої репаративної бластемі в дослідній серії була достовірно більша. На 14 добу в дослідній групі спостерігали активну перебудову колагено-фібринового покриття, в товщу якого з глибини дефекту вросли клітини хрящового і фібробластичного диферонів. Тоді як в контрольній серії було відмічено прояви деструктивно-дегенеративного процесу (наявність рихлих фібрилярних структур, осередків гематоми та капсул з хондроцитами, які піддавалися лізису). На 28-у добу в зоні ушкодження покриття заміщувалося хрящовими клітинами і надалі його компоненти більше не спостерігалися. На 90-у добу в досліді було показано, що практично весь дефект був заповнений гіаліновим хрящем, який вміщав характерні макромолекули глікозаміногліканів, хондроїтинсульфатів і колаген II типу. Наявність специфічних макромолекул в контрольній серії була достовірно нижче. Також було помітно початок формування зональної позиційної специфічності, характерної для суглобового хряща, тоді як в контрольній серії тільки 1/3 дефекту заповнювалася несформованою колагеново-волокнистою тканиною. Таким чином, проведене експериментальне дослідження продемонструвало оптимізуючу дію трансплантації культивованих хондрогенних клітин на перебіг репаративного процесу в хрящових дефектах.

Віддалені результати хірургічного лікування післятравматичних ушкоджень хряща колінного суглоба аутологічними хондроцитами



Страфун С. С.¹, Костогряз О. А.¹, Зубов Д. О.², Костогряз Ю. О.¹, Нечипоренко Р. В.¹

¹ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ, Україна

²ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

МЕТА. Дослідити віддалені результати лікування повношарових травматичних дефектів суглобового хряща колінного суглоба методом трансплантації культивованих аутологічних хондроцитів (АХ).

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ. Проаналізовано результати лікування 7-х пацієнтів з травматичними дефектами суглобового хряща внутрішнього виростка стегна. Всі пацієнти були чоловіки, середній вік яких складав 31 рік. Середня площа дефекту хряща складала 4,3 см². Результати оцінювали за шкалою IKDC, Lysholm та МРТ-дослідження в термінах 6, 12, 24, 36 і 60 місяців після операції.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ. Хворі прооперовані в період з 2007 по 2008 роки і тільки 2 хворим в передопераційному періоді діагностовано за даними МРТ дослідження ушкодження хряща з невідомою площею ушкодження. На першому етапі лікування хворим виконано артроскопічно парціальну резекцію ушкоджених частин медіального меніску та видалено вільні хрящові тіла. Взятю фрагмент оточуючого хряща вагою 400 мг, який в транспортному середовищі доставлено до лабораторії. В лабораторії методом ферментативної дезагрегації отримали первинну культуру АХ. Культивування клітин проводили за стандартним протоколом. За 30 днів було отримано 10 млн. культивованих АХ.

Трансплантацію АХ виконали на другому етапі лікування шляхом мініартротомії, через 3-4 тижні після першого оперативного втручання. Перша операція із клінічним застосуванням АХ виконана 22.11.2007 р.

Інтраопераційно культивовані АХ помістили в 5 мл мукополісахаридного гідрогелю з агарози, яка має хороші полімеризуючі властивості. Гідрогель з клітинами розміщували в ділянці дефекту, краями якого була здорова хрящова тканина. Після загусання цієї маси поверхню трансплантації покривали пластинкою «Тахокомб», а краї герметизували фібриновим клеєм. В післяопераційному періоді проводили індивідуальну реабілітацію.

В середньому, за даними IKDC, до операції хворі мали 48 балів, в 6 місяців – 68, в 12 – 76, а в 24, 36 та 60 місяців – 84 бали. За даними шкали Lysholm перед операцією хворі мали в середньому 62 бали і стійкого результату в 88 балів досягали через 1 рік після операції. За даними МРТ-дослідження повноцінна інтеграція трансплантату з оточуючим суглобовим хрящем спостерігалася через 1 рік після операції. Трьом хворим, у яких була найбільша площа дефекту після варусної деформації через 1 рік, а у іншого через 5 років після трансплантації, виконано корекційну вальгизуючу остеотомію. Віддалений післяопераційний період задовільний.

ВИСНОВКИ. Віддалені результати застосування трансплантації культивованих аутологічних хондроцитів при повношарових травматичних дефектах суглобового хряща продемонстрували свою ефективність і дають певні надії в майбутньому на відновлення великих за площею дефектів суглобового хряща колінного суглоба.

Влияние криоконсервированных аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в терапии экспериментальной тендопатии



Коструб А. А.¹, Блонский Р. И.¹, Волкова Н. А.², Гольцев А. Н.²

¹ГУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України, Київ, Україна

²Інститут проблем криобіології та криомедицини НАН України, Харків, Україна

На модели экспериментального дегенеративно-дистрофического повреждения Ахилловых сухожилий у крыс проведена оценка эффективности применения локального и системного введения криоконсервированных аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (КрАММСК) костного мозга. Показано, что применение КрАММСК приводит к увеличению интенсивности пролиферации клеточных элементов в зоне дегенеративно-дистрофического процесса Ахилловых сухожилий с последующей нормализацией их структурно-функциональной организации, восстановлением содержания коллагена I типа и показателя прочности. Следует отметить, что в случае применения локального введения КрАММСК репаративные процессы в Ахилловых сухожилиях имеют более интенсивный характер. С помощью люминесцентной метки подтверждено присутствие в зоне дефекта введенных клеток на протяжении 21 суток. Вероятно, терапевтическая эффективность КрАММСК как оптимизаторов тканевой репарации, определяется их способностью к дифференцировке в широкий спектр клеток, включая фибробласты и тендициты, секрецией цитокинов, хемокинов и факторов роста, а также трофическим и иммуномодулирующим потенциалами. Полученные результаты могут быть использованы для обоснования и разработки методик лечения дегенеративно-дистрофических повреждений сухожилий с использованием локального и системного методов введения КрАММСК в клинической практике.

Виробництво алогенних кісткових скаффолдів за технологією локального (госпітального) кісткового банку



Голюк Є. Л., Пшеничний Т. Є., Маслова Т. С., Бондарев Г. Г.
ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України», Київ, Україна

В 2016 році науково-практичним центром тканинної та клітинної терапії впроваджено власне виробництво скаффолдів (кісткового матриксу) для кісткової пластики від живих донорів за технологією «локального кісткового банку». Процес виробництва та його результати відповідають усім існуючим міжнародним вимогам, а саме, FDA – Food and Drug Administration (США), ISO – Міжнародна організація стандартизації, GMP. Методика рекомендована Європейською та Американською асоціаціями тканинних банків та полягає в термообробці кісткової тканини при температурі до 82,5 °С протягом 94 хвилин. Трансплантат представлений головою стегнової кістки, взятою у живих донорів при ендопротезуванні кульшового суглоба. Валідація ефективності технології «локального кісткового банку» щодо інактивації збудників інфекційних захворювань проведена щодо вірусів (ВІЛ, гепатити А, В, С, цитомегаловірус, вірус Епштейна-Барра, Т-лімфотропний вірус людини I/II, вірус Західного Нілу, парвовірус, вірус сказу та ін.), бактерій, що можуть передаватися через біологічні тканини та таких збудників, як бліда трепонема, малярійний плазмодій, трипаносома, мікрофілярій, пріони. Перевагами даної технології є відносна простота у експлуатації, використання матеріалу від живих донорів, гарантована безпечність трансплантату (стерильність, анімуногенність), відсутність необхідності у додатковій обробці кісткового матеріалу (ліофілізація, хімічна обробка), можливість тривалого зберігання трансплантатів у низькотемпературних холодильниках (при температурі -40 протягом 2 років) та транспортування до інших лікувальних закладів України (протягом 20 годин).

Клінічне застосування імплантаційного дегідратованого кісткового біоматеріалу алогенного походження у вигляді порошку



Воронцов П. М., Гусак В. С., Сльота О. М., Баєв В. В.
ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України», Харків, Україна

Актуальність роботи обумовлена поширенням дегенеративно-дистрофічних захворювань хребта та суглобів, що потребують хірургічного лікування, а також збільшенням кількості хворих із кістковими дефектами різного генезу (після травм, пухлин, кіст, фіброзних дисплазій та ін.), які потребують використання кістково-пластичних матеріалів.

МЕТА – показати результати клінічного застосування імплантаційного дегідратованого кісткового біоматеріалу алогенного походження у вигляді порошку.

В «Інституті патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України» були розроблені технічні умови і запатентовані оригінальні способи виготовлення біоматеріалу із кісткової тканини. Дані алотрансплантати є кістковими фрагментами різних розмірів, від об'ємних (кортикальних та кортикально-губчастих) до порошкоподібних.

Методика включає процеси фізичної та хімічної обробки кісткового матеріалу, що забезпечують повну елімінацію як інфекційних агентів (мікроорганізми, віруси), так і аутоімунних чинників. Подальше насичення кісткових трансплантатів біологічно активними речовинами і лікарськими засобами дозволяє створювати препарати спрямованої терапевтичної дії.

В даній роботі приведено приклад клінічного застосування імплантаційного дегідратованого кісткового біоматеріалу алогенного походження у вигляді порошку.

У клініці використовують кістковий порошок як окремо, так і в поєднанні з збагаченим тромбоцитами фібрином (Platelet Rich Fibrin – PRF), збагаченою тромбоцитами плазмою (Platelet Rich Plasma – PRP), які являють собою аутогенне джерело факторів росту, стовбуровими клітинами та іншими біологічно активними речовинами. Тому проведення досліджень в даній області є актуальним в сучасній травматології та ортопедії.

Першим етапом є підготовка дефекту кістки, що утворився в результаті порушення процесів регенерації, захворювань, резекцій кістки, підготовка для розміщення в ньому імплантаційного дегідратованого біоматеріалу в суміші з рідким фібрином, а також оцінка форми та розмірів порожнини, яку необхідно заповнити, та кількості композиційного біоматеріалу В умовах операційної збагачений факторами росту фібрин пацієнта за допомогою центрифугування. Збагачений факторами росту аутофібрин змішують з імплантаційним дегідратованим біоматеріалом у вигляді порошку до отримання пастоподібної консистенції. Матеріал готовий до застосування. Операцію виконують у стандартний спосіб, який відрізняється тим, що після кюретажу кісткової порожнини, дефект заповнюється вищевказаним біокомпонентним матеріалом.

Перевагою застосування імплантаційного дегідратованого кісткового біоматеріалу алогенного походження у вигляді порошку у суміші з рідким аутофібрином пацієнта є можливість заповнення порожнин між об'ємними імплантатами та материнським ложем, попередження утворенню щільної сполучної тканини і сприяння проліферації кісткової тканини з перших днів після хірургічного втручання. Також використання порошку у суміші з рідким аутофібрином дозволить ініціювати судинну проліферацію, наближену до природньої, після насичення факторами росту.

Можливості використання біоактивної кераміки в травматології та ортопедії



Ульянчич Н. В., Коломієць В. В.

Інститут проблем матеріалознавства ім. І. М. Францевича НАН України, Київ, Україна

Найбільш біосумісним синтетичним матеріалом, який використовується при пластиці кісткової тканини, вважається біоактивна кераміка (БК) на основі фосфатів кальцію. Ця кераміка складається з елементів, що входять в структуру кісткової тканини. Деградуєчи в біологічному середовищі і виділяючи в зону дефекту іони кальцію і фосфату, біоактивна кераміка пролонговано сприяє репаративним процесам в кістковій тканині, поступово заміщуючись повноцінним регенератом. Завдяки високій біосумісності БК можна використовувати і для імплантації в м'які тканини. Наприклад, орбітальні імпланти, носії лікарських засобів для локальної і пролонгованої їх дії, підшкірні імпланти для постійних ін'єкцій та ін. На відміну від трансплантатів вироби з БК мають досить широкий спектр властивостей, який дає можливість успішно використовувати їх в різних клінічних випадках. Розроблено ряд матеріалів, що відрізняються структурними, морфологічними і функціональними характеристиками, змінюючи які можна отримати вироби з різним ступенем резорбції з посиленними остеоіндуктивними властивостями і навіть остеоіндуктивними властивостями, різними механічними властивостями. Отримано матеріал, який володіє антисептичними властивостями без застосування антибіотиків. Розроблено, досліджено та впроваджено в клінічну практику порошок гранули, і вироби з БК для різного клінічного застосування. Для забезпечення міцної й довгострокової фіксації титанових імплантатів в кістці, розроблені покриття з біоактивної кераміки з різними прошарками та з асептичними властивостями.

З розвитком технологій створення синтетичних біоматеріалів в області біоматеріалознавства відбулося зміщення акцентів від завдання з досягнення біоінертності до стимулювання конкретних клітинних реакцій на молекулярному рівні. В регенеративній медицині вдалою альтернативою алотрансплантату є БК, яка повинна забезпечити місце для закріплення й розвитку живих клітин, васкуляризацію, дифузію поживних речовин, що можливо завдяки технологічності її використання та регулюванні властивостей.

Застосування біокераміки у комбінації з сингенними мезенхімальними стромальними клітинами кісткового мозку для заміщення дефектів кістки у кролів



Рубленко М. В.¹, Андрієць В. Г.¹, Ульянчич Н. В.², Коломієць В. В.², Васильєв Р. Г.^{3,4}, Зубов Д. О.^{3,4}

¹Інститут матеріалознавства ім. Францевича НАН, Київ, Україна

²Білоцерківський НАУ, Біла Церква, Україна

³ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

⁴Медична компанія ілава®, Київ, Україна

Для усунення кісткових дефектів разом із «золотим стандартом» – аутологічної кістковою пластикою, в світі активно використовують інноваційний метод тканинної інженерії з застосуванням живого еквіваленту кістки. Згідно цього методу пористий біосумісний матрикс, заселений *ex vivo* мезенхімальними мультипотентними стромальними клітинами (ММСК) пацієнта, інкубують *in vitro*, а потім трансплантують у кістковий дефект, де він запускає процеси репаративного остеогенезу з поступовим ремоделюванням трансплантату до повноцінної кістки.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Дослідження ефективності застосування живого еквіваленту кістки проводили на кролях (n = 15) 5-ти місячного віку, яким моделювали дірчастий перелом променевої кістки (d = 3 мм). Тварин розділили на 3 групи. Кролям першої групи дефекти заповнювали гранулами біфазної біоактивної кераміки (ГТ-500) у комбінації з культивованими сингенними ММСК (кММСК) одержаними з кісткового мозку. Кролям другої групи застосовували наноструктуровану однофазну кераміку (ГН-1) у комбінації з кММСК. У третій групі дефекти заповнювалися лише кММСК у фібриновому гідрогелі. Подальший перебіг процесів регенерації кістки оцінювали за допомогою патоморфологічного аналізу на 18-ту, 30-ту та 40-ту добу.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ. Патоморфологічні дослідження показали, що у кролів першої групи (ГТ-500 + кММСК) дефект був повністю заповнений кістковою тканиною. Фрагменти материнської кістки мали ознаки післятравматичної перебудови. Тут відмічали розширення судинних каналів, які локалізувалися між балками новоутвореної кісткової тканини. У міжтрабекулярних просторах відмічали наявність червоного кісткового мозку з великою кількістю клітин остеобластичного диферону.

У кролів другої групи (ГН-1 + кММСК) також відмічали виражене визрівання кісткового регенерату, що відбувалося, ймовірно, за рахунок проліферації та подальшого остеогенного диференціювання клітин ендосту і періосту. В центральних ділянках відмічали формування кісткового органічного матриксу у вигляді чітко орієнтованих і впорядкованих колагенових волокон із сформованими розширеними просвітами кровеносних судин. При дослідженні в поляризованому світлі в кісткових трабекулах виявляли оформлені остеодні конструкції, що мали рівномірні концентричні лінії склеювання з розташованими поміж них остеоцитами.

У кролів третьої групи кістковий регенерат заповнював майже увесь об'єм дефекту. Разом з цим, у центрі регенерату часто виявлялися розширені кісткові канали, заповнені пухкою волокнистою оформленою сполучною тканиною з формуванням тонкостінних гемокапілярів. Щільний органічний матрикс по периферії кісткових трабекул був представлений «молодим» колагеном, а в центральних зонах кісткових трабекул – білковими масами – залишками фібринового гідрогелю, в якому знаходилися трансплантовані клітини.

Таким чином, комбінації остеопластичних матеріалів у формі ГТ-500 + кММСК та ГН-1 + кММСК, формуючи мінеральний матрикс, сприяють прискоренню регенерації на ранніх етапах загоєння кісткових дефектів за рахунок збільшення кількості клітинних елементів як остеобластичного, так і остеокластичного клітинних диферонів.

Оценка миграции мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток при контакте с синтетическими фосфатами кальция

Литвинова Л. С.¹, Шуплецова В. В.¹, Хазиахматова О. Г.¹, Юрова К. А.¹, Малащенко В. В.¹, Тодосенко Н. М.¹, Хлусова М. Ю.², Шаркеев Ю. П.^{3,4}, Комарова Е. Г.⁴, Седелникова М. Б.⁴, Чайкина М. В.⁵, Хлусов И. А.^{1,2}

¹Лаборатория иммунологии и клеточных биотехнологий БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия

²СибГМУ, Томск, Россия

³ТПУ, Томск, Россия

⁴ИФПМ СО РАН, Томск, Россия

⁵ИХТТМ СО РАН, Новосибирск, Россия

Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) способны мигрировать в участки воспаления, в том числе в зону ремоделирования костной ткани, характеризующуюся высвобождением продуктов деструкции, ионов и частиц гидроксиапатита (ГАП) [Lepik K. V. et al., 2016]. Благодаря современным методам непрерывного мониторинга клеток можно оценить миграцию ММСК при воздействии различных раздражителей [Teng Z. et al., 2013].

Целью работы явилось исследование процессов миграции ММСК жировой ткани (ММСК-ЖТ) человека при *in vitro* моделировании прямого контакта с ГАП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Порошок синтетического ГАП с диаметром нанокристаллитов 10–30 нм получен механохимическим способом в планетарной мельнице [Chaikina M. V. et al., 2008]. Влияние наночастиц ГАП на миграцию ММСК-ЖТ через микроотверстия (диаметр 8 мкм) в полимерной мембране осуществляли с помощью специализированных 16-луночных CIM-планшетов xCELLigence RTCA DP системы (Roche Applied Science, Канада), позволяющих фиксировать динамическое изменение импеданса с вычислением клеточного индекса, прямо коррелирующего с числом и площадью контакта прилипших к электроду клеток.

В нижнюю камеру помещали наночастицы ГАП (1 мг/мл) в стандартной культуральной среде (СКС). Контролем служила СКС без ГАП. После калибровки прибора в верхнюю камеру CIM-планшета добавляли ММСК-ЖТ ($4 \cdot 10^4$) в СКС, инкубировали 10 мин в CO₂-инкубаторе и устанавливали в RTCA DP Analyzer. Сигналы для определения индекса клеточной миграции (ИКМ) с помощью программного обеспечения RTCA Software фиксировали каждые 15 мин в течение 25 ч. Анализ полученных данных производили с помощью программы «STATISTICA for Windows 10.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Динамика миграции ММСК-ЖТ через пористую мембрану, имитирующую строение сосудистой стенки кровеносных сосудов, в контрольной культуре описывается логарифмической кривой ($R^2 = 0,93$) с постепенным насыщением показателей ИКМ после 2,5 ч наблюдения. Выявлено 2 участка с линейной зависимостью показателя: первый участок ($R^2 = 0,99$) характеризуется быстрым приростом ИКМ (0,13 у.е. в час); на втором участке ($R^2 = 0,97$) скорость прироста ИКМ равна 0,01 у.е. Вероятно, первый участок ИКМ связан с инвазией ММСК-ЖТ через микропоры полимерной мембраны, моделирующей эмиграцию подвижных клеток из микроциркуляторного русла в ткани. Второй участок может быть обусловлен расплыванием ММСК-ЖТ на поверхности электродов.

ИКМ в группе ММСК-ЖТ+ГАП, моделирующей хемотаксис ММСК-ЖТ в зону ремоделирования костной ткани, характеризующуюся высвобождением продуктов деструкции, достоверно (в 1,5 раза, $p < 0,001$) снижался на всех участках наблюдения. Таким образом, при прямом контакте с наночастицами синтетического ГАП подвижность ММСК-ЖТ снижается.

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФ (проект 16-15-10031, сравнительный анализ результатов культивирования клеток) и РФФИ (проект 15-03-07659, изготовление и тестирование физико-химических свойств материалов для культивирования клеток).

Влияние биополимерных матриц из белков фибрина и серицина на рост и жизнеспособность мезенхимальных стволовых клеток (МСК) костного мозга человека в культуре

Щегельская Е. А.¹, Омельченко Е. А.², Пяткоп В. А.¹

¹Харьковский национальный медицинский университет, Харьков, Украина

²Лаборатория молекулярной диагностики и клеточных технологий ООО «Вирола», Харьков, Украина

Одной из задач тканевой инженерии является разработка технологий получения искусственных тканевых конструкций на основе биополимеров и заключенных в них МСК и их производных. Биополимеры, отбираемые для таких конструкций должны быть нетоксичны для клеток и тканей, не изменять фенотип заключенных в них клеток, сохранять форму матрицы, биodeградировать через определенное время инкубации в организме. Перспективными претендентами на роль натуральных биополимеров для конструирования тканевых матриц являются белок фибрин и белок коконов тутового шелкопряда серицин.

ЦЕЛЮ данной работы являлось сравнительное изучение влияния фибриновых, серициновых и фибриново-серициновых матриц на рост и жизнеспособность МСК костного мозга человека в культуре. ▣

Матеріал і методи. Фибринові матриці отримували шляхом інкубації плазми крові людини з іонами кальцію. Серицин виділяли з свіжих коконових тутових шовкопрядів в результаті 2-х годинного кип'ятіння в дистильованій воді, фільтрації та упарювання отриманого розчину білка. Фибриново-серицинові матриці отримували після додавання к суміші плазми крові з серицином (1:1) 0,3 % хлориду кальцію. Деконсервовані МСК кісткового мозку людини розсеивали в 12-годинні культуральні планшети по 40 тис. клітин/лунку та культивували в середі DMEM/F12 (1:1) з додаванням 10 % FBS та 2mM L-glutamine (*Sigma-Aldrich*, США). Через сутки лунки з клітками розділяли на 4 групи: К – МСК без додавання матриці; О1 – МСК + фибринова матриця; О2 – МСК + фибриново-серицинова матриця, О3 – МСК + серицинова матриця. Розмір кожної матриці в лунці становив приблизно 4x4x8 мм. Кількість клітин в лунках та їх життєспроможність оцінювали через 3 та 6 днів після початку інкубації з матрицями. В кожній групі оцінювали по 12 однакових варіантів. Крім того, визначали зміну розмірів матриць в ході інкубації.

Результати дослідження. Морфологічні характеристики МСК в усіх групах та контролі в ході експерименту не змінилися. Встановлено, що кількість клітин в О1 вже через 3 дні була на 25 % вище, ніж в контролі, що свідчить про стимулюючий вплив фибринової матриці на ріст МСК в культурі. Во всіх варіантах О1 було виявлено зменшення розміру фибринової матриці майже в 2 рази в результаті інкубації. Фибриново-серицинова матриця (О2) зберігала свій розмір в ході культивування та не впливала на швидкість росту МСК порівняно з контролем. В О3 виявлено незначальне зменшення кількості клітин во всіх варіантах (10 %) порівняно з К, зміна форми та частинна резорбція серицинової матриці через 6 днів культивування. Таким чином, встановлено, що серицин певною мірою гальмує ділення МСК в культурі, а серицинова матриця без фибринового каркасу не зберігає форму. Во всіх групах життєспроможність клітин не відрізнялася від контролю та становила 96-98 %.

Висновки. Показано, що найбільш оптимальною для створення тканингових конструкцій є фибриново-серицинова матриця, яка не є цитотоксичною для МСК, не впливає на швидкість росту клітин та їх фенотип та добре зберігає форму та розмір при інкубації в культурі.

Метод тестування сумісності матеріалу ортопедичних імплантів з організмом реципієнта за допомогою атомно-силової мікроскопії (АСМ)



Бойко І. В.¹, Зафт В. Б.¹, Лазаренко Г. О.¹, Лазаренко О. М.¹, Алексєєва Т. А.², Картель М. Т.², Литвин П. Л.³

¹ДНУ «Науково-практичний центр профілактичної та клінічної медицини» Державного управління справами, Київ, Україна

²Інститут хімії поверхні ім. О. О. Чуйки НАН України, Київ, Україна

³Інститут фізики напівпровідників ім. В. Є. Лашкарьова НАН України, Київ, Україна

Різноманітність реакції тканин реципієнта на чужорідне тіло, яке вноситься в організм, залежить від його імунного статусу, а особливе значення має первинна реакція клітин організму на поверхню імплантів. Розвиток сучасних високотехнологічних галузей медицини, у тому числі ортопедії, травматології, висуває високі вимоги до якості матеріалів. Створення експресного фізичного методу для контролю сумісності матеріалів за прямими показниками є вкрай необхідним. Більше того, можливість індивідуального підбору матеріалів з урахуванням імунного стану організму реципієнта піднімає задачу сертифікації матеріалів на якісно новий рівень. Метою даного дослідження було встановити можливість застосування атомно-силового мікроскопу (АСМ) для передбачення реакції організму на імплантат.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ На сьогодні доступним є ряд методів для досліджень внутрішніх та міжмолекулярних сил, які діють між біомолекулами. Найбільш ефективними інструментами для досліджень є АСМ. АСМ дослідження біоадгезійної сили відриву проводилися на скануючому зондовому мікроскопі Dimension 3000 NanoScopella (*Veeco corp.*) як на повітрі, так і в рідині. У клінічні випробування були включені пацієнти, яким було показано встановлення імплантів згідно протоколів лікування.

Перед операцією у хворих забирали 5 мл крові, з сироватки якої за стандартною методикою виділяли сумарні IgG. Після очищення та розведення до відповідної концентрації, 2 мкг/мл, IgG наносили на зонд АСМ, технологія описана в методичній рекомендації «Клінічне застосування тестування хірургічних імплантів на біосумісність з організмом реципієнта» 210.14/77.15.

Зондами з нанесеними IgG пацієнта проводили тестування на сумісність матеріалу імплантату з організмом хворого. Значення сили утримання зонду з IgG реципієнта поверхню імплантату вважали за оцінку сумісності матеріалу з організмом пацієнта. Чим вище було значення сили утримання, тим імовірнішим був розвиток реакції відторгнення імплантату організмом.

РЕЗУЛЬТАТИ За результатами тестування за допомогою АСМ було встановлено, що сили утримання IgG на поверхні протезу значно перевищують силу утримання поверхню без IgG (34-56 нН проти 5-8 нН відповідно). Згідно гематологічних досліджень видно, що визначається напруження імунної системи організму після встановлення імпланту. Згідно клінічним спостереженням, у віддаленому періоді у 8 з 11 (73 %) пацієнтів через три місяці виникли скарги на біль в області встановлення імплантату.

ВИСНОВКИ Розроблений підхід для вирішення завдання індивідуального прогнозування ступеня сумісності матеріалів імплантів із організмом реципієнта на основі нанобіосенсорів контрольованих апаратно-програмним комплексом АСМ є доцільним та актуальним. На сьогодні застосування та розробка оптимальних умов для АСМ-тестування суттєво підвищують ефективність хірургічного лікування захворювань опорно-рухового апарату шляхом підбору/вибору оптимально сумісних з організмом реципієнта імплантів.

Можливості дослідження репаративної регенерації за допомогою мікро-КТ

Кустрьо Т. В.¹, Копчак А. В.¹, Zsuzsanna Helyes², Чепурний Ю. В.¹, Черногорський Д. М.¹, Tamas Kiss²
¹Кафедра стоматології Інституту післядипломної освіти Національного медичного університету ім. О. О. Богомольця, Україна
²János Szentágothai Research Centre University of Pecs, Hungary

Одним із актуальних питань щелепно-лицевої хірургії є лікування дефектів та деформацій кісток лицевого черепу, спричинених вродженими вадами, травмами, хірургічними втручаннями з приводу новоутворень, остеонекрозів різного генезу тощо. Розробка нових підходів та техніки заміщення кісткових дефектів вимагає фундаментальних знань та розуміння механізмів регенерації кісткової тканини щелеп. Для дослідження регенераторних процесів кісткової тканини в зоні дефекту використовують різні підходи, включаючи гістологію, гістоморфометрію, імуногістохімію, скануючу електронну мікроскопію, звичайне рентгенологічне дослідження тощо. Однак більшість з них пов'язані з руйнуванням зразків і мають суттєві обмеження до використання. В останні роки для вивчення стану кісткової тканини в експериментальних дослідженнях використовують метод мікрокомп'ютерної томографії (мікро-КТ). За її допомогою стає можливим вивчення структурних характеристик кісткової тканини на мікрорівні та проведення 3-D аналізу мікроархітекtonіки кісткового регенерату.

МЕТА. Метою даного дослідження є вивчення процесів регенерації кісткової тканини нижньої щелепи в експерименті та визначення структурних властивостей регенерату за допомогою мікро-КТ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. В експерименті на 20 щурах лінії Wistar було відтворено наскрізні дірчасті дефекти в ділянці лівого кута нижньої щелепи діаметром 2 мм. Дослідження процесів репаративної регенерації проводили з використання мікро-КТ (Skyscan 1176) з роздільною здатністю 8,74 мкм. В строки 3 тижнів, 6 тижнів, 3 місяці та 6 місяців проведено дослідження процесів репаративної регенерації наскрізних кісткових дефектів створених в ділянці лівого кута нижньої щелепи. Експериментальні зразки було проаналізовано з використанням мікро-КТ (Skyscan 1176) з роздільною здатністю 8,74 мкм. З метою дослідження процесів репаративної регенерації в зоні кісткового дефекту та структурних властивостей кісткового регенерату було проаналізовано 15 параметрів, які характеризували щільність кісткової тканини, об'єм регенерату та ступінь його структурної однорідності. Статистичний аналіз було проведено за допомогою ANOVA тесту та з використанням порівняльного аналізу методом Бонффероні. Рівень статистичної достовірності був встановлений на рівні $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТИ. Аналіз отриманих за допомогою мікро-КТ даних виявив значну індивідуальну варіативність результатів, що відобразило різні варіанти перебігу репаративної регенерації. При цьому визначена чітка тенденція до збільшення об'єму кісткової тканини в досліджуваних зразках з 1,2 до 3 мм³. Заповнення кісткового дефекту в термін 3 тижнів сягало 10 % та 90 % в термін 6 місяців, проте повного заміщення кісткового дефекту не спостерігалось. По мірі збільшення об'єму відмічається збільшення мінеральної щільності кістки. Показник співвідношення площі кісткової тканини до її об'єму в термін 3 тижнів становив близько 30 мм⁻¹, в термін 6 місяців він становив 15 мм⁻¹.

ВИСНОВОК. Використання мікро-КТ дозволяє з високою точністю візуалізувати структурні характеристики кісткового регенерату та на етапі інтерпретації даних КТ пацієнтів оцінити перебіг регенераторного процесу, що є важливим для клінічної оцінки динаміки репаративної регенерації та визначення відхилень від її норми при заміщенні великих кісткових дефектів нижньої щелепи.

The development of functionalized scaffold for extracellular matrix replacement therapy of chronic wounds

Покхолєнко Іа.^{1,2}, Топорова О.^{1,2}, Рymar С.^{1,2}, Шувалова Н.², Іgnatchenko P.², Moshynets O.¹, Kyryk V.², Dubey I.¹, Kordium V.^{1,2}
¹The Institute of Molecular Biology and Genetics NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine
²The State Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

BACKGROUND. Chronic wounds are the wounds that show no tendency to heal after at least 3 month of appropriate treatment. The wounds impose significant challenge to healthcare system. Only in the USA, chronic wounds are reported to affect 6.5 million patients with more than US \$25 billion each year spent by the healthcare system on treating wound-related complications [Järbrink, K. *et al.*]. The existing therapeutic protocols frequently demonstrate poor efficiency especially if case of bacterial infection of the wound. The bacteria frequently form a firm biofilm on the wound surface, which protect them from antibiotics and host immune defense. In addition, it is worth mentioning that this type of wounds is usually characterized by prolonged inflammatory phase, slow formation of extracellular matrix, and decreased level of epithelization, poorly responding, and mostly senescent wound cells.

AIM. Present study focuses on the development and characterization of the functionalized biodegradable collagen scaffolds for *in vivo* delivery of SDF-1 α and polyhexamethylene guanidine hydrochloride (PHMG) as a biocide.

METHODS. The polymer was prepared by cross-linking of heparin by adipic dihydrazide in presence of EDC carbodiimide. The scaffolds were prepared by freeze-drying collagen I solution containing the polymer developed or PHMG. The retention of biological activity of hSDF-1 α , incorporated in developed affinity-based delivery systems, was tested *in vitro* by peripheral blood lymphocyte migration assay. The scaffolds structure was analyzed by SEM. hWJ-MSCs were isolated according to the protocol described earlier. The expression of CD105, CD90, CD73 on hWJ-MSCs, and CD73, CD44, CD45, CD34 on mMSCs was studied by FACS-analysis. The recruitment of MSCs, targeted by the developed scaffold, was studied in allogeneic transplantation murine model. Briefly the bone marrow MSCs were isolated from FVB-CgTg(GFPU)5Nagy/J mice and administered into tail vein of ICR mice, implanted with developed scaffold loaded with hSDF-1 α . The implants were removed 7 days later for the analysis. ■

RESULTS. The data obtained by SEM and CSLM analysis revealed that the scaffolds mainly have a layered structure with pores (from 76 to 150 μm) forming a connection between the layers. The developed functionalized scaffolds were able to incorporate hSDF-1 α and support its prolonged release *in vitro* (at least up to 3 days). The maximum binding capacity under conditions studied was $14.83 \pm 3.4 \mu\text{g}$ of SDF1 α /CXCL12 per 1 mg of the polymer. The protein, incorporated into the scaffolds, retained its biological activity *in vitro*. The data obtained in the model of allogeneic transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. The hWJ-MSCs adhesion on the developed functionalized scaffolds, loaded with hSDF-1 α , was moderately higher comparing to the adhesion on empty vehicle. On the first day of culture, the distribution pattern of the cells, seeded on the hSDF-1 α loaded scaffold, also was different comparing to the cells, seeded on empty scaffold. hWJ-MSCs appeared to form the cell groups in the vicinity of polymer particles, within the hSDF-1 α loaded scaffold. On the contrary, hWJ-MSCs demonstrated basically uniform distribution on the outer surface of empty scaffold. By 7 day of culture, the distribution pattern was almost uniform in both variants, with higher density of cells in hSDF-1 α loaded scaffold. The data obtained revealed that the scaffold loaded with SDF-1 α could induce targeted migration of the stem cells into the place of implantation. Comparable effects have been demonstrated in a xenogeneic transplantation model. The developed scaffold with PHMG reduced microbial growth of *E.coli* strain DH10B.

Досвід застосування біорегуляторів стовбурових та прогеніторних клітин при термічному пошкодженні шкіри у щурів



Черкашина Д. В., Ревенко О. Б., Оченашко О. В., Семенченко О. А., Рогульська О. Ю., Петренко О. Ю.
 Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, Харків, Україна

Пошук ефективних методів лікування термічних пошкоджень є актуальною проблемою сучасної комбустіології та біомедицини. З метою відновлення цілісності шкірних покривів використовують як синтетичні замітники шкіри, так і біологічні покриття, зокрема клітинні препарати. У цьому переліку мезенхімальні стромальні клітини (МСК) є майже найефективнішим методом лікування ран, але отримання необхідної кількості цих клітин вимагає певного часу. Альтернативою цьому підходу, а скоріше «швидкою допомогою», що може бути застосована на ранніх етапах після травми, уявляються безклітинні біорегулятори стовбурових та прогеніторних клітин (БСПК), широкий спектр яких продукують саме МСК. Найбільш перспективним джерелом БСПК є кондиційні середовища (КС), що отримують під час культивування МСК.

МЕТА – вивчити вплив МСК та БСПК, що ними продукуються, на перебіг процесу загоєння опіку у щурів, а також їхню здатність впливати на регенераторний потенціал та імунну відповідь організму реципієнта при нанесенні різних покриттів або алотрансплантації шкірного фрагменту.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ. МСК дерми людини одержували після письмової згоди проінформованих донорів. Аlogenні фетальні МСК отримували на 12-14 добу гестації у щурів. Усі стромальні клітини виділяли та культивували за стандартних умов. Екстракт фетальних МСК отримували шляхом циклічного заморожування-відігріву суспензії клітин. Для колекціонування КС на 5-7 пасажі культивування МСК дерми дорослої людини проводили заміну живильного середовища на мінімальне на 24 год. Зібрані КС концентрували та знесолювали за допомогою селективних фільтрів Amicon Ultra (Merck-Millipore, Ірландія). Глибокий опік у щурів формували за стандартним методом із використанням розігрітої до 200 °С мідної пластинки (2,5x2,5 см). Усі маніпуляції, пов'язані з нанесенням або введенням БСПК, проводили через 24 год після пошкодження.

РЕЗУЛЬТАТИ. Було проведено три серії експериментів *in vivo*. На першому етапі на зону опіків наносили БСПК у складі фетальних МСК та їхнього екстракту, змішані із метилцелюлозним гелем. Спонтанне загоєння у тварин контрольної групи протікало повільно та не завершувалось до кінця експерименту. Нанесення МСК стимулювало репаративні процеси до повного закриття ранового дефекту вже на 14-у добу спостережень, що супроводжувалось суттєвим послабленням інтенсивності як локального, так і загального запального процесу. Дія екстракту МСК була односпрямованою з клітинами, але менш виразною.

На другому етапі було вивчено здатність БСПК у складі КС, отриманих під час культивування МСК, впливати на загоєння термічного пошкодження шкіри у щурів. У роботі було використано біосумісний носій – гіалуронову кислоту, як препарат порівняння було обрано гель «Пантестин-Дарниця». Встановлено, що присутність БСПК у концентрації 25 мкг/г носія підвищувала швидкість та якість загоєння опіків, сприяючи повноцінному відновленню всіх шарів шкіри. Під впливом біорегуляторів значно зменшувалась інтенсивність локальної запальної реакції на тлі короткострокового підвищення загальної неспецифічної імунної відповіді та ініціювався швидший перехід від деструктивних процесів до репаративних.

На останньому етапі експериментів тваринам із опіком робили перехресну алотрансплантацію шкірного фрагменту до зони пошкодження, супроводжуючи її локальним введенням БСПК у складі КС. Показано, що такий підхід сприяє прискоренню загоєння, послаблюючи локальні та загальні запальні процеси та підвищуючи імунотолерантність щодо трансплантату.

ВИСНОВКИ. Таким чином, використання БСПК у складі КС є перспективним підходом для корекції пошкоджень шкіри, однак існує необхідність ретельного вибору їхньої оптимальної дози, яка, вочевидь, може коливатися у значних межах у залежності від етіології дефекту, а також фази деструктивно-репаративних процесів.

Можливості підвищення репаративного потенціалу шкіри для лікування опіків: дані клінічного дослідження

Козинець Г. П.¹, Воронін А. В.², Коваленко О. М.³, Циганков В. П.², Олійник Н. М.^{1,4}, Зубов Д. О.^{4,5}, Васильєв Р. Г.^{4,5}

¹Національна медична академія післядипломної освіти ім. П. Л. Шупика, Київ, Україна

²Київська міська клінічна лікарня № 2, Київ, Україна

³Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, Київ, Україна

⁴Медична компанія ilaya®, Київ, Україна

⁵ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

Прогрес у реаніматології, нові знання про патогенез опікової хвороби дозволяють лікувати хворих з поширеними опіками, але їхнє лікування потребує вирішення проблеми дефіциту ресурсів шкіри. Мета роботи полягає у вивченні безпеки та клінічної ефективності застосування алогенних культивованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин з жирової тканини людини (ММСК-ЖТ) при аутодермопластиці у пацієнтів з опіками ІА,Б-ІІІ ступеня. Показником ефективності є динаміка перебігу ранового процесу у фазі проліферації після висічення некротичних тканин із ран при використанні тканинно-інженерного покриття (ТІП) на основі фібринопохідного гідрогелю з алогенними культивованими ММСК-ЖТ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Клінічне дослідження виконано із залученням 20-х хворих з опіковою травмою площею від 10 до 30 % поверхні тіла і глибиною ІА,Б-ІІІ ступеня. Основна група – 10 хворих, у яких після висічення некротичних тканин на 2-7-му добу після травми для тимчасового закриття ран застосовано ксенодермопластику, а на 6-10-ту добу – аутодермопластику перфорованими трансплантатами з закриттям клаптів тканинно-інженерним покриттям з алогенними ММСК-ЖТ. Характеристика тканинно-інженерного покриття для поверхневої аплікації: біомедичний препарат алогенних культивованих ММСК-ЖТ у фібринопохідному гідрогелі. Група порівняння – 10 хворих, у яких після висічення некротичних тканин на 2-7-му добу після травми для тимчасового закриття ран виконували ксенодермопластику, а на 6-10 добу – аутодермопластику перфорованим трансплантатом на висічені поверхні з закриттям клаптів штучним покриттям. Досліджували загальноклінічні лабораторні показники, аналізи капілярної крові зони опікової травми, проводили оцінку перебігу ранового процесу, оцінку переносимості досліджуваного ТІП.

РЕЗУЛЬТАТИ. Встановлено, що під час застосування ТІП у хворих основної групи при виконанні аутодермопластику активізувались регенеративні процеси в рані, що дозволило в 1,5 рази пришвидшити епітелізацію перфоративних отворів і в 1,3 рази зменшити зону неприживлення трансплантатів. За рахунок мікробіцидної активності ТІП на 10 % зменшилась кількість інфекційних ускладнень місцевого характеру. Аналіз капілярної крові зони опікової рани свідчив про більш раннє зниження (на $3,0 \pm 0,4$ доби) запальних процесів в зоні враження з залученням в рану нейтрофільних гранулоцитів з підвищеною функціональною активністю. Ускладнень, пов'язаних з використанням ТІП, не виявлено.

ВИСНОВКИ. Клінічним дослідженням підтверджена доцільність застосування біомедичного препарату алогенних культивованих ММСК-ЖТ, який за рахунок продукції цитокінів та факторів росту, котрі стимулюють регенеративні процеси в рані, а також володіють бактерицидними властивостями. Це робить дуже перспективним застосування ТІП в комбустіології при лікуванні хворих з обширними опіками. ММСК-ЖТ забезпечують утворення і проліферацію грануляційної тканини та елементів сполучної тканини за рахунок продукції факторів росту, цитокінів та компонентів позаклітинного матриксу. Використання ТІП при виконанні ранньої аутодермопластику активізує регенеративні процеси в рані за рахунок прискореного формування кровоносних судин та збільшення кількості клітин фібробластичного ряду. Таким чином, використання ТІП є обґрунтованим і необхідним для більш ефективного стимулювання процесів функціональної гісторегенерації, особливо в умовах дефіциту «тканинно-клітинного» резерву організму.

Regenerative medicine approaches to neurosurgery, neurology and neurorehabilitation applications

Grytsyk V. F.¹, Vasylyev R. G.^{1,2}, Rodnichenko A. E.^{1,2}, Zlatska A. V.^{1,2}, Gubar O. S.^{1,2}, Vakar A. V.^{1,2}, Zubov D. A.^{1,2}

¹Medical company ilaya®, Kyiv, Ukraine


²State Institute of Genetic and Regenerative Medicine, National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

³Institute of Molecular Biology and Genetics, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

⁴Kyiv-Sviatoshyn Regional Hospital, Kyiv, Ukraine

AIM. Clinical approbation of regenerative medicine methods for neurosurgery, neurology and neurorehabilitation with use of adult cultured neural crest-derived multipotent stem cells (NC-MSCs).

MATERIALS AND METHODS. Adult neural crest-derived multipotent stem cells were obtained from human hair follicle by explant method and were expanded at large-scale up to a clinically significant number. The resulted cell cultures were examined by flow cytometry and immunocytochemical analysis. Their clonogenic potential, ability to self-renewal and directed multilineal differentiation were also examined.

RESULTS. Cell cultures were isolated from adult human hair follicles. Isolated cells according to morphological, phenotypic and functional criteria satisfied the definition of neural crest-derived multipotent stem cells. They had the phenotype Sox2⁺Sox10⁺Nestin⁺CD73⁺CD90⁺CD105⁺CD140a⁺CD140b⁺CD146⁺CD166⁺CD271⁺CD349⁺CD34⁺CD45⁺CD56⁺HLA-DR⁻, showed high clonogenic potential, ability to self-renewal and directed differentiation into the main derivatives of the neural crest: neurons, Schwann cells, adipocytes and osteoblasts. 

Complex treatment of 10 patients, aged 24-60, suffered from: nerve compression syndrome due to the extrusion of intervertebral discs in cervical and lumbar spine (paravertebral injection, 40 mln. of autologous cultured NC-MSCs) – 3 cases, twice administered allogeneic NC-MSCs – 1 case); severe open bullet and shrapnel vertebral-spinal trauma in the residual period (3 – paravertebral injection, 40 mln. allogeneic NC-MSCs, second injection with 40 mln. autologous cultured NC-MSCs from hair follicle); consequences of severe open head injury with trepanation syndrome (3 – transplantation of 3D tissue-engineered bone equivalent for restoration of calvarial bone defects, autologous NC-MSCs). To assess treatment efficacy we use MRI, spiral CT, electromyography and clinical methods. Observation period consisted of 3-10 months.

Cell therapy for treatment of nerve compression syndrome due to extrusion of intervertebral discs resulted in the relief of pain symptoms and complete regression of neurological deficit over 2-3 weeks. Cell therapy for consequences of traumatic spinal cord injury treatment led to the restoration of sensitivity, the emergence of active movements and increased strength in paretic limbs. Transplantation of 3D tissue engineered bone equivalent caused the complete restoration of the cranial defects filled with newly formed bone over 5 months (according to SCT).

CONCLUSION. Our experience on use of cell therapy and tissue engineering methods in neurosurgery and neurorehabilitation demonstrates the safety and efficacy of these approaches.

Development of the spinal cord injury model in mice

Rybachuk O. A.^{1,2}, Arkhyhchuk I. V.^{1,3}, Lazarenko Yu. A.^{1,3}, Kyryk V. M.², Proshkina I. O.¹, Voitenko N. V.¹, Butenko G. M.²

¹Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²State Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

³National University «Kyiv-Mohyla Academy», Kyiv, Ukraine

Modern researches on new ways for restoration of spinal cord nerve tissue after injuries and, as a result, motor deficits in humans are promising methods for nowadays. However, adequate spinal cord injury models are required in order to reliably compare the effects of various drugs, stem cells, matrices and substances for regeneration. In addition to, these models have to show a clear picture of spontaneous recovery, so that the treatment effectiveness could be investigated.

AIM. To develop hemisection model of spinal cord segments T11-T13 in mice for studying spinal cord nerve tissue spontaneous regeneration and motor functions restoration.

METHODS AND MATERIALS. The animals for experiment were 2-3 months-old male FVB mice, weighting 24-30g. Groups: control 1 had no laminectomy and spinal cord injury (n = 2); control 2 had laminectomy (n = 11); experimental group had laminectomy and hemisection (n = 37). Model – left hemisection of spinal cord in the lower thoracic level (T11-T13). Functional restoration was evaluated by Basso (B) scale for estimating mice locomotion and by Basso-Beattie-Bresnahan (BBB) scale for estimating locomotion. Blind method was used while both tests applying.

RESULTS. After performing of hemisection in mice, complete loss of motor functions of the posterior left limb was observed, during the entire period of observation its function was not completely restored, unlike the function of the posterior right limb that was completely preserved. According to the results of the Basso behavioral test, the restoration of motor functions of the posterior left limb for the first week was 0.1 ± 0.05 points (out of 9 possible), for the 1st month – 0.9 ± 0.11 points, for 2nd month – 1.4 ± 0.18 points, for the 3rd month – 1.8 ± 0.36 points, for the 4th month – 3.3 ± 0.33 points and for the 6th month – 3.3 ± 0.76 points. According to BBB scale, the recovery of motor functions of the posterior left limb for the 1st week was 0.5 ± 0.10 points (out of 21 possible), for the 1st month – 1.9 ± 0.28 points for the 2nd month – 2.3 ± 0.30 points, for the 3rd month – 2.3 ± 0.38 points, for the 4th month – 3.2 points for the 6th month – 3.3 ± 0.76 points. Regarding to control groups, functional disturbances were not observed in any of the experiments with using the B and the BBB scales – the rates corresponded to the maximum scores according to the behavioral tests.

CONCLUSIONS. This model can be used for more detailed clarification of possible mechanisms of nerve tissue damages and studying of its own restorative potential due to endogenous repair factors. In addition, on the other hand, this experimental model will give opportunities to assess the safety and to predict the effectiveness of different therapeutic approaches in the treatment of nervous system pathology, for example, stem cells transplantation from different sources.

Cultivation of murine bone marrow-derived stromal cells with NeuroGel™

Rybachuk O. A.^{1,2}, Lazarenko Yu. A.^{1,3}, Medvedev V.V.^{1,4}, Kyryk V. M.², Yaminsky Yu. Ya.⁵, Voitenko N. V.¹, Tsymbaliuk V. I.^{4,5}

¹Bogomoletz Institute of Physiology NAS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²State Institute of Genetic and Regenerative Medicine of National Academy of Medical Sciences of Ukraine, Kyiv, Ukraine

³National University «Kyiv-Mohyla Academy», Kyiv, Ukraine

⁴Bogomoletz National Medical University, Kyiv, Ukraine

⁵State Institution «Romodanov Neurosurgery Institute, National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine

AIM. To search for properties of bone marrow derived stromal cells cocultivated with NeuroGel™. 

■ METHODS AND MATERIALS. The bone marrow of GFP-positive FVB-Cg-Tg(GFP)5Nagy/J mice, aged 3 month, was the source of cells. We plated $4 \cdot 10^5$ cells/cm² and cultured for 2 weeks, changing the nutrient medium every 3–4 days. Nutrient medium RPMI-1640:DMEM (1:1) contained 15 % fetal bovine serum and 2 mM L-glutamine. BMSCs of second passage were grafted into NeuroGel in two variants: direct injection of cells into dehydrated NeuroGel™ and rehydration of NeuroGel™ in a cell suspension were performed for experimental cultivation of BMSCs with hydrogel. Within 10–14 days after cultivation BMSCs culture and hydrogel fragments with BMSCs were fixed and immunocytochemical analysis was performed. To identify cells there was used a double immunocytochemical staining with following primary antibodies: anti-GFP, anti-Ki-67, anti-NeuN, anti-βIII-tubulin. Optical studies were performed using a laser scanning confocal microscope FluoViewTMFV1000 (Olympus, Japan).

RESULTS. In culture BMSCs have fibroblast-like morphology. Immunophenotyping of BMSCs cultures showed a high level of CD44 (90.2 %) and CD73 (60.1 %) markers expression, middle for CD90 (39.8 %) and low for CD34 (0.4 %) marker. However, expression on CD45 (71.4 %) and CD117 (43.9 %) on cells also persisted for a passage 2. During culture of BMSCs with NeuroGel™ cells maintained their viability throughout the entire period of cultivation. BMSCs after culturing with hydrogel, in both variants, a significant number of Ki-67-positive cells were observed, that indicated preservation of their proliferative activity. The percentage of Ki-67-positive cells after culturing with hydrogel was 25.4 ± 2.3 % (n = 10) (variant of injection) and 28.9 ± 3.2 % (n = 10) (variant of rehydration), in control – 30.1 ± 4.2 % (n = 10) of the total cell number.

In hydrogel fragments, BMSCs also maintained their viability during the period of cocultivation and were Ki-67-positive; but in significantly less number than in culture: 13.7 ± 2.2 % (n = 10) of Ki-67-positive cells inside hydrogel (variant of BMSCs injection into hydrogel) and 18.6 ± 5.6 % (n = 6) (variant of hydrogel rehydration in BMSCs suspension).

It should be noted that in the culture of BMSCs cultivated with hydrogel fragments in both variants, positive immunocytochemical staining for NeuN was not detected. In control cultures of BMSCs, NeuN-positive cells were also not detected.

However, in fragments of hydrogel with grafted BMSCs, in both variants of injection and rehydration, the number of NeuN-positive cells was 63.5 ± 3.1 (n = 23) and 57.0 ± 5.3 (n = 11) respectively. The obtained results indicate that BMSCs with hydrogel have an ability to expression of NeuN as well βIII-tubulin.

CONCLUSIONS. Obtained results provide additional information about possible application of NeuroGel™ implants with grafted stem cells for implantation into damaged area of brain or spinal cord with subsequent enabling of nerve fibers growth, nerve cells regeneration and damaged neural tissue restoration.

Neuroprotective effects of recombinant human leukemia inhibitory factor on mice of different ages with cuprizone model of demyelination



Melnyk N. O.^{1,2}, Labunets I. F.¹, Rodnichenko A. E.¹, Rymar S. E.¹, Utko N. A.¹, Gavrulyk-Skyba G. O.²

¹Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS of Ukraine, Kyiv, Ukraine

²O. O. Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

INTRODUCTION. Multiple sclerosis is one of the most spreading demyelinating disease of the central nervous system (CNS). However, more and more researchers consider multiple sclerosis as a neurodegenerative disease. Although multiple sclerosis generally occurs at younger years, today it can be registered after the age of 45 years. The investigation of age-related peculiarities of multiple sclerosis pathogenesis requires the use of its adequate experimental models. Cuprizone is a copper-chelating agent that in animals (mouse, rat) induces toxic effect on mature myelin-producing oligodendrocytes [Acs *et al.*, 2013]. In addition, the neuroinflammation and oxidative stress in the CNS are the important mechanisms of nerve cell damage in cuprizone model of multiple sclerosis.

OBJECTIVE. Present work was aimed at studying the features of protective influence of recombinant human leukemia inhibitory factor (rhLIF) on structure of neurons central nervous system with involvement of brain macrophages/phagocytic cells and antioxidant enzymes on mice of different ages with an experimental cuprizone model of multiple sclerosis.

METHODS. In 129/Sv mice at 3–5 and 16–17 months of age were assessed motor and emotional activity in «open field» test, activity of brain antioxidant enzymes and macrophages capable to phagocytosis of latex beads. After staining histological sections of brain and spinal cord toluidin blue were determined the percentage of neurons with unmodified, moderate and severe structural changes. Cuprizone was fed daily for 3 weeks. RhLIF injected after 7 days cuprizone diet, daily, 50 µg/kg.

RESULTS. In cuprizone-treated mice of both age groups, increases in the brain and spinal cord the proportions neurons with severe changes. In young animals, which received cuprizone and rhLIF reduces the amount neurons with destructive changes. Such changes under influence of rhLIF slowly in older mice. Cuprizone decreases the amount of crossed squares and fecal boluses in mice of both age groups. The injections of rhLIF restore emotional activity in these mice, but the increase motor activity is observed only in young mice. In brain of cuprizone-treated mice different ages inhibited the activity of catalase and glutathione peroxidase (GP); changes were more pronounced in older mice. The positive effect of rhLIF on GP activity appears only in young mice. Percentage of active macrophages increases in cuprizone-treated mice of both age groups, but their activity is only in 16–17 month-old mice. Inhibition amount and activity of macrophages after injections of the rhLIF presents only for older mice.

CONCLUSION. LIF may be perspective neuroprotective drug in multiple sclerosis. The efficiency of cytokine may improve after use data about its influence peculiarities in aging.

Conditioned medium of fetal brain neurogenic cells reveals immunomodulatory and antitumor properties



Liubich L. D.

SI «Romodanov Neurosurgery Institute, National Academy of Medical Sciences of Ukraine», Kyiv, Ukraine

The immunobiological properties of fetal brain neurogenic cells (FBNC) are an important and insufficiently studied problem, which requires in-depth research to justify and develop the latest approaches to treatment of diseases of the central nervous system. Neurogenic stem / progenitor cells (NSC / NPC) are capable of expressing and producing a fairly wide range of immunologically active molecules that can determine their immunomodulatory effect on cells of the immune system at contact interaction [Ulrich H. et al., 2015; Bacigaluppi M. et al., 2016]. The antitumor properties of NSC/NPC are also studied for the purpose of their application as targeted therapy of malignant brain tumors [Aboody K. S. et al., 2013; Barish M. E. et al., 2017]. The expression and production of NSC / NPC immunoregulatory cytokines and growth factors laid the foundation of the probable mechanism of their action in neurotransplantation – the so-called «bystander» effect [Ottoboni L. et al., 2015; Bacigaluppi M. et al., 2016].

This paper is summing up the results of *in vitro* studies of the effects of rat FBNC conditioned medium (CM) on the cells of immune system and tumor cells of brain glioma.

CM was obtained from suspensions of rat FBNC on 14th day of gestation. Cultures of rat FBNC contained on average 50.0 % nestin⁺ cells, 38.0 % CD133⁺, 77.0 % vimentin⁺, 80.0 % GFAP⁺ cells. The proportion of TGF-β1⁺ cells was on average 22.0 % of the total number of cells in culture, indicating the potential immunomodulatory properties of rat FBNC.

CM affected the production of cytokines by human peripheral blood mononuclear cells: reduced the production of TNF-β and IL-10 (respectively 10 and 6 times) by the mononuclear cells of patients with brain gliomas while production of TNF-α by mononuclear cells of persons of the comparison group decreased 3 times, and IL-1α and IL-10 – increased (respectively 10 and 3 times).

CM revealed the dose-dependent cytotoxic, antimitotic and antiproliferative effects on cultured cells of the brain gliomas. In cultures of human brain gliomas the cytotoxic index after exposure to the CM was on average 34–45 %, mitotic index reduced by 1.6–4 times. After the influence of CM the cells of glioblastomas increased the production of IL-10 (twice), IFN-α (by 14 times) and TNF-α (twice). In cell cultures of rat glioma C6 after exposure to the CM decreased the total number of cells (by 1.7 times), mitotic index (4.4 times), the number of proliferating (Ki-67⁺) tumor cells (2.7 times), CD133⁺ (stem) tumor cells (4 times), TGF-β1⁺ tumor cells (1.7 times), while the number of p53⁺ cells increased by 2 times.

The CM contains fractions including BDNF (115 pg/ml), TGF-β1 (12 pg/ml), IFN-α (7.4 pg/ml), IL-1α (0.9 pg/ml) and IL-4 (1.6 pg/ml). After addition to the glioma C6 cells a mixture of CM and monoclonal antibodies to TGF-β1, the neutralization of the biological effect of the CM occurred, confirming that established *in vitro* anti-tumor effects are implemented by the impact of TGF-β1 which is part of the CM.

The obtained results may become the basis for further researches for the purpose of theoretical substantiation of complex pathogenetic therapy in patients with gliomas in the development of preparations derived from FBNC.

Вплив трансплантації стовбурових клітин на процеси регенерації нервової тканини після ішемічного ушкодження мозку



Скибо Г. Г.^{1,2}, Цупиков О. М.^{1,2}, Торнеро Д.³, Кокайя З.³

¹Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ, Україна,

²ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна,

³Лабораторія стовбурових клітин та регенеративної неврології, Лундський центр стовбурових клітин, Лунд, Швеція

Перше місце серед неврологічних захворювань посідають цереброваскулярні хвороби, серед яких найбільш тяжким вважається мозковий інсульт. Досі ведеться пошук нейропротекторних засобів, здатних впливати на механізми ішемічно-реперфузійних ушкоджень мозку. Останнім часом активно вивчаються можливості застосування клітинної терапії з використанням стовбурових клітин для лікування ішемічних і дегенеративних захворювань нервової системи.

У роботі на експериментальних моделях ішемічного ушкодження головного мозку з використанням сучасних морфологічних, електрофізіологічних і нейроповедінкових методик ми досліджували вплив трансплантації стовбурових клітин різного генезу на процеси регенерації нервової тканини головного мозку та поведінкові феномени в експериментальних тварин.

На моделі глобальної короткотривалої ішемії головного мозку мишей показано, що субокципітально трансплантовані фетальні GFP-позитивні НПК здатні мігрувати в ушкоджені ділянки зони CA1 гіпокампа, диференціюватися як в астроцити, так і в зрілі нейрони з добре розвиненими дендритами і шипиками та виживати у мозку ішемізованих тварин як мінімум 90 діб після трансплантації.

За допомогою ультраструктурного аналізу показано, що субокципітальна або стереотаксична трансплантація GFP-позитивних НПК у мозок ішемізованих тварин сприяла утворенню простих та перфорованих синаптичних контактів між донорськими клітинами та нейронами реципієнта. GFP/DAB-позитивні клітини формували як пост-, так і пресинаптичні структури з GFP/DAB-негативними нейронами.

З використанням імуно-електронно-мікроскопічного аналізу показано, що GFP-негативні аксони реципієнта формують синаптичні контакти на GFP-позитивних трансплантованих нейронах, утворених з індукованих плюрипотентних стовбурових клітин (іПСК) людини, і більшість з цих контактів мають ультраструктурні характеристики збуджуючих глутаматергічних синапсів.

Отже, трансплантація стовбурових клітин може бути перспективною стратегією для лікування наслідків ішемічного ушкодження мозку.

Дослідження ефективності фібринового 3D матриксу як носія та середовища підтримання життєдіяльності нейрональних клітин зони n. raphe в культурі



Васильєва І. Г., Олексенко Н. П., Чопик Н. Г., Галанта О. С., Цюбко О. І., Сніцар Н. Д.
ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України», Київ, Україна

Важливим методичним завданням нейротрансплантології є вирішення проблеми іммобілізації трансплантованих клітин для локалізації в зоні ураження. З цієї точки зору використання 3D матриксів є перспективним напрямком досліджень. Крім звичайних вимог, що висуваються до подібних біоматеріалів (відсутність токсичності, можливість біодеградації) важливими характеристиками для потенціального носія нейроклітин є його вплив на формування інтеграційних міжклітинних зв'язків та зберігання заданих властивостей, зокрема нейромедіаторної специфічності.

В нашій роботі в умовах культивування ми тестували взаємодію фібринового матриксу, отриманого методом PRF (plasma rich fibrin) та суспензії серотонінергічних нейронів зони n. raphe новонародженого щура. Цей метод має такі переваги: аутологічність, що знімає етичні питання, проблеми імуноконфліктів та інфікування; швидкість отримання, можливість надання необхідної форми; низька собівартість.

3D PRF матрикс отримували із зразків крові людини з допомогою активатора згортання. Використовували матрикс різної щільності – високої та низької, вміст тромбоцитів в яких становив 200 та 100 тис. в мкл відповідно. Суспензію нервових клітин головного мозку новонародженого щура зони n. raphe, що містить переважно серотонінергічні нейрони, в різних експериментальних зразках вводили всередину згустку шляхом ін'єкції та наносили на його зовнішню поверхню. Культивування здійснювали протягом 2 тижнів, спостерігаючи за ростом культури з допомогою інвертованого мікроскопу. По закінченні культивування проводили гістохімічну реакцію на виявлення серотонінергічних нейронів за методом Фалька-Хілларпа.

Спостереження за культурою нервових клітин показали, що при нанесенні клітин за зовнішню поверхню 3D PRF матриксу активно формується зона росту, мережа відростків, встановлюються міжклітинні контакти, утворюється конфлюентний шар клітин. При введенні клітин всередину 3D PRF матриксу спостерігається активна міграція клітин на зовнішню поверхню, всередині матриксу клітини формують контакти, мережу відростків, що утворюють нейрітно-гліальні волокна, які проростають назовні, утворюючи щільний шар. В кінці другого тижня був відмічений частковий лізис фібринового матриксу. Візуалізація серотоніну продемонструвала наявність численних клітин, що містять гранули нейромедіатора в самому фібриновому згустку та зоні росту. Вони встановлюють контакти та формують нейромедіаторну мережу.

Ми відмічали чітку різницю в темпах проростання аксонів крізь матрикс в напрямку оточуючих клітин. При використанні 3D матриксу з високою щільністю цей процес відбувається повільніше на 2-3 доби.

Таким чином, наші дослідження продемонстрували, що в результаті використання 3D PRF матриксу формується сприятливе середовище, в якому відсутня токсична дія по відношенню до нервових клітин. Вони активно формують мережу відростків та встановлюють контакти, зберігаючи при цьому нейромедіаторну специфічність. Вважаємо за доцільне продовження вивчення властивостей 3D PRF матриксу як субстрату для трансплантації нервових клітин.

Моделирование нейродегенеративных заболеваний с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток



Лагарькова М. А.
ФГБУ ФНКЦ Физико-химической медицины ФМБА России, Москва, Россия

Нейродегенеративные заболевания, такие как боковой амиотрофический склероз, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона и другие представляют большую группу различных нарушений, которые связаны с постепенной деградацией и гибелью определенных типов нейронов. В большинстве случаев эти нарушения возникают по неизвестным причинам и постоянно прогрессируют. Часть нейродегенеративных заболеваний имеет наследственную форму. Современные лекарственные препараты лишь облегчают часть симптомов, предоставляя ограниченную помощь пациентам. Выяснение причин нейродегенерации и поиск новых лекарств невозможны без создания моделей этих заболеваний.

Многочисленные модели – и животные, и клеточные – создаются и используются в течение последних десятилетий. Модели заболеваний, полученные с помощью индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК), открывают новые возможности для изучения нейродегенеративных заболеваний. Благодаря возможности получения иПСК от любого пациента и способности иПСК к дифференцировке в любой тип клеток, модели на основе иПСК могут быть созданы даже для самой редкой болезни. Дифференцировка специфических функциональных нейральных производных из иПСК имеет принципиальное значение для решения фундаментальных вопросов патогенеза, а также для тестирования новых лекарственных препаратов и в будущем – для продукции адекватного клеточного материала с целью нейротрансплантации. ▣

Современные возможности редактирования генома позволяют проводить коррекцию мутаций в iPSC, полученных из биологического материала пациентов с наследственными формами нейродегенеративных заболеваний, что важно как для получения изогенных систем для моделирования, так и для задач будущей персонализированной терапии. Подход к моделированию заболеваний с помощью iPSC был успешно применен для целого ряда патологий.

Вместе с тем применение этих моделей имеет свои ограничения и сопряжено со значительными трудностями. Во-первых, сложно моделировать многие болезни старческой возрастной группы, такие как болезнь Альцгеймера и болезнь Паркинсона. Другая серьезная проблема изучения патогенеза связана с моделированием болезни на одном типе клеток. Для решения этой задачи необходимо воссоздать *in vitro* возможные взаимодействия различных типов клеток в ткани. Современные технологии культивирования трехмерных многоклеточных органоидов могут помочь в решении этих проблем. Доклад посвящен последним достижениям в области моделирования ряда нейродегенеративных заболеваний с помощью iPSC.

Создание модельной системы для изучения молекулярных механизмов развития болезни Паркинсона на основе дифференцированных производных iPSC пациентов

Лебедева О. С.¹, Некрасов Е. Д.², Сурдина А. В.¹, Васина Е. М.², Позмогова Г. Е.¹, Киселев С. Л.², Иллариошкин С. Н.³, Лагарькова М. А.¹
¹Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Москва, Россия
²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Институт общей генетики им. Н. И. Вавилова Российской академии наук», Москва, Россия
³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр неврологии», Москва, Россия

Болезнь Паркинсона (БП) – прогрессирующее нейродегенеративное заболевание, которое развивается в результате гибели дофаминергических нейронов черной субстанции, что может быть вызвано как факторами внешней среды, так и наследственными факторами. Медикаментозные методы лечения носят лишь паллиативный характер. Часто исследования БП проводят на постмортальных образцах мозга, на животных моделях заболевания и на линиях трансформированных клеток. Однако эти модели не обеспечивают достаточной информации о начальных стадиях болезни, которые имеют место еще до манифестации заболевания. Кроме того, скрининг лекарственных средств на таких моделях затруднен. Для детального изучения закономерностей развития БП требуется разработка адекватных моделей, воспроизводящих генетические и молекулярные особенности патологического процесса.

Решением данной проблемы может быть создание модели заболевания на основе индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (iPSC), полученных с использованием технологии генетического репрограммирования из материала пациентов с наследственными формами БП. Неограниченное время жизни iPSC в культуре, вместе с возможностью направленной дифференцировки в любой желаемый тип клеток, позволяют разрабатывать клеточные модели наследственных заболеваний для изучения особенностей функционирования мутантных генов в клетке и определить механизмы развития заболевания на клеточном уровне.

В ходе работы были получены интеграционным и неинтеграционным методами линии пациент-специфичных iPSC, несущие мутации в генах *PARK2* и *PARK8*, ассоциированных с БП. Проведено изучение влияния интеграционного и неинтеграционного метода репрограммирования фибробластов человека на метилирование ДНК на полногеномном уровне. Показано отсутствие достоверных различий между способами доставки репрессирующих факторов в фибробласты кожи человека. Разработан эффективный и воспроизводимый протокол нейрональной дифференцировки iPSC, который позволяет получать культуру постмитотических нейронов, более чем на 80 % состоящую из тирозингидроксилаза (ТН)-положительных клеток. При анализе транскриптома ТН-положительных нейронов, дифференцированных из iPSC, были показаны специфические для генов *PARK2* и *PARK8* различия в таких клеточных процессах, как развитие нейронов, синтез нейромедиаторов, функционирование фагосом и лизосом, деление клетки и клеточный цикл, функционирование митохондрий, гликолиз.

Таким образом, впервые разработаны системы для изучения функции генов *PARK2* и *PARK8*, позволяющие моделировать развитие патогенеза БП *in vitro*.

Вплив рекомбінантного інтерлейкіна-10 людини на структуру нейронів центральної нервової системи та поведінкові реакції у мишей із купризоновою моделлю розсіяного склерозу

Лабунець І. Ф., Мельник Н. О., Родніченко А. Є., Похолєнко Я. О.
 ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

Регенераторний потенціал стовбурових клітин може змінитись за умов дії цитокінів та ростових факторів. Серед цитокінів привертає увагу інтерлейкін (IL)-10, який виявляє у дорослих тварин протизапальні властивості, впливає на нейрогенез у субвентрикулярній зоні бокових шлуночків головного мозку, виступаючи як ростовий фактор для НСК. ■

К **МЕТА.** Дослідити вплив рекомбінантного IL-10 людини (rhIL-10) на ефективність відновлення структури нейронів головного і спинного мозку та рухової функції у мишей із купризоною моделлю розсіяного склерозу.

МАТЕРІАЛ І МЕТОДИ. Миші-самці лінії 129/Sv (віком 4-5 міс) щоденно впродовж 3-х тижнів отримували з їжею нейротоксин купризон (0,2 % від добового корму). З шостої доби прийому купризону мишам вводили rhIL-10, внутрішньоочеревинно, у дозах 5 мкг/кг та 50 мкг/кг, всього 3 ін'єкції, з інтервалом у 3 доби. Контроль – ін'єкції 0,9 % розчину хлориду натрію мишам із купризоною дієтою. Інтактні тварини знаходились на звичайному раціоні харчування. При морфологічних дослідженнях гістологічні зрізи кори головного мозку, мозочка, поперекового відділу спинного мозку забарвлювали толуїдиновим блакитним (за Нісслем); надалі проводили морфометричний аналіз препаратів, а саме визначали відсоток нейронів без структурних змін, з реактивними (помірними) та деструктивними (виразними) змінами. Поведінкові реакції оцінювали в тесті «відкритого поля».

РЕЗУЛЬТАТИ. 1. Структурні зміни нейронів головного і спинного мозку. Встановлено, що ін'єкції rhIL-10 у дозі 50 мкг/кг позитивно впливають на змінену структуру нейронів за умов прийому купризону. Особливо такий ефект помітний у складі мозочка та спинного мозку. Так, встановлено, що у мозочку контрольних мишей частка нейронів без змін, із помірними або виразними структурними змінами складала відповідно 9 %, 22 % та 69 % (при нормі 86 %, 14 % та 0 %), після введення rhIL-10 – 78 %, 19 % та 3 %, відповідно. У спинному мозку контрольних тварин частка незмінених нейронів, нейронів з помірними та виразними змінами була відповідно 2 %, 4 % та 94 % (при нормі 93 %, 7 %, 0 %), тоді як після введення цитокіну – 78 %, 16 % та 6 %, відповідно. Ефект дози цитокіну 5 мкг/кг був значно слабшим.

2. Поведінкові реакції. При дослідженні горизонтальної рухової активності встановлено, що у тварин, які отримували купризон та ін'єкції rhIL-10, відбувалось менш виразне падіння рухової активності (число пересічених квадратів), ніж у тварин, які отримували лише купризон відносно інтактних тварин (в 2 рази проти 5 разів). Разом з тим, після введення цитокіну рухова активність залишається зниженою відносно інтактної групи.

ВИСНОВКИ. Встановлено дозозалежний відновлюючий ефект rhIL-10 на структуру нейронів головного та спинного мозку молодих мишей, які отримували купризон. Цитокін поліпшує рухову активність піддослідних тварин. Результати можуть бути корисними при розробці підходів та пошуку засобів, що підвищують ефективність клітинної терапії розсіяного склерозу.

Нейропротекторное влияние мелатонина при экспериментальных моделях патологии нервной системы: возможные механизмы



Лабунец И. Ф.¹, Родниченко А. Е.¹, Утко Н. А.¹, Чайковский Ю. Б.^{1,2}, Мельник Н. А.^{1,2}, Пивнева Т. А.^{1,3}, Савосько С. И.², Забенько Л. Ю.³, Демидчук А. С.², Шамало С. Н.², Копьяк Б. С.³, Сагач В. Ф.³, Бутенко Г. М.¹

¹ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН», Киев, Украина

²Национальный медицинский университет им. А. А. Богомольца МОЗ Украины, Киев, Украина

³Институт физиологии им. А. А. Богомольца НАН Украины, Киев, Украина

При клеточной терапии патологий нервной системы актуален поиск подходов и средств, повышающих ее эффективность. Перспективными могут быть средства, влияющие на патогенетические звенья развития патологий (оксидативный стресс, нейровоспаление, иммунные факторы и т. д). Такими свойствами может обладать гормон эпифиза мелатонин [Reiter, 2015].

ЦЕЛЬ. Изучить в эксперименте на моделях патологий центральной и периферической нервной систем нейропротекторный эффект мелатонина; оценить участие факторов нейровоспаления, иммунной системы, антиоксидантной защиты в его реализации.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ. Модель рассеянного склероза получали на взрослых мышах линии 129/Sv ежесдельным приемом с пищей нейротоксина купризона; модель гемипаркинсонизма – на взрослых крысах Вистар стереотаксическим введением в левый пучок переднего мозга нейротоксина 6-гидроксидофамина; модель травмы седалищного нерва – путем его перерезки у взрослых мышей линии FVB. Затем животным внутрибрюшинно вводили мелатонин («Sigma», США) в 18:00 ежедневно (1 мг/кг или 10 мг/кг), до завершения эксперимента. Оценивали структуру нейронов, плотность нервных волокон в нерве, поведенческие реакции в тесте «открытое поле». В головном мозге определяли число CD3⁺, CD4⁺, Mac1⁺ и GFAP⁺-клеток, макрофагов, содержание малонового диальдегида (МДА), активность супероксиддисмутазы (СОД), каталазы, глутатионпероксидазы (ГП) и глутатионредуктазы (ГР); в крови – уровень тимулина. Влияние мелатонина *in vitro* изучали на купризоновой модели демиелинизации аксонов нейронов клеток мозжечка.

РЕЗУЛЬТАТЫ. После приема купризона в головном мозге мышей увеличивается число патологически измененных нейронов, CD3⁺, CD4⁺, Mac1⁺, GFAP⁺ клеток, макрофагов, уровень МДА, а активность СОД, ГП и ГР снижается; у мышей уменьшается двигательная и эмоциональная активность. Инъекции мелатонина улучшают структуру нейронов и поведенческие реакции; растет уровень тимулина; число исследованных типов клеток и уровень МДА снижается, тогда как активность ферментов повышается. После добавления мелатонина в культуру клеток мозжечка растет число миелиновых волокон и Olig2⁺ клеток, которые были значительно снижены под влиянием инкубации с купризоном.

При паркинсонизме увеличивается число патологически измененных нейронов в черной субстанции и спинном мозге; в головном мозге растет число макрофагов и снижается активность СОД, каталазы и ГР; падает уровень тимулина в крови и двигательная активность. Курс мелатонина улучшает структуру нейронов и повышает двигательную активность; в головном мозге наблюдается снижение числа макрофагов и рост активности антиоксидантных ферментов; в крови повышается уровень тимулина.



❑ После введения мелатонина у мышей с травмой нерва повышается число нервных волокон в дистальном участке нерва и двигательная активность, которые были существенно снижены после травмы нерва.

Выводы. Нейропротекторное влияние мелатонина при исследованных патологиях нервной системы в значительной степени реализуется через патогенетические звенья их развития. Результаты могут быть полезными при разработке новых биотехнологических подходов к лечению нейродегенеративных заболеваний и травм периферического нерва.

Влияние мелатонина и тимулина на биологические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток и гемопоэтических стволовых клеток костного мозга мышей разных линий



Лабунец И. Ф., Родниченко А. Е.

ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины», Киев, Украина

В настоящее время в регенеративной медицине находят широкое применение мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) и гемопоэтические стволовые клетки (ГСК) костного мозга. Реализация биологических свойств этих клеток находится под влиянием гормонов тимуса и эпифиза.

Цель. Исследовать способность к колониообразованию и направленной дифференцировке ММСК и ГСК костного мозга мышей разных линий при изменении содержания мелатонина и тимулина в организме и в культуре клеток.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. Мыши линий CBA/Ca (генотип H-2k), FVB/N (генотип H-2q), 129/Sv (генотип H-2b) в возрасте 3–4 мес. Экспериментальные группы: интактные, ложноперированные и тимэктомированные. Мелатонин вводили мышам после операции в 18:00, в дозе 1,0 мг/кг. В костном мозге определяли число колониообразующих клеток-предшественников фибробластов (КОК-Ф) и гранулоцитов-макрофагов (КОК-ГМ), процентное соотношение гранулоцитарных, смешанных и макрофагальных колоний; в селезенке – фагоцитарную активность макрофагов (в тесте с латексом). Способность ММСК к остеогенной дифференцировке оценивали качественно окраской культур Alizarin Red S и затем полуколичественно колориметрическим методом. В крови определяли уровень мелатонина и тимулина. В опытах *in vitro* клетки костного мозга культивировали с мелатонином и тимулином.

РЕЗУЛЬТАТЫ. У мышей линии FVB/N способность ММСК костного мозга к образованию КОК-Ф и остеогенной дифференцировке выше, чем у мышей линии 129/Sv, что наблюдается на фоне более высоких уровней в крови мелатонина и тимулина. Сниженный остеогенный потенциал ММСК у тимэктомированных мышей линии 129/Sv с дефицитом тимулина усиливается после добавления в культуру клеток костного мозга тимулина или мелатонина. Инъекции мелатонина значительно повышают уровень тимулина в крови, число КОК-Ф в костном мозге, а также усиливают способность ММСК к остеогенной дифференцировке. Эффект мелатонина снижается у мышей, лишенных тимуса.

Число КОК-ГМ в костном мозге ложноперированных мышей линий CBA/Ca и FVB/N выше ($p < 0,05$), чем у интактных. Тимэктомия приводит к дальнейшему повышению числа КОК-ГМ у мышей линии CBA/Ca и их снижению у мышей линии FVB/N. Число и активность макрофагов селезенки существенно уменьшается после тимэктомии у мышей линии CBA/Ca, а у мышей линии FVB/N после ложной операции. У ложноперированных мышей линии CBA/Ca соотношение кроветворных колоний изменяется: в 5,8 раза повышается количество макрофагальных колоний по сравнению с интактными мышами. Этот эффект нивелируется у тимэктомированных мышей; наблюдается дозозависимое снижение количества макрофагальных колоний под влиянием тимулина в системе *in vitro*. У мышей линии FVB/N количество макрофагальных колоний значительно снижается после тимэктомии, однако повышается под воздействием тимулина *in vitro*.

Выводы. Изменение биологических свойств ММСК и ГСК костного мозга в условиях колебаний уровня мелатонина и тимулина может отразиться на эффективности клеточной терапии с использованием этих клеток. Данные о линейных различиях биологических свойств ММСК и ГСК могут быть полезными при разработке подходов к индивидуализированной клеточной терапии.

Вплив різних режимів введення мелатоніну на диференціацію та функціональний стан бурих адипоцитів *in vivo*



Калмикова О. О.^{1,2}, Держинський М. Е.²

¹ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

²ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету ім. Т. Шевченка, Київ, Україна

Мелатонін – гормон епіфізу, основною функцією якого є регуляція циркадної ритміки організму. Проте була показана його дія в широкому діапазоні фізіологічних реакцій: протизапальних, антиоксидантних, терморегуляторних, енергетичного метаболізму [Hardeland R., 2011]. Останні дослідження вказують на те, що мелатонін впливає і на жирову тканину, внаслідок чого відбувається зміна ваги тіла піддослідних тварин [Luchetti F., 2014; Tan D. X., 2011]. Одним із можливих шляхів такої дії є контроль диференціації преадипоцитів на бурі та бежеві адипоцити [Harms M., 2013]. ❑

❑ Нелінійних щурів-самців масою 100-120 г було розподілено на 3 експериментальні групи: 1) Контроль; 2) Введення мелатоніну за 1 год після ввімкнення світла ZT 1 (Zeitgeber time) (ZT01); 3) Введення мелатоніну за 1 год до вимкнення світла ZT 11 (ZT11). Мелатонін вводили щоденно перорально протягом 7 тижнів в концентрації 30 мг/кг/день за стандартної тривалості світлового дня (12 год :12 год). Замір споживання води та корму проводили кожний день.

Бура жирова тканина з міжплаткової ділянки була виділена та зважена. Площу поперечного перерізу ядра, клітини, ядерно-цитоплазматичне співвідношення (ЯЦС), кількість та розмір ліпідних включень, оптичну щільність в полі зору бурих адипоцитів аналізували на гістологічних препаратах забарвлених гематоксиліном-еозинном.

Вечірні введення (ZT11) мелатоніну достовірно збільшували масу бурої жирової тканини на 55 %, на протипагу ранковим введенням (ZT01) – приріст складав лише 25 % в порівнянні з К; причому такі зміни не були пов'язані з підвищенням споживання їжі та води (достовірної різниці не виявлено).

Після дії мелатоніну зростає значення ЯЦС бурих адипоцитів (ZT01 – на 53 %, ZT11 – на 68 %) за рахунок збільшення площі ядра на 46 % та 60 % відповідно, проти незмінної площі клітини (гіпертрофія тканини не виражена). Також, виявлені яскраві зміни в характері ліпідних накопичень: включення дрібнішають (їх площа зменшується у ZT01 на 50 % та у ZT11 – на 45 %), але кількість ліпідних крапель зростає на 71 % і 59 % відповідно. Такі зміни параметрів можна пояснити інтенсифікацією метаболізму завдяки появі додаткових мітохондрій. Цікаво, що сумарний відносний вміст ліпідів в полі зору після введення мелатоніну знижується (середнє значення сірого пікселя стає більшим, оскільки зменшується площа білих незафарбованих місць локалізації ліпідних включень), що проявляється у збільшенні умовних оптичних одиниць на 29 % у ZT01 і на 21 % у ZT11 груп.

Отже, ефекти різних режимів введення мелатоніну на цитологічному рівні проявляються майже однаково на функціональному стані бурих адипоцитів, проте на рівні організму при вечірніх введеннях спостерігається збільшення маси бурої жирової тканини, що може свідчити про активну диференціацію бурих адипоцитів – важливий мішені для терапії ожиріння [Kato H., 2015]. Така різниця в дії мелатоніну пояснюється залученням при цьому не тільки мелатонінових рецепторів на адипоцитах, але і опосередкованих шляхів сигналіну через включення гіпоталамічних ядер та периферичної нервової системи.

Вплив екзогенного лейкемія інгібіторного фактору на відновлення периферичного нерва



Демидчук А. С.², Шамало С. М.², Лабунець І. Ф.¹, Утко Н. О.¹, Родніченко А. Є.¹, Римар С. Ю.¹, Пантелеймонова Т. М.¹, Чайковський Ю. Б.^{1,2}, Бутенко Г. М.¹

¹ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

²Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця МОЗ України, Київ, Україна

В останній час велика увага надається розробці патогенетичних підходів до прискорення регенерації травмованого периферичного нерва на основі вивчення її механізмів, зокрема дослідження значення факторів мікрооточення для процесів мієлінізації та росту аксонів нейронів. Лейкемія інгібіторний фактор (LIF) виявляє властивості як поліфункціонального цитокіну, так і нейротрофічного фактору [Ostasov, 2015]. Регенерація периферичного нерва порушується при розвитку оксидативного стресу в ділянці травми.

МЕТА. Дослідити вплив введення рекомбінантного LIF людини (rhLIF) на ефективність відновлення структури ушкодженого сідничного нерва та рухової функції травмованої кінцівки, а також оцінити в її м'язовій тканині зміни активності факторів оксидативного стресу і антиоксидантного захисту.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. В роботі використовували дорослих мишей-самців лінії FVB наступних експериментальних груп: псевдооперовані; травма (перетин) правого сідничного нерва; травма нерва та ін'єкції rhLIF з 3-ї доби після травми, щоденно, підшкірно, у дозі 50 мкг/кг. Дослідження проводили через 4 тижнів після операції. При морфометрії оцінювали щільність нервових волокон у дистальному відрізьку нерва після імпрегнації азотнокислим сріблом. Рухову функцію тварин оцінювали в тесті «відкрите поле» по числу пересічених квадратів (горизонтальна рухова активність), а також у тесті «відбитків підошовних поверхонь стопи» по відстані (мм) між крайніми пальцями стопи травмованої кінцівки. У ділянці травми в м'язовій тканині оцінювали вміст малонового діальдегіду (МДА), активність супероксиддисмутази (СОД), каталази, глутатіонпероксидази (ГП) і глутатіонредуктази (ГР).

РЕЗУЛЬТАТИ. Встановлено, що загальна кількість нервових волокон у дистальному відрізьку нерва мишей з травмою і введенням rhLIF (12117,6 ± 589,8 на мм²) вище ($p < 0,05$), ніж у мишей тільки з травмою нерва (8409,5 ± 739,50 на мм²) і при цьому досягає значень показника у псевдооперованих тварин ($p > 0,05$). Горизонтальна рухова активність у експериментальних мишей, що отримували цитокін, в 1,6 разів вища ($p < 0,05$), ніж в групі без нього ($p < 0,05$) і не відрізняється від значень контрольної групи ($p > 0,05$). Відстань між крайніми пальцями правої стопи у псевдооперованих мишей вище ($p < 0,05$), ніж в групах мишей з травмою нерва, травмою та ін'єкціями rhLIF, проте у мишей, що отримували цитокін, значення показника вище ($p < 0,05$), ніж в групі без нього. Після травми в м'язовій тканині зростає вміст МДА і активність каталази, тоді як активність ГР знижується ($p > 0,05$) порівняно з контрольними тваринами. Під впливом rhLIF досліджувані показники змінюються до значень у псевдооперованих мишей, і, крім того, спостерігається зростання активності ГП.

ВИСНОВКИ. Введення rhLIF мишам із травмою сідничного нерва сприяє більш повноцінному відновленню структурної організації ушкодженого нерва та підвищує рухову функцію травмованої кінцівки. При цьому в м'язовій тканині у ділянці травми зростає активність факторів антиоксидантного захисту. Результати можуть бути підґрунтям для використання в клітинних технологіях.

Вплив мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня на регенерацію периферичного нерва при його травматичному ушкодженні в експерименті за даними ЕНМГ



Цимбалюк В. І.¹, Петрів Т. І.¹, Васильєв Р. Г.^{2,3}, Медведєв В. В.⁴, Татарчук М. М.¹, Драгунцова Н. Г.¹

¹ ДУ «Інститут нейрохірургії ім. акад. А. П. Ромоданова НАМН України», Київ, Україна

² ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

³ Біотехнологічна лабораторія *ilaya.regeneration*, медична компанія *ilaya*®, Київ, Україна

⁴ Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ. Дослідити вплив мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня (МСК-ПНГ) на відновлення функції периферичного нерва за даними ЕНМГ.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Експериментальні тварини: білі безпородні щурі-самці (5,5 міс, 250 ± 50 г, віварій ДУ «ІНХ НАМНУ» n = 52); групи: група 1 – перетин сідничого нерва невротомія (зі створенням дефекту 1 см) та негайна аутопластика (n = 14); група 2 – невротомія та негайна пластика колагеновою трубкою, заповненою фібрином (n = 15); група 3 – невротомія та негайна пластика колагеновою трубкою, заповненою фібриновим гелем з вмістом МСК-ПНГ (n = 16); група 4 – псевдооперовані тварини (n = 7). Визначення ключових ЕНМГ-показників за допомогою прямої стимуляційної ЕНМГ на 4-му та 8-му тижнях експерименту.

РЕЗУЛЬТАТИ. Станом на кінець 4-го тижня спостереження у групі 1 амплітуда М-відповіді паретичної кінцівки достовірно (p = 0,018) поступалась значенням інтактної кінцівки (3,3 ± 0,5 мВ проти 16,5 ± 2,3 мВ). У групах 2 та 3 на аналогічному терміні статистично значущо (p = 0,018) перевагу значень інтактної кінцівки спостерігали для амплітуди М-відповіді (група 2 – 16,5 ± 2,3 мВ проти 0,9 ± 0,2 мВ; група 3 – 14,7 ± 2,2 мВ проти 2,3 ± 0,2 мВ; p = 0,018) та швидкості проведення збудження (група 2 – 22,3 ± 1,6 м/с проти 7,9 ± 2,1 м/с (p = 0,018; U-тест Мана-Уїтні); група 3 – 19,3 ± 2,5 м/с проти 12,7 ± 0,4 м/с; (p = 0,049; U-тест Мана-Уїтні)). Значення амплітуди М-відповіді у групі 2 (0,9 ± 0,2 мВ) виявилось достовірно меншим, ніж значення групи 1 (3,3 ± 0,5 мВ; p = 0,006), групи 3 (2,3 ± 0,2 мВ; p = 0,002) і групи 4 (16,6 ± 1,4 мВ; p = 0,006). Значення швидкості проведення збудження у групі 2 (7,9 ± 2,1 м/с) достовірно поступалося значенню групи 1 (23,5 ± 5,4 м/с; p = 0,004), групи 3 (12,7 ± 0,4; p = 0,02) і групи 4 (12,2 ± 0,6 м/с; p = 0,02). Станом на 8-й тиждень спостереження відмічали достовірну перевагу величини амплітуди М-відповіді паретичної кінцівки тварин групи 1 (4,1 ± 0,7 мВ) лише над показником групи 2 (1,4 ± 0,3 мВ; p = 0,007). Достовірна різниця виявлена і між значеннями показника групи 2 і 3 (2,9 ± 0,4; p = 0,018) на користь останньої. Значення амплітуди М-відповіді паретичної кінцівки груп 1, 2 і 3 достовірно поступались значенню групи 4 (22,4 ± 2,2 мВ; p = 0,006, p = 0,004, p = 0,004, відповідно). На цьому ж терміні спостереження швидкість проведення імпульсу та латентний період його реєстрації у паретичній кінцівці тварин групи 2 (10,5 ± 1,5 м/с та 2,5 ± 0,6 мс) відрізнялися від групи 1 (23,6 ± 7,3 м/с та 1,1 ± 0,2 мс; p = 0,012). Статистично значущу різницю виявляли також при порівнянні швидкості проведення збудження у групі 1 та 2 (на користь групи 1 – 10,5 ± 1,5 м/с, p = 0,017), а також при порівнянні тривалості латентного періоду у групах 2 і 4 (на користь групи 2 – 2,5 ± 0,6 мс, p = 0,045).

ВИСНОВОК. МСК-ПНГ мають позитивний вплив на регенерацію ПН за рахунок стимуляції проростання більшої кількості нервових волокон ніж за умов імплантації колагенового матрикса без МСК-ПНГ, що опосередковано відображають ключові ЕНМГ-показники. Нейроінженерний підхід у пластиці дефекту ПН з використанням колагенових матриксів та МСК-ПНГ забезпечує результат, тотожний «золотому стандарту» – аутонейропластиці.

Дослідження впливу постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребеня на перебіг регенерації в зоні експериментальної травми зорового нерва



Чепурний Ю. В.¹, Копчак А. В.¹, Корсак А. В.¹, Ліходієвський В. В.¹, Зубов Д. О.^{2,3}, Васильєв Р. Г.^{2,3}, Чайковський Ю. Б.²

¹ Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна

² ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

³ Біотехнологічна лабораторія *ilaya.regeneration*, Медична компанія *ilaya*®, Київ, Україна

Ушкодження органів нервової системи продовжують залишатися особливо важкими для лікування, що пов'язано з особливістю їх регенераційних можливостей. Травма зорового аналізатора та її наслідки в тяжких випадках значно знижують якість життя постраждалих. На сьогодні, незважаючи на велику кількість досліджень та детально вивчений патогенез пошкодження зорового нерва, залишається не вирішеним питання щодо пошуку ефективних методів стимуляції його відновлення.

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ. Вивчити структурні зміни зорового нерва після експериментальної травми та застосування стовбурових клітин.

МАТЕРІАЛ ТА МЕТОДИ. Для досягнення поставленої мети була розроблена модель пошкодження м'яких тканин орбіти, зокрема зорового нерва, окоорухових м'язів та орбітальної жирової клітковини. Дослідження проводили на 40 щурах лінії Вістар. Щурам основної експериментальної групи, на відміну від контрольної, в ділянці пошкодження м'яких тканин орбіти вносили постнатальні мультипотентні стовбурові клітини – похідні нервового гребеня (EPI-NCSCs), отримані з волосяних фолікулів вібрисів сингенних тварин. За допомогою загальногістологічного та нейрогістологічного методів досліджено зоровий нерв та м'які тканини орбіти. ▣

РЕЗУЛЬТАТИ. Травма зорового нерву викликає його дегенерацію. Застосування стовбурових клітин ініціює прискорення та підвищення якості регенерації зорового нерву, про що свідчить поява молодих новоутворених нервових волокон, колонок гліальних клітин, які складаються переважно із олігодендроцитів, зменшення гліального рубця за рахунок зниження кількості астроцитів та прискорена елімінація залишків зруйнованого мієліну.

ВИСНОВКИ. Введення стовбурових клітин, отриманих із волосяних фолікулів вібрис сингенних особин, у періоді після травми зорового нерву сприяє його відновленню.

Клітинна терапія в офтальмології



Риков С. О.¹, Петренко О. В.¹, Яковець А. І.¹, Клименко П. П.^{2,3}, Зубов Д. А.^{2,3}, Родніченко А. Е.^{2,3}, Васильєв Р. Г.^{2,3}

¹Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика МОЗ України, Київ, Україна

²ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

³Біотехнологічна лабораторія *ilaya.regeneration*, Медична компанія *ilaya*®, Київ, Україна

Розробка нових методів лікування глаукоми, яка являється хронічним, мультифакторним нейродегенеративним захворюванням, в процесі якого виникає загибель гангліозних клітин сітківки та розвивається прогресуюча оптична нейропатія, є актуальною проблемою сучасної офтальмології. Це обумовлено тим, що загальновідомий і доступний спектр лікувальних заходів, таких як консервативних, хірургічних, лазерних, на жаль не зменшує неухильне зростання захворюваності глаукоми в усьому світі, прогресуюче погіршення та втрату зорових функцій, що призводить до втрати працездатності та інвалідності. Сучасною наукою активно проводиться чимало експериментальних досліджень в області регенеративної медицини і клітинної терапії в офтальмології, які ґрунтуються на унікальних властивостях стовбурових клітин, включаючи здатність до самооновлення і можливість диференціювання в специфічні види клітин.

МЕТА ДОСЛІДЖЕННЯ – дослідити ефективність клітинної терапії з використанням постнатальних мультипотентних стовбурових клітин-похідних нервового гребня (МСК-ПНГ) в лікуванні індукованої адреналіновим стресом глаукоми при різних способах доставки.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Моделювання глаукоми проводили на щурах Wistar (10-12 міс., самці) шляхом внутрішньоочеревинного введення 0,18 % розчину адреналіну гідротартрату в дозі, починаючи з 10 мкг, доводячи до 15 мкг на 100 г маси. Було проведено 20 ін'єкцій за 6 тижнів. Вимірювання внутрішньоочного тиску (ВОТ) проводили аппланційним тонометром Topolab. МСК-ПНГ отримували з волосяного фолікула вібрис, культивували за оригінальною методикою та були охарактеризовані за допомогою імуноцитохімії та за здатністю до спрямованої мультилінійної диференціації. Введення МСК-ПНГ здійснювали такими способами: ретро- і парабурбарно – по 0,5 млн. клітин, внутрішньовенно – 5 млн. клітин. Проводили гістоморфометричний аналіз сітківки та зорового нерва на забарвлених гематоксилін-еозином зрізах товщиною 5 мкм.

РЕЗУЛЬТАТИ. МСК-ПНГ мали характерну морфологію та фенотип *nestin⁺p75⁺Sox2⁺Sox10⁺cytokeratin⁻*. Також МСК-ПНГ демонстрували *in vitro* здатність до спрямованого мультилінійного диференціювання у мезенхімальні (адіпоцити, остеобласти та хондроцити) та нейральні (нейрони та глія) клітинні типи, що є характерною властивістю клітин похідних краніального сегменту нервового гребеня. ВОТ у щурів до початку моделювання глаукоми становив 7-8 мм. рт. ст., після – 20-22 мм. рт. ст. Через місяць після моделювання глаукоми спостерігали характерні для глаукомної оптичної нейропатії зміни: дегенерацію аксонів в шарі нервових волокон і його часткове відшарування від шару гангліозних клітин; апоптоз і некроз клітин в шарі гангліозних клітин; збільшення товщини внутрішнього сітчастого шару; витончення, розриви в зовнішньому сітчастому шарі; порушення цитоархітектоніки внутрішнього і зовнішнього ядерних шарів; збільшення товщини фоторецепторного шару. Після трансплантації МСК-ПНГ спостерігали позитивні морфологічні зміни різного ступеня при всіх способах введення. При внутрішньовенному та парабурбарному введенні відмічали зменшення набряку та відновлення цитоархітектоніки шарів сітківки, проте найбільш виражене відновлення цитоархітектоніки шарів сітківки було при ретробурбарному введенні МСК-ПНГ.

ВИСНОВКИ. За результатами дослідження, клітинна терапія з використанням МСК-ПНГ мала позитивний ефект при експериментальній глаукомі, який був найбільш виражений при ретробурбарному введенні клітин. Необхідні подальші дослідження механізмів впливу трансплантованих МСК-ПНГ на відновлення структури сітківки та зорового нерва.

Протекторна та лікувальна дія нейрональних стовбурових клітин на морфофункціональний стан завитка при змодельованому аміноглікозидному ототоксикозі



Тімен Г. Е., Цимбалюк В. І., Малишева Т. А., Сапіжак І. І., Стайно Л. П.

ДУ «Інститут отоларингології ім. О. С. Коломійченка НАМН України», Київ, Україна

ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова НАМН України», Київ, Україна

Метою даної роботи було вивчити ефективність протекторної та лікувальної дії суспензії нейрональних стовбурових клітин при експериментальному викликаному аміноглікозидному ототоксикозі у мурчаків.

Експеримент проведено на 40 тваринах (статевозрілі мурчакі) вагою 250-600 грам, які були розподілені на 8 груп залежно від способу та шляху введення НСК. ➤

Усім тваринам на початку експерименту перед введенням НСК та по закінченні дослідження проводилось обстеження стану слуху методом реєстрації коротколатентних слухових викликаних потенціалів (КСВП). Суспензія нейрональних стовбурових клітин вводилась в об'ємі 2 млн клітин в 0,5 мл інтратимпанально та 2 млн клітин в 0,5 мл субокципітально на 1-у, 8-у і 15-у добу експерименту.

Експеримент проведено на 40 тваринах (статевозрілі мурчаки) вагою 250-600 грам, які були розподілені на 8 груп залежно від способу та шляху введення НСК.

НОМЕР ГРУПИ	УМОВИ ЕКСПЕРИМЕНТУ	КІЛЬКІСТЬ ДОСЛІДНИХ ТВАРИН
I	14-разове введення гентаміцину (100 мг/кг)	5
II	14-разове введення 0,9 % NaCl внутрішньом'язово	5
III	14-разове введення гентаміцину + НСК інтратимпанально на 1-у добу	5
IV	14-разове введення гентаміцину + НСК інтратимпанально на 8-у добу	5
V	14-разове введення гентаміцину + НСК інтратимпанально на 15-у добу	5
VI	14-разове введення гентаміцину + НСК субокципітально на 1-у добу	5
VII	14-разове введення гентаміцину + НСК субокципітально на 8-у добу	5
VIII	14-разове введення гентаміцину + НСК субокципітально на 15-у добу	5

Таким чином, отримано недостовірні зміни порогів слуху після введення фізіологічного розчину в I групі ($p > 0,05$). Тобто, 0,9 % розчин натрію хлориду, як і очікувалось, не впливає на порогові слухосприйняття. У тварин, яким вводили НСК в першу добу, отримано недостовірне підвищення порогів слуху при інтратимпанальному введенні, ($p > 0,05$), що може свідчити про наявність їх протекторної дії. У тварин, яким вводили НСК на 8-у добу, отримано достовірне підвищення порогів ($p < 0,05$) при обох способах введення. Отже, ці дані дозволяють припустити про наявність протекторної та лікувальної дії НСК на ототоксичні прояви гентаміцину.

ВИСНОВКИ. Аміноглікозидний токсикоз, змодельований шляхом введення гентаміцину мурчакам протягом 14 днів в дозі 100 мг/кг ваги, супроводжується загальною інтоксикацією: зниженням апетиту, втратою ваги, порушенням функції слухового аналізатора, що проявляється у зниженні слуху і підтверджено даними реєстрації коротколатентних слухових викликаних потенціалів. 14-денне введення гентаміцину мурчакам викликає порушення морфофункціонального стану внутрішнього вуха, мікроциркуляції в судинній смужці. Введення НСК в перший день штучно змодельованого аміноглікозидного ототоксикозу попереджало прояви загальної дії та негативного впливу на функцію внутрішнього вуха (КСВП). Введення НСК на 8 добу штучно змодельованого аміноглікозидного ототоксикозу супроводжувалось лікувальним ефектом, про що свідчать порівняння результатів КСВП ($p > 0,05$). Вивчена морфологія завитки та проведено гістохімічне визначення нуклеїнових кислот і стану енергетичного обміну, в результаті чого отримана повна інформація про характер метаболічних процесів в Кортієвому органі.

Отже, ці дані дозволяють констатувати про наявність протекторної та лікувальної дії НСК на ототоксичні прояви гентаміцину.

Отримання та характеристика одноланцюгових антитіл специфічних до інтерферону- β 1b та інтерлейкіну-10 людини



Усенко М. О.^{1,2}, Горбатюк О. Б.^{1,2}, Окунев О. В.², Кордюм В. А.^{1,2}

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна

²ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

Розсіяний склероз (РС) – одна з найпоширеніших неврологічних хвороб людей працездатного віку у світі. За останні десятиліття кількість хворих на РС в Україні зросла більш ніж вдвічі. Сьогодні інтерферон- β 1b (IFN- β 1b) входить у всі світові протоколи лікування РС. Одним з доведених ефектів довготривалого лікування РС препаратом IFN- β є збільшення кількості клітин, що секретують інтерлейкін-10 (IL-10). IL-10 – протизапальний цитокін, що відіграє важливу роль в низці аутоімунних та запальних процесів. Тому метою нашої роботи була розробка методу виявлення IL-10 та IFN- β за допомогою кон'югатів одноланцюгових антитіл (single-chain variable fragments – scFv) з лужною фосфатазою (alkaline phosphatase – AP).

Перевагами ScFv, у порівнянні з повнорозмірними IgG, є невеликі розміри та можливість отримання значної їх кількості біосинтезом у гетерологічних системах. Крім того, ScFv можуть бути кон'юговані на рівні генів з маркерними молекулами та використані для одностадійної імунодетекції цільових білків.

Із комбінаторних бібліотек кДНК V-генів імуноглобулінів миші, із застосуванням технології фагового дисплею, були виділені ScFv, специфічні до IFN- β та IL-10. ДНК-послідовність, що кодує AP, було субклоновано у плазмідні вектори pCANTAB-ScFv(IL-10) та pCANTAB-ScFv(IFN- β). Для отримання штамів-продуцентів імунокон'югатів, клітини E. coli BL21(DE3) трансформували плазмідними векторами pCANTAB-ScFv(IL-10)-AP та pCANTAB-ScFv(IFN- β)-AP. Біосинтез ScFv(IFN- β)-AP та ScFv(IL-10)-AP індукували додаванням ІПТГ. Цільові білки накопичувалися у периплазматичному просторі E. coli. Функціональну активність ScFv у складі ScFv(IFN- β)-AP та ScFv(IL-10)-AP було підтверджено дот-блот аналізом та ELISA в результаті зв'язування із rhIFN- β та rhIL-10, відповідно. Також було визначено оптимальний склад інкубаційного середовища для забезпечення максимальної каталітичної активності AP. Показано можливість зберігання ScFv(IFN- β)-AP та ScFv(IL-10)-AP у вигляді периплазматичних екстрактів при -20°C без втрати їх функціональної активності.

Біфункціональні імунокон'югати ScFv(IFN- β)-AP та ScFv(IL-10)-AP є перспективними кандидатами для створення нових тест-систем для виявлення IL-10 та IFN- β людини.

Пептиди, утворені в організмі за патологічних станів, як основа для розробки нових підходів діагностики, корекції та профілактики розвитку метаболічних порушень організму



Савчук О. М.^{1,2}, Мельник В. С.^{2,3}, Катрій Т. Б.¹, Вовк Т. Б.¹

¹Київський національний університет імені Тараса Шевченка, ННЦ «Інститут біології та медицини», Київ, Україна

²Медична компанія іlaya®, Київ, Україна

³Національний медичний університет ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна

Останні десятиліття охарактеризувалися бурхливим розвитком пептидоміки – одного з нових напрямів фізико-хімічної біології, в межах якого вивчають склад, функції, механізми утворення та елімінації біологічно активних фрагментів білків – пептидів. Вагомим результатом таких досліджень стала запропонована В. Т. Івановим (1997) концепція «пептидних пулів» або «тіньових білків» відповідно до якої, окрім добре досліджених пептидних гормонів, нейрорегуляторів, антибіотиків білкової природи, біологічні рідини та тканини організму містять набір пептидів, що утворюються з функціонально активних високомолекулярних білків шляхом тканинспецифічного ферментативного гідролізу. Аналіз присутності та характеристика цих пептидних фракцій може бути корисною не тільки з теоретичної точки зору, але і з практичної – диференціація діагностики патологічних станів та пошук потенційних фармакологічних агентів. Тому метою даної роботи було дослідження присутності та характеристика пептидного пулу у хворих на ішемічний інсульт.

Пептидний пул з молекулярною масою до 5 кДа [Ніколайчук В. В., 1997], було отримано з плазми крові пацієнтів з атеротромботичним ішемічним інсультом (АІІ) та кардіоемболічним ішемічним інсультом в гостру фазу хвороби та через 1 рік після неї. Характеристику одержаних фракцій проводили електрофоретично в 7,5-12 % ДСН-ПААГ за методом Laemmli [Hockfield S., 1993] та за допомогою хроматографії, що розподіляє за розміром, використовуючи носій Sephadex G 15 [Huse K., 2002].

Вперше було показано, що пептидний пул здатний спричинювати значний інгібуючий вплив на АДФ-залежну агрегацію тромбоцитів здорових донорів. Під час дослідження процесу гідролізу хромогенного субстрату ключовими факторами системи гемостазу було показано, що фракції пептидного пулу пацієнтів з ішемічним інсультом, як в гостру фазу захворювання так і через рік після неї, проявляли максимальні ефекторні властивості по відношенню до фактору X, та активували процес гідролізу специфічного хромогенного субстрату ферментом на 80 %. Показана загальна активація досліджуваного процесу протеїном С активованим у плазмі крові з проферменту, за дії пулу пептидів, як здорових донорів так і людей з патологією, в середньому на 20 %. Доведена ефекторна здатність пептидного пулу на рівні активації тромбоцитів здорових донорів, а саме, була показана секреція з α -гранул тромбоцитів фактора фон Віллебранда та інгібітора активатора плазміногену типу-1 під дією усіх досліджуваних фракцій.

Таким чином, дослідження, спрямовані на ідентифікацію складу пептидних пулів та вивчення їх властивостей, відкривають значні перспективи для створення на основі природних пептидів нових фармакологічних засобів для лікування хвороб, пов'язаних з дегенеративними змінами, трансформацією клітин і тканин. Висока чутливість «пептидних пулів» до фізіологічного статусу організму свідчить про можливість застосування результатів пептидомічних досліджень в галузі клінічної діагностики з метою пошуку пептидних маркерів певних патологічних станів.

Прискорення репаративних процесів у виразкових дефектах стінки шлунка, що погано регенерують, шляхом локальної ендоскопічної аутоотрансплантації плазми, збагаченої тромбоцитами



Петрушенко В. В., Гребенюк Д. І., Радьога Я. В.

Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, Вінниця, Україна

Метою дослідження було оцінити ефективність локальної аутоотрансплантації плазми, збагаченої тромбоцитами, у пацієнтів із хронічними виразками шлунку, що погано регенерують.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. В дослідження були включені 50 пацієнтів із середніми та великими хронічними виразками шлунку, що погано регенерують (відсутність позитивної динаміки від противиразкової терапії протягом 12 тижнів).

Пацієнти були розподілені на групу порівняння (n = 27, стандартна консервативна противиразкова терапія) та дослідну групу (n = 23, стандартна консервативна противиразкова терапія доповнена ендоскопічною аутоотрансплантацією плазми, збагаченої тромбоцитами – Патент України на корисну модель № 104840). Розподіл пацієнтів за статтю та віком у групах був рівномірним.

Під час ініціального та усіх контрольних ендоскопічних досліджень (1, 7 та 14–та доба) проводили вимірювання площі виразок та поліпозиційну експрес-біопсію (5–7 ділянок) для виключення ознак малігнізації виразки шлунка (атипові клітини, дисплазія, метapлазія).

РЕЗУЛЬТАТИ. Як у дослідній групі, так і в групі порівняння прослідковувалася тенденція до зменшення числових показників площі виразкових дефектів з часом. Так, у групі порівняння на 7 добу відмічалось достовірне (p < 0,01) зменшення площі виразок із 288,7 ± 121,7 мм² до 191,5 ± 113,4 мм². На 14 добу цей показник склав 134,3 ± 103,4 мм² і також достовірно відрізнявся від показників, отриманих під час ініціального ендоскопічного дослідження (p < 0,01). В той же час, хоча чисельно площа виразкових дефектів на 14 добу була меншою за аналогічний показник на 7 добу, дана різниця не була статистично значимою (p > 0,05).

❑ Схожа тенденція прослідковувалася і в дослідній групі. Так, площа виразок на 14 добу ($37,0 \pm 52,9 \text{ мм}^2$) була значно меншою від площі на 1-у ($292,5 \pm 129,3 \text{ мм}^2$) та 7-му ($147,9 \pm 99,9 \text{ мм}^2$) добу. Проте, на відміну від групи порівняння, достовірність була доведена для кожної пари показників ($p < 0,01$).

Крім оцінки динаміки репаративного процесу всередині кожної групи, ми також порівнювали розміри виразкових дефектів в обох групах на кожному терміні дослідження. Так, якщо на 1 добу дослідження жодних відмінностей ($p > 0,05$) між показниками площі виразок в обох групах не було, то на 7 добу нами було помічено більш швидке, хоча й недостовірне ($p > 0,05$) зменшення площі в дослідній групі. На 14 добу відмінності були ще більш вираженими, і на цей раз були достовірними ($p < 0,01$).

Повне загоєння виразок шлунку на стадії «червоного рубця» спостерігалось при ендоскопічному дослідженні лише на 14 добу. Всього у 19 пацієнтів нашого дослідження на 14 добу відбулася повна регенерація слизової оболонки шлунку. Щодо розподілу по групам, то в групі порівняння повне загоєння мало місце лише у 5 (18,5 %) випадках, у дослідній групі – у 14 (60,9 %) пацієнтів, причому різниця була достовірною ($p < 0,01$). Слід також зазначити, що абсолютно всі випадки повного загоєння виразкових дефектів припадали на частину пацієнтів із виразками середніх розмірів (1–2 см). Проте, ні в групі порівняння, ні в дослідній групі, жодна виразка великих розмірів (2–3 см) не загоїлася повністю.

ВИСНОВКИ. Однократна локальна ендоскопічна аутотрансплантація плазми, збагаченої тромбоцитами, на фоні противиразкової терапії дозволяє достовірно прискорити процес епітелізації виразкових дефектів протягом 14 діб, зменшити площу виразкових дефектів великих розмірів та досягти 100 % загоєння виразкових дефектів середніх розмірів.

Эффективность использования аллогенных стромальных мезенхимальных клеток в лечении воспалительных заболеваний кишечника

Боднарюк М. Ю.¹, Вилиткевич Е. Л.¹, Смирнова И. В.¹, Мосийчук В. В.¹, Колесников Е. Б.^{1,2,3}

¹*Deva Clinique, Киев, Украина*

²*Кафедра общей и неотложной хирургии НМАПО имени П. Л. Шупика, Киев, Украина*

³*INTERMED Surgical Center, Virginia, USA*

Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) – это мультипотентные прогениторные клетки с мощным иммуномодулирующим действием. МСК обладают способностью дифференциации в различные типы клеток организма, таким образом способствуя выживаемости и регенерации поврежденных клеток и тканей организма.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. 35 пациента с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК), среди которых 17 – с болезнью Крона (БК) и 18 – с неспецифическим язвенным колитом (НЯК), получали комбинированную терапию, которая включала внутривенное введение МСК и этиопатогенетическую консервативную терапию ВЗК.

Пациенты, рефрактерные к традиционному консервативному лечению ВЗК, были распределены в 2 группы исследования. 1-я группа из 17 пациентов с умеренно и выраженной активностью БК (CDAI ≥ 220) и 2-я группа из 18 пациентов с НЯК получали курсовую терапию внутривенного введения $1 \cdot 10^6/\text{кг}$ аллогенных МСК, выделенных из пуповинной крови здоровых доноров (1 введение препарата МСК каждые 3 месяца на протяжении 12 месяцев, всего 4 введения).

РЕЗУЛЬТАТЫ. У 29 пациентов наблюдался ответ на лечение и четкая позитивная динамика после 3 месяцев терапии: уменьшение бального значения индекса активности БК (CDAI ≥ 100) и объективной клинической картины состояния пациентов. После 6 месяцев лечения уменьшение бального значения индекса активности БК наблюдалось у всех 35 пациентов, у 32 из которых отмечалось значительное клиническое улучшение общего состояния. После 1 года лечения удалось достигнуть стойкой клинической ремиссии и/или значительного клинического улучшения у 32 пациентов (16 из 17 пациентов с БК и 16 из 18 с НЯК). После проведенного лечения стойкая ремиссия продлилась до двух лет у 26 пациентов, 18–20 месяцев – у трех пациентов, рецидив заболевания отметили у 3 пациентов в период между 12 и 17 месяцами после проведенного лечения. Патогистологическое исследование биопсийного материала показало уменьшение воспалительного компонента и лимфоцитарной инфильтрации lamina propria. Средняя продолжительность периода наблюдения составила 26 месяцев (интервал 14–32 месяцев). В период наблюдения мы не отметили никаких побочных эффектов от введения МСК. Все пациенты субъективно отметили улучшение в качестве жизни.

ВЫВОДЫ. Аллогенные МСК являются эффективным иммуномодулятором в комбинированной терапии ВЗК, значительно повышающим эффективность традиционной консервативной терапии ВЗК.

Стойкая паратиреоидная недостаточность: возможности тканевой и клеточной терапии

Тронько Н. Д., Коваленко А. Е., Люткевич А. В., Пастер И. П.

ГУ «Институт эндокринологии и обмена веществ им. В. П. Комиссаренка НАМН Украины», Киев, Украина

Стойкая паратиреоидная недостаточность является нерешенной проблемой в связи с низкой эффективностью медикаментозной терапии гипопаратиреоза средней и тяжелой степени. В связи с этим в экспериментальной и клинической трансплантологии все большее развитие получает тканевая и клеточная терапия путем трансплантации паратиреоидной ткани и культуры паратиреоцитов. ❑

❏ Проведен анализ результатов ауто-, ксено- и аллотрансплантации паратиреоидной ткани с целью лечения стойкой паратиреоидной недостаточности.

Аутоотрансплантация парашитовидных желез. Выполнение тиреоидэктомии при заболеваниях щитовидной железы всегда предусматривало сохранность васкуляризации парашитовидных желез с помощью прецизионной техники. Аутоотрансплантация парашитовидных желез является вынужденной процедурой, выполняемой при их удалении или деваскуляризации. Аутоотрансплантация проведена 24 пациентам: у 95,8 % из них компенсация кальциевого обмена без медикаментозной коррекции достигнута в сроки до 3 месяцев, у 87,5 % – до 6 месяцев, у 62,5 % – до 9 месяцев.

У 8 пациентов в различные сроки после трансплантации проведена топическая идентификация и определение функциональной активности трансплантированной паратиреоидной ткани методом двухфазной сцинтиграфии с применением ^{99m}Tc MIBI. У 4 пациентов накопление радиофармпрепарата в зонах трансплантированной паратиреоидной ткани отмечено в сроки до 3 месяцев после операции, у 3 пациентов – до 1 года; у 1 пациента отмечено накопление радиофармпрепарата через 2,5 года после трансплантации. Представленные данные могут указывать на определенную функциональную активность трансплантата в достаточно длительном периоде времени. Опыт проведения аутоотрансплантаций паратиреоидной ткани показал перспективность метода для достижения полной компенсации кальциевого обмена у 95 % пациентов в сроки до 1 года после трансплантации.

Ксенотрансплантация культуры паратиреоцитов. Изучены результаты клинической ксенотрансплантации органных культур паратиреоцитов новорожденных поросят пациентам со стойким гипопаратиреозом. Методика применена 30 пациентам в виде инъекционного введения биологического материала под апоневроз прямой мышцы живота. К исходу 3–4 недели после ксенотрансплантации у пациентов отмечено повышение уровней кальция и паратгормона, снижение уровня фосфора в крови до нормальных величин. У 25 пациентов положительный эффект трансплантации заключался в полной компенсации недостаточности парашитовидных желез, которая сохранилась на протяжении 6–8 месяцев. При этом практически во всех случаях была прекращена терапия препаратами кальция и паратгормоном.

Аллотрансплантация микроинкапсулированной паратиреоидной ткани. Разработан метод микроинкапсуляции ткани парашитовидных желез в альгинатные микрокапсулы, позволяющий сохранить активную гормонпродуцирующую активность ткани в условиях *in vitro* и *in vivo* и защитить трансплантат от реакции отторжения в условиях *in vivo*. Экспериментальные исследования показали, что микроинкапсулированная паратиреоидная ткань человека сохраняет способность активно секретировать паратгормон после ксенотрансплантации крысам с экспериментальным гипопаратиреозом, а также позитивно влияет на уровень общего и свободного кальция в сыворотке крови животных-реципиентов. Внедрение метода в клиническую практику требует проведения дополнительных экспериментальных исследований и клинических испытаний, а также утверждения соответствующих клинических протоколов с четкими показаниями к паратиреоидной трансплантации.

Морфометрична характеристики культивованих клітин, виділених з нігтьового органу мишей різного віку



Калмикова О. О.^{1,2}, Устименко А. М.¹, Луценко Т. М.¹, Кирик В. М.¹

¹Державна установа «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України», Київ, Україна

²ННЦ «Інститут біології та медицини» Київського національного університету імені Тараса Шевченка, Київ, Україна

Нігтьовий орган розглядають як потенційне джерело для отримання стовбурових клітин різного типу. Яскравим проявом їх потужної функціональної активності є забезпечення росту нігтя впродовж всього життя та участь в регенерації тканин кінцівок. Зокрема, відновлення втрачених кінчиків пальців описано у мишей [Han et al., 2008, Fernando et al., 2011] та навіть у людини [Allan et al., 2006], проте тільки за умови збереження нігтя [Lehoczky, 2017]. В цей процес залучається багато типів клітин (фіброласти, мезенхімальні і епітеліальні стовбурові клітини та інші) різного походження [Marrero L. et al., 2017], проте обов'язковим є сигнальний вплив від клітин нігтьового органу [Takeo M. et al., 2013]. Відомо, що клітини нігтьового органу мають різне походження: ектодермальне, з нервового гребеня, мезодермальне, але залишаються відкритими питання про їх локалізацію (нігтьовий матрикс, нігтьові складки, оніходерміс), фенотипічні маркери та вікові зміни. Тому метою нашої роботи було порівняти деякі морфометричні характеристики культивованих клітин, виділених з нігтьового органу мишей різного віку.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Культура клітин отримана з нігтьового органу мишей лінії FVB двох вікових груп – 7 діб (молоді, n = 10) та 2 міс. (дорослі, n = 10). У кожній тварини виділяли по 3 дистальні фаланги. Експланти з області проксимальної нігтьової складки, нігтьового матриксу та оніходермісу вирощували на поживному середовищі DMEM із додаванням 15 % ембріональної бичачої сироватки. Аналіз морфометричних параметрів (площа ядра, площа клітини, ядерно-цитоплазматичне співвідношення – ЯЦС) проводили на першому пасажі; після фіксації 96 % етанолом клітини фарбували залізним гематоксиліном Генденгайна.

РЕЗУЛЬТАТИ. Були виявлені відмінності за строками досягнення конфлюентного моношару у досліджуваних вікових групах: клітини з нігтьового органу молодих мишей на нульовому пасажі утворювали конфлюентний моношар після 20 днів культивування, в той же час клітини, отримані з дорослих мишей – після 45 днів. Було виявлено достовірну різницю при порівнянні площі ядра та клітини: клітини з нігтьового органу молодих мишей мали менші на 74 % і 75 % відповідні морфометричні показники, ніж клітини, які були виділені з нігтьового органу дорослих мишей (p ≤ 0,05). Проте ЯЦС досліджуваних груп при достовірній різниці було меншим на 15 % у клітин з нігтьового органу дорослих мишей. Ядерця в ядрі були яскраво вираженими, їх кількість в обох виділених культурах клітин становила в середньому 4 на ядро, що є ознакою високої синтетичної активності клітин.

ВИСНОВКИ. Отримані результати свідчать про наявність в культурі *in vitro* вікових відмінностей у морфологічних характеристиках клітин, виділених з нігтьового органу миші, незважаючи на збереження їх високого потенціалу до проліферації *in vivo* впродовж всього життя організму. Підтвердженням цього є значні зміни у показниках площі ядра та загальної площі клітини, однак ЯЦС з віком зменшується менш виражено.

Безопасность и качество биотехнологических продуктов. Параметры оценки.



Яременко Е. Н.

Биотехнологическая лаборатория «Smartcell», Одесса, Украина

В настоящее время достижения такого новейшего направления биомедицины, как клеточные технологии, активно используются в онкологии, лечении болезней печени, неврологических, кардиологических, аутоиммунных и других серьезных заболеваний, а в некоторых случаях они являются практически единственным эффективным способом терапии.

Спектр применения клеточных препаратов широк – от профилактики, диагностики и лечения заболевания до медицинской реабилитации пациента и сохранения беременности.

Наряду с этим, актуальными вопросами остаются вопросы качества и безопасности клеточных технологий.

В ряде стран мира существует многоступенчатая система контроля, гарантирующая качество и безопасность применения клеточного продукта.

Биотехнологическая компания «SmartCell» представляет собой высокотехнологичный лабораторный комплекс, в состав которого входит лаборатория клеточно-тканевого культивирования, а также лаборатории генетического анализа, ПЦР и проточной цитофлуориметрии. Это позволяет нам контролировать качество наших клеточных продуктов на каждом этапе работы.

Система оценки качества и безопасности клеточного продукта в условиях нашей лаборатории включает в себя:

- 1) определение «чистоты» культуры и её пролиферативного потенциала;
- 2) определение генетической стабильности (методом кариотипирования);
- 3) определение способности к дифференцировке и оценка опухолевого потенциала (методом проточной цитофлуориметрии);
- 4) определение микробиологической безопасности (контроль контаминации культуры клеток бактериями и микроскопическими грибами; ПЦР диагностика на отсутствие в клетках возбудителей инфекционных заболеваний; флуоресцентное окрашивание ДНК красителем Hoechst 33258 и ПЦР анализ для определения микоплазмы).

В докладе представлены технологические протоколы оценки качества биопрепаратов, используемые в биотехнологической компании «Smartcell», что позволяет гарантировать их качество и безопасность.

Иммунореактивный статус



Никольский И. С.

ГУ «Институт генетической и регенеративной медицины НАМН», Киев, Украина

Под иммунным статусом понимается содержание в периферической крови определенных элементов иммунной системы без учета вовлечения системы в целом в процессы иммунорегенерации, лихорадки или гипотермии, действия на организм физических или химических факторов. То есть организменные регуляторные механизмы вовсе не попадают в поле зрения. И даже результаты дополнительного выявления гормонов, цитокинов и каких-либо еще регуляторных молекул не будут достаточными для оценки возможности осуществления организмом адекватного запросу иммунного ответа. Иммунный статус в таком случае оказывается действительно статикой, конечно полезной для практического использования, но, тем не менее, он не имеет отношения к кардинальному понятию нормальной и патологической физиологии об иммунологической реактивности. Между тем, именно реактивность, в том числе иммунореактивность, является решающим свойством организма во взаимодействии с окружающей средой и формировании патологии. Пожалуй, одним из главных ее механизмов являются иммунонейроэндокринные отношения, когда в цепочке «гипоталамус – гипофиз – цитокины – гормоны – иммунная система» регуляция может осуществляться в обоих направлениях, а изменение активности в каком-либо одном звене ведет к соответствующим сдвигам в другом (закон сопряженных систем).

При действии на организм патогенов и антигенов первой реагирует иммунная система, которая производит влияющие на гипоталамус цитокины, и в результате последующего нарушения теплообмена возникает лихорадочная реакция с лейкоцитозом, мобилизацией стволовых клеток, перераспределением клеток других типов и изменением их активности. В норме такие неспецифические иммунологические реакции имеют приспособительный и защитный характер. Например, лихорадочная и лейкоцитарная реакции (именно реакция, а не персистентный лейкоцитоз) могут обеспечить базис для эффективной противoinфекционной иммунной защиты.

Таким образом, именно реакция организма в целом во многом определяет эффективность иммунного ответа. После открытий Ч. Дженуэйя об иммунологическом распознавании в природном иммунитете и иерархическом первенстве его по отношению к адаптивному иммунитету стали понятны и механизмы осуществления неспецифической иммунореактивности на уровне иммунной системы в целом.

Из изложенного следует, что исследование иммунного статуса как такового не всегда дает отчетливое представление о неспецифической иммунологической реактивности, а вот оценка способности организма к осуществлению иммунонейроэндокринных реакций безусловно расширит диагностические и лечебные возможности в клинической иммунологии. С целью исследования неспецифической иммунореактивности возможно изучение иммунного статуса до и после введения иммуномодуляторов с относительно известным механизмом действия. В необходимых случаях как тестовые могут быть использованы и хорошо изученные препараты. В упрощенном виде иммунореактивный статус можно представить как два связанных между собой исследования, одно из которых производится до введения раздражителя, а второе осуществляется через оптимальный для действия иммуномодулятора срок.

Дендритные клетки как важный компонент иммунорегенеративной медицины



Гольцев А. Н., Дубрава Т. Г., Бабенко Н. Н., Гаевская Ю. А., Ямпольская Е. Е., Бондарович Н. А.
Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН, Харьков, Украина

Регенеративная медицина – новейшая отрасль медицины, которая формируется на стыке биологии, медицины и инженерии, целью которой является восстановление патологически измененных тканей и органов. Одним из направлений регенеративной медицины является иммунорегенеративная терапия, основанная на уникальных свойствах дендритных клеток (ДК) выступать связующим звеном между реакциями врожденного и адаптивного иммунитета. С одной стороны, они инициируют иммунный ответ, вызывая формирование эффекторных Т-клеток, а с другой – угнетают его, активируя Т-регуляторное звено иммунной системы. Такая пластичность функциональной активности ДК позволяет использовать их с целью коррекции иммунодепрессивных или аутореактивных состояний организма. Варьируя условия *in vitro*, можно получать иммуностимулирующие ДК для лечения онкологических заболеваний или иммунорегуляторные ДК – для лечения аутоиммунных заболеваний. Есть основания полагать, что вектор реализации того или иного пути определяется степенью зрелости ДК (Morelli, 2006).

Первые клинические испытания толерогенных ДК в иммунотерапии аутоиммунных заболеваний показали весьма обнадеживающие результаты, однако молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе их толерогенного действия, остаются неясными. Так, до конца не решен вопрос, какие ДК следует считать толерогенными: незрелые, полузрелые, либо ДК со стойкими толерогенными свойствами, способствующими формированию регуляторных Т-клеток? Кроме того, практически не изучено поведение вводимых толерогенных ДК *in vivo* в организме пациента, внутренняя среда которого на фоне развития воспаления представляет собой мощное иммуномодулирующее микроокружение. Наконец, не существует единого протокола получения толерогенных ДК в лабораторных условиях. В настоящее время с этой целью используются ряд противовоспалительных цитокинов, ростовых факторов, фармакологических средств с толерогенной активностью (дексаметазон, ретиновая кислота и др.), а также генетическая модификация ДК с целью продукции ими иммуносупрессивных субстанций. Полученные в культуре с помощью различных методических подходов толерогенные ДК характеризуются сниженным уровнем экспрессии костимуляторных молекул (CD40, CD80, CD83) и продукции провоспалительных цитокинов (IL-12), повышением экспрессии ингибиторных молекул (PDL1, CD95L, IDO) и выработки противовоспалительных медиаторов (TGF- β , IL-10), а также устойчивостью к воздействию сигналов, приводящих к их созреванию. Однако степень выраженности толерогенного фенотипа имеет зависимость от используемых условий культивирования, поэтому дальнейшие исследования механизмов регуляции процессов созревания ДК позволят получать *in vitro* клетки с заданными толерогенными свойствами.

Таким образом, перспектива применения толерогенных ДК в клинической практике обуславливает отработку стандартного метода их получения, подтверждения стабильности их толерогенного фенотипа, эффективности и безопасности использования в иммунорегенеративной терапии аутоиммунных заболеваний.

Иммунотерапия у пострадавших с ранениями нижних конечностей после сочетанного светового воздействия и препаратов фетоплацентарного происхождения



Климова Е. М.¹, Божков А. И.¹, Вотякова И. А.², Лавинская Е. В.¹, Дроздова Л. А.¹, Иванов В. Н.¹

¹ГУ «Институт общей и неотложной хирургии им. В. Т. Зайцева НАМН Украины», Харьков, Украина

²Медицинский центр «Эмбриотек», Киев, Украина

У пострадавших в результате ранений нижних конечностей развиваются метаболические изменения, вызванные комбинированными негативными воздействиями. Развитие гнойно-септических осложнений часто носит необратимый характер, так как формируется целый ряд метаболических и иммунологических нарушений. Необходим поиск новых подходов к лечению данной категории больных.

ЦЕЛЬЮ РАБОТЫ было изучение иммунокорригирующего действия после комбинированного использования светового воздействия с длиной волны $\lambda = 660$ нм (красный свет) одновременно с аппликацией фетоплацентарного тканевого экстракта на раневую поверхность и внутривенными трансфузиями гемопозитических стволовых клеток кордовой крови.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В работе обследовали пациентов ($n = 7$) с гнойно-септическими осложнениями. Проводили оценку барьерной функции нейтрофилов по степени стимуляции эндоцитоза патогенных микроорганизмов с помощью флуоресцентной микроскопии с использованием красителя акридиновый оранжевый. Также определяли уровень костимулирующих CD4⁺CD28⁺ молекул методом точной цитометрии.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ. После комбинированного лечения (применение красного света с длиной волны $\lambda = 660$ нм и трансфузии гемопозитических стволовых клеток) выявили стимуляцию эндоцитоза фагоцитирующих клеток. Контроль интенсивности денатурации ДНК микроорганизмов в фагоцитирующих клетках у пациентов с гнойными ранами до и после комбинированного воздействия проводили по оценке свечения, возникающего после применения флуоресцентного красителя акридиновый оранжевый. Фиксировали зеленое свечение микробных клеток с нативной ДНК и красное свечение микробных клеток с денатурированной ДНК в результате процессинга антигена.

Также на фоне сочетанного лечения гнойно-септических осложнений у пострадавших в результате ранений нижних конечностей выявили увеличение количества клеток, экспрессирующих костимулирующие молекулы CD4⁺CD28⁺ в среднем до 40 % по сравнению с уровнем до лечения (в среднем 18 %).

ВЫВОДЫ. Сочетанная терапия с применением светового воздействия с длиной волны $\lambda = 660$ нм и внутривенного введения гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови приводит к активации фагоцитоза и нормализации экспрессии костимулирующих молекул CD28 на CD4 T-хелперах. Это является предпосылками к усилению резистентности организма и ускорению заживления ран в короткие сроки.

Ксеногенные стволовые клетки устраняют окислительный стресс и регулируют иммунный ответ на фоне экспериментального Си-индуцированного фиброза



Божков А. И.¹, Климова Е. М.¹, Вотякова И. А.², Иванов В. Н.²

¹НИИ биологии Харьковского национального университета имени В. Н. Каразина, Харьков, Украина

²Медицинский центр «Эмбриотек», Киев, Украина

Про-/антиоксидантная система является одной из регуляторных систем организма. При смещении равновесия в этой системе в сторону прооксидантов может проявляться окислительный стресс, что, в свою очередь, сопровождается перестройкой активности иммунной системы и других систем регуляции, и может приводить к формированию разнообразных патологий. Напротив, смещение равновесия в этой системе в сторону антиоксидантов может приводить к устранению патологий и к эффективному функционированию и других регуляторных систем. Если это так, то регулируя характеристики про-антиоксидантной системы в случае патологических состояний, в частности фиброзе печени, можно тестировать биологически активные соединения.

ЦЕЛЬЮ РАБОТЫ было исследование влияния ксеногенных стволовых клеток на некоторые характеристики активности про-/антиоксидантной иммунной системы на модели Си-индуцированного фиброза печени.

МЕТОДЫ. Эксперименты проводили на интактных крысах линии Вистар и животных с Си-индуцированным фиброзом печени 3-х мес. возраста. Эмбриональные стволовые клетки плацентарного ряда тестировали на стерильность, жизнеспособность и определяли классы дифференцировки. Клетки вводили внутривентально в количестве $2 \cdot 10^6$ на 250 г массы животного.

РЕЗУЛЬТАТЫ. Показали, что развитие фиброза сопровождалось 50 % увеличением содержания гидроперекисей липидов в митохондриях клеток печени и сыворотке животных на фоне ингибирования глутатионпероксидазы. В это же время у животных с фиброзом увеличивалось содержание циркулирующих иммунных комплексов в 2-3 раза и IgA, IgM и пептидов средней молекулярной массы.

Введение ксеногенных эмбриональных стволовых клеток плацентарного ряда животным с фиброзом сопровождалось уменьшением гидроперекисей липидов до интактного уровня, что совпадает с одновременным увеличением на 60 % активности глутатионпероксидазы, нормализует содержание иммуноглобулинов, ЦИК и пептидов средней молекулярной массы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. Ксеногенные стволовые клетки обеспечивали смещение равновесия в про-/антиоксидантной систем в сторону антиоксидантов и нормализовали показатели активности иммунной системы у животных с Си-индуцированным фиброзом.

Вплив гострого холодового стресу на перерозподіл клітин в імунній системі



Семенова Я.-М. О.

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

Одним із важливих чинників розвитку імунодефіцитів є надмірна стресова реакція, що може бути або первинним фактором, або таким, який супроводжує формування багатьох видів патології.

Реакція лімфоцитів залежить від концентрації глюкокортикоїдів. Вплив помірної інтенсивності викликає переважно перерозподіл лімфоцитів. Незрілі кортикальні тимоцити мігрують з тимусу і надходять, головним чином, в кістковий мозок. Сюди ж мігрує певна кількість зрілих Т-лімфоцитів. При цьому функціональна активність лімфоцитів і макрофагів знижується.

При інтенсивних стресових впливах викид кортикостероїдів досягає концентрацій, при яких відбувається апоптоз лімфоцитів. До дії глюкокортикоїдів найбільш чутливі кортикальні CD4⁺CD8⁺ тимоцити, що не експресують протоонкоген bcl-2. В-лімфоцити стійкіші, ніж периферичні Т-клітини. А їх попередники стійкі до дії кортикоїдів. У зв'язку зі збереженням таких клітин, а також стромальних елементів мікрооточення, наслідки стресу швидко нівелюються. Певну роль при цьому відіграють, мабуть, процеси кістковомозкової клітинної мобілізації.

Стресові реакції відтворювали методом холодового стресу у мишей лінії C57BL/6 масою 18-20 г (15 хвилин при +4°C). Стан кровотворної та імунної систем оцінювали через 4 та 24 години після стресування. В результаті розвитку стресової реакції через 24 години у мишей спостерігався виражений лейкоцитоз, що формувалася підвищенням кількості в крові лімфоцитів і гранулоцитів. Одночасно відбувалось зниження цитозу кісткового мозку, що дозволило припустити кістковомозкове походження лейкоцитозу. Рівень еритроцитів у зазначений термін змінювався мало, але кількість ретикулоцитів суттєво зменшувалась. ■

В селезінці через 4 години суттєво зменшувалась кількість клітин в фазі G2/M, що відображає антипроліферативну і проапоптотичну дію гормональних стресових механізмів, яка через 24 години стає помітною в результаті значного підвищення кількості спленоцитів в апоптозі. Більш значне зростання апоптотичних процесів спостерігалось через 24 години в тимусі. Одночасно можна було побачити і значне зменшення кількості проліферуючих тимоцитів.

Кількість клітин в різних фазах клітинного циклу у досліджені терміни в кістковому мозку практично не змінювались, хоча була виражена тенденція до збільшення кількості клітин у проліферативній фазі. На низькому і приблизно однаковому рівні знаходились показники спонтанного апоптозу.

Таким чином, отримані дані можуть свідчити, що гострій холодовій стресовій реакції притаманний виражений лейкоцитоз, який, мабуть, формується в результаті виходу клітин із кістковомозкового, селезінкового і тимусного резервів. Але суттєве підвищення рівня апоптозу серед тимоцитів і спленоцитів може свідчити про роль і цього процесу при стресовому перерозподілі клітин в організмі.

Вплив плазми крові молодих та старих мишей лінії CBA/Са на проліферативну активність лімфоїдних клітин кісткового мозку, тимусу та селезінки в короткострокових культурах



Кирик В. М.^{1,2}, Устименко А. М.^{1,2}, Луценко Т. М.^{1,2}, Бутенко Г. М.^{1,2}

¹ДУ «Інститут геронтології ім. Д. Ф. Чеботарьова НАМН», Київ, Україна

²ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

Актуальною проблемою регенеративної медицини в геронтологічному аспекті є встановлення клітинних та гуморальних механізмів взаємодії трансплантованих клітин різного віку між собою та клітинами ніші реципієнта. Припускають наявність в плазмі крові вік-залежних факторів, які у старому організмі можуть негативно впливати на функціонування донорських стовбурових і прогеніторних клітин та визначати загальну ефективність клітинної терапії. З іншого боку, плазму крові молодого організму розглядають як потенційне джерело ростових факторів та цитокінів, які здатні позитивно впливати на функціонування імунної системи у старих реципієнтів.

МЕТА. Встановити здатність плазми крові молодих та старих мишей впливати на проліферативну активність *in vitro* лімфоїдних клітин кісткового мозку, тимусу та селезінки мишей різного віку.

Матеріал і методи. Клітини кісткового мозку, тимусу та селезінки молодих (4 міс.) та старих (18 міс.) мишей лінії CBA/Са видалляли в стерильних умовах та культивували в живильному середовищі RPMI-1640 (*Sigma*, США) в кількості $5 \cdot 10^3$ на лунку в ізо- та гетерохронних комбінаціях з 5 % вмістом плазми крові тварин відповідного віку (10 мкл на лунку). В лунки клітин контрольних груп вносили такий же об'єм фетальної телячої сироватки (*Sigma*, США). Через 72 год. інкубації (5 % CO₂, t = 37 °C) оцінювали індекс проліферації клітин тимуса, кісткового мозку та селезінки у відповідь на T- і B-мітогени (в фінальній концентрації ConA – 10 мкг/мл і LPS – 20 мкг/мл, відповідно) в МТТ-тесті за метаболічною активністю культур. Оптичну щільність лізату клітин вимірювали при довжині хвилі 590 нм.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ. В короткострокових культурах лімфоїдних мононуклеарних клітин кісткового мозку молодих та старих мишей проліферативна активність достовірно зростає ($p \leq 0,05$) в присутності плазми крові від молодих тварин та не змінюється в присутності плазми старих тварин. Відсутність ефекту від введення плазми старих тварин може свідчити про менший вміст в ній активних гуморальних компонентів з аналогічним стимулюючим ефектом.

При цьому не виявлено достовірного впливу плазми крові від молодих або старих тварин на проліферативну активність короткострокових культур клітин тимусу та селезінки від молодих або старих тварин. Можна припустити, що більший відносний вміст в кістковому мозку саме стовбурових та прогеніторних клітин визначає більш виражену відповідь його культури на вплив факторів плазми, в порівнянні з тимусом та селезінкою.

Подальшого дослідження потребує оцінка ефектів гетерохронного введення плазми крові *in vivo*, що може супроводжуватись активацією або порушенням механізмів специфічної взаємодії стовбурових клітин та наївних лімфоїдних клітин із клітинами лімфоїдної ніші, змінами в механізмах стимуляції, порушеннями синтезу специфічних цитокінів та збільшенням експресії асоційованого зі старінням фенотипу антиген-презентуючих клітин.

ВИСНОВКИ. Плазма крові молодих тварин проявляє стимулюючий ефект на проліферативну активність клітин кісткового мозку молодих та старих мишей, не впливаючи при цьому на клітини тимусу та селезінки. Отримані дані в перспективі можуть мати важливе прикладне значення при розробці підходів до відновлення функціонального стану імунної системи при старінні.

Потенціювання імунорегенеративної і радіозахисної активності гемопоетичних клітин-попередників контактом з мультипотентними стромальними клітинами тимусу



Нікольська К. І.

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

В регенеративній медицині задача відновлення імунної системи є однією з найбільш актуальних, оскільки широко розповсюджені первинні і вторинні імунodefіцити, що формуються на рівні гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) і гемопоетичних клітин попередників (ГКП), потребують з метою лікування трансплантації названих клітин. Останнім часом у цьому напрямку найбільш перспективні дослідження зосереджені на сумісному застосуванні ГКП і мультипотентних стромальних клітин.

Відомо, що кістковомозкові МСК являються основним компонентом однойменних ніш ГСК, та здійснюють підтримку і сприяють диференціюванню стовбурових клітин з реалізацією їх мультипотентності (Shofield R., 1978; Ding L., Morrison S., 2013; E. I. Nикольская, Г. М. Бутенко, 2016)

Тимусні МСК вивчені значно менше. Але є переконливі докази того, що вони необхідні для ембріонального органогенезу тимусу (Sunjara R. K. et al., 2000), беруть участь у формуванні дорослого тимусу (Foster A., 2008) і створенні тимусних ніш, де підпадають під негативну і позитивну селекцію клітини певних стадій диференціювання (Savion A. et al., 1989). Завдяки мембранній спорідненості МСК тимусу також беруть участь в контролі міграції тимоцитів (Savada M. et al., 1992)

Яскравим прикладом кооперації ГСК і МСК стало також створення так званих «декстеровських» культур, коли виявилось, що догтривала підтримка росту і функціонування ГСК *in vitro* може здійснюватися на підложці з МСК. Факт високої мембранної спорідненості МСК і ГСК нам вдалося підтвердити створенням *in vitro* у простих умовах фібробласто-лімфоцитарних асоціацій у вигляді розеток з центральною розташованою стромальною клітиною. Надалі методика була використана для здійснення контактної взаємодії МСК і ГКП і вивчення її впливу на імунорегенеративну активність ГКП кісткового мозку і фетальної печінки на моделі кістково-мозкового синдрому у летально опромінених мишей СВА.

Виявилось, що сингенна трансплантація саме індукованих стромальними клітинами тимусу ГКП приводить, у порівнянні з нормальними ГКП, до значного підвищення виживаності тварин через 16 тижнів спостереження і подовження середньої тривалості життя. У обстежених мишей через 4 тижня після трансплантації індукованих ГКП значною мірою відновлювались клітинні показники тимусу і кісткового мозку, підвищувалась реакція бласттрансформації лімфоцитів і природна цитотоксичність, підсилювалась реакція гіперчутливості уповільненого типу, зростала кількість антитілоутворюючих клітин в селезінці, а також рівень сироваткових антитіл.

Таким чином, проведені дослідження показали, що контактна взаємодія з МСК тимусу ефективно потенціює імунорегенеративну і радіозахисну активність ГПК.

Роль контактної взаємодії ГСК і МСК тимусу у формуванні імунорегенеративної активності клітинних трансплантатів



Нікольський І. С., Нікольська В. В., Демченко Л. І., Тарануха Л. І., Семенова Я.-М. О., Мовчан О. С.

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

Національна медична академія післядипломної освіти імені П. Л. Шупика, Київ, Україна

Мультипотентні стромальні клітини (МСК) створюють мікрооточення для розвитку гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК) у кістковому мозку, тимусі, іноді на периферії, а також забезпечують підтримку ГСК *in vitro*. Значну роль у цих процесах відіграє контактна взаємодія МСК і ГСК (Нікольська Е. І., Бутенко Г. М., 2016), тому наразі розробка методів трансплантації цих клітин розглядається як перспективний підхід до регенерації імунної системи.

Вивчали вплив трансплантації клітин кісткового мозку (ККМ) (10^6), МСК тимусу ($5 \cdot 10^4$), котрансплантації ККМ і МСК тимусу в різні ретроорбітальні синуси, індукованих контактом з МСК тимусу ККМ, котрансплантації МСК тимусу ($5-18 \cdot 10^4$) з приєднаними до них клітинами високоафінної фракції ККМ (10^6) на регенерацію імунної і кровотворної систем мишей при викликаному циклофосфаном (200 мг/кг одноразово) імунodefіциті.

Всі клітинні трансплантати істотно впливали на регенерацію імунної та кровотворної систем. Клітини проявляли властиву їм дію, яка характеризувалася певним спектром змін в імунній та кровотворній системах. Вплив котрансплантації ККМ і МСК тимусу не був простою сумацією дії клітин, а набував особливостей, як притаманних окремим клітинам, так і появою нових характеристик, і обумовлених, мабуть, розвитком складних кооперативних процесів у регенеруючому організмі. Сильний, часто вирішальний, вплив на активність клітин здійснює контактна взаємодія ККМ і МСК тимусу. Характерною дією нормальних ККМ можна вважати позитивний вплив на регенерацію червоної крові. Індуковані МСК тимусу ККМ не впливали на червону кров, зате мали виражений негативний вплив на РБТЛ, природну цитотоксичність, формування гіперчутливості сповільненого типу (ГСТ) і збільшували кількості клітин у апоптозі. Навпаки, нормальні МСК тимусу мали виражений позитивний вплив на поглинальну активність макрофагів, бактерицидність в НСТ-тесті, РБТЛ, природну цитотоксичність і формування антитілоутворюючих клітин. Ефект котрансплантації ККМ і МСК тимусу складалася з чотирьох частин: стимуляція червоної крові (як при дії ККМ), пригнічення активності РБТЛ (як при впливі індукованих ККМ), нормалізація рівня антитілоутворення (як при дії МСК тимусу) і стимуляція формування ГСТ, яка є рисою, притаманною саме котрансплантації. Навпаки, трансплантація асоціацій (ККМ – МСК тимусу) приводила до пригнічення ГСТ.

Таким чином, результат впливу трансплантації ГСК і МСК на регенерацію імунної системи при циклофосфановому імунodefіциті визначається різними якими самими клітин певного типу, їх контактною взаємодією та, можливо, ситуацією, яка складається в організмі при певному ураженні імунної системи.

Мембранна спорідненість гемопоетичних і мультипотентних стромальних клітин як можливий фактор впливу на лінійне диференціювання стромальних клітин



Демченко Д. Л.

ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

Показано, що контакт гемопоетичних клітин, які мають високу мембранну спорідненість до мультипотентних стромальних клітин (МСК) тимусу *in vitro* стимулює гемопоез і регенерацію імунної системи (Нікольський І. С. та співавт., 2016). Але не відомо, чи змінюються при мембранному контакті властивості лише гемопоетичних клітин, чи активуючі сигнали можуть проходити і у зворотньому напрямку до МСК. Якщо мембранна взаємодія тимоцитів з МСК потенціює останні до остеогенного диференціювання, як було нами показано раніше, можна припустити, що зміни в процесі лінійного диференціювання визначаються інтенсивністю взаємодії клітин і ефективніший вплив будуть здійснювати лімфоцити з найбільш вираженою спорідненістю до МСК.

Формування клітинних асоціацій у вигляді фібробласто-лімфоцитарних розеток (ФЛР) здійснювали за методом Нікольського І. С. і співавт. (2012). Остеогенне і адипогенне диференціювання МСК тимусу мишей лінії C57BL/6 проводили за стандартним методом у спеціальних культуральних середовищах. В результаті спостерігали ефективне диференціювання МСК тимусу по остео- і адипогенному напрямкам.

Остеогенні і адипогенні клітини, як і неіндуковані МСК тимусу, використовували для постановки ФЛР з сингенними тимоцитами, спленоцитами, клітинами лімфатичних вузлів і ККМ. У всіх комбінаціях спостерігалось формування ФЛР. Значно більш вираженим воно було між тимоцитами і неіндукованими МСК тимусу, а також остеобластами і найменш інтенсивним між ККМ і неіндукованими МСК тимусу, а також адипоцитами; у поєднанні «остеобласти + тимоцити» утворювалась найбільша кількість ФЛР (64,3 %), а при взаємодії «адипоцити + ККМ» – найменша (15,5 %).

Таким чином, отримані дані показали, що саме тимоцити, які потенціують остеогенне диференціювання МСК тимусу, остеобласти і МСК проявляють найбільшу мембранну спорідненість, що підтверджує участь контактної взаємодії клітин у процесах лінійного диференціювання МСК.

Мезенхімальні стовбурові клітини в умовах дії малих доз іонізуючої радіації



Руссу І. З., Родіонова Н. К., Білько Н. М.

Національний університет «Києво-Могилянська академія», Київ, Україна

Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р. Є. Кавецького НАН України, Київ, Україна

Серед стовбурових клітин кісткового мозку людини присутні, зокрема, гемопоетичні та мезенхімальні клітини, що дають початок, відповідно, кровотворним клітинам та стромальним клітинам гемопоетичного мікрооточення. Мезенхімальні стовбурові клітини кісткового мозку вважалися доволі радіорезистентними у порівнянні із кровотворними клітинами, проте серед них були виявлені групи клітин, що можуть володіти високою радіочутливістю. Тому метою даного дослідження було вивчення особливостей функціонування мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку щурів при дії іонізуючої радіації в малих дозах (1 Гр) у культурі клітин *in vitro*.

Дослідження функціональної активності мезенхімальних стовбурових клітин, підданих дії іонізуючої радіації, у культурі *in vitro* передбачає оцінку ефективності їх колонієутворення. З цією метою суспензію клітин кісткового мозку опромінених щурів Wistar із застосуванням живильного середовища DMEM вносили у культуральні флакони та культивували протягом двох тижнів. Крім того, вивчали здатність цих клітин формувати стромальні фідерні шари та підтримувати процес кровотворення у культурі *in vitro*. Для цього використовували гелеві дифузійні камери з кістковим мозком неопромінених тварин у середовищі RPMI-1640, занурені у лунки культурального планшета із середовищем і заздалегідь приготованим фідерним шаром зі строми опромінених тварин, та культивували протягом 18 діб із заміною половини культурального середовища кожні 3 доби.

В результаті проведених культуральних досліджень було здійснено оцінку функціональної активності мезенхімальних стовбурових клітин кісткового мозку та їх найближчих нащадків – клітин-попередників при дії на них опромінення іонізуючою радіацією у малих дозах. Загальний показник ефективності колонієутворення мезенхімальних клітин на 14-ту добу культивування *in vitro* свідчив про виражений вплив опромінення на ці клітинні елементи мікрооточення. Так, у дослідній групі тварин кількість колонієутворюючих одиниць становила $(3,30 \pm 0,48)$ на 1 млн. експлантованих клітин, тоді як у групі контролю цей показник був у півтора разу вищий і становив $(5,10 \pm 0,74)$ на 1 млн. культивованих клітин.

Також було з'ясовано, що фідерні шари, сформовані опроміненими мезенхімальними клітинами, мають знижену здатність підтримувати процес гемопоезу в культурі *in vitro*. Так, при оцінюванні показників ефективності колонієутворення гемопоетичних клітин-попередників у гелевих дифузійних камерах на фідерних шарах було виявлено зменшення цих показників у порівнянні з контролем – $(9,60 \pm 0,97)$ та $(15,02 \pm 0,84)$ КУО на 10^5 експлантованих клітин, відповідно.

Отже, можна говорити про суттєві зміни функціональної активності мезенхімальних стовбурових клітин та клітин-попередників кісткового мозку в умовах дії на організм лабораторних щурів іонізуючої радіації у зазначеній дозі. Подальші дослідження радіочутливості цих клітин є доцільними у зв'язку з можливістю їх застосування у терапії різноманітних патологічних станів організму людини, у тому числі при лікуванні захворювань системи гемопоезу.

Гетерогенність гемопоетичних клітин-попередників у культурі клітин *in vitro*



Пахаренко М. В., Сорочинська Х. І., Білько Н. М., Білько Д. І.
Національний університет «Кієво-Могилянська академія», Київ, Україна

Гемопоез – це складний, регульований процес, що включає низку послідовних етапів диференціювання примітивних клітин до стадії зрілості. Контроль гемопоезу зумовлений наявністю величезної кількості факторів мікрооточення, які доповнюють один одного, створюючи сприятливі умови для росту та розвитку клітин крові. Стабільність та збалансованість гемопоетичної системи забезпечується явищем самооновлення, яке полягає у постійній заміні зрілих клітин на більш примітивні у кожному паростку кровотворення [Чертков та співав., 2005; Чайковський та співав., 2014]. Окремої уваги заслуговує питання пошуку джерел гемопоетичних стовбурових клітин, класичним представником яких виступає кістковий мозок [Staal et al., 2011]. Фетальна печінка є одним з перспективних джерел гемопоетичних стовбурових клітин. Вивчення культуральних та цитологічних особливостей фетальної печінки як органа ембріонального кровотворення людини дає змогу отримати результати, які забезпечують вагомий внесок у процес розуміння явища кровотворення та особливостей його регуляції. Саме тому метою роботи було визначення особливостей культуральних та цитологічних характеристик гемопоетичних клітин-попередників з фетальної печінки ембріону людини.

Об'єктом дослідження була криоконсервована суспензія клітин фетальної печінки 7-11-тижневого ембріону людини. Для дослідження фетальної печінки використовували зразки, які були отримані з ембріонів після планового переривання вагітності за соціальними показаннями та при наявності інформованої письмової згоди у термін із 7-го по 11-й тиждень вагітності. Перший етап дослідження полягав у культивуванні суспензії клітин фетальної печінки у середовищі DMEM з напіврідким агаром протягом 10-14 діб. Отримані клітинні агрегати – кластери та колонії – піддавали мікроскопічному дослідженню під інвертованим мікроскопом. На наступному етапі проводили вилучення колоній, їх забарвлення за Паппенгеймом та мікроскопію. Паралельно проводили дослідження первинної та культивованої суспензії клітин фетальної печінки на препаратах, отриманих на цитоцентрифузі «Shandon Cytospin 3» (США), з подальшим їх забарвленням за Паппенгеймом та мікроскопією.

Шляхом культивування у напіврідкому агарі суспензії клітин фетальної печінки людини було отримано гранулоцитарні (КУО-Г), макрофагальні (КУО-М), гранулоцитарно-макрофагальні (КУО-ГМ) та еритроїдні (КУО-Е, БУО-Е) колонії гемопоетичних клітин-попередників. За допомогою морфологічного аналізу препаратів первинної суспензії гемопоетичних клітин фетальної печінки людини було показано значне переважання представників еритроїдного паростку кровотворення – 77 %. У роботі застосовано оригінальний метод фіксації колоній, отриманих з колоній гемопоетичних клітин-попередників фетальної печінки після двотижневого культивування, що дозволило диференціювати колонії за їх походженням.

Закономірності функціонування гемопоетичної стовбурової клітини та клітин-попередників у процесі перебігу хронічної мієлоїдної лейкемії



Білько Н. М., Дяченко М. В., Дягіль І. С., Білько Д. І.
Національний університет «Кієво-Могилянська академія» Київ, Україна

Вивчення механізмів регуляції та підтримання протягом життя макроорганізму його основних властивостей за фізіологічних умов і при розвитку низки патологічних станів залишається однією з ключових проблем клітинної біології (Чертков І. Л. і соавт., 2005; Lin E. N., et al., 2008). Хронічна мієлоїдна лейкемія (ХМЛ) є клональним онкологічним захворюванням, яке пов'язують з наявністю Філадельфійської хромосоми та, як наслідок, з утворенням химерного гену *bcr-abl*, продуктом якого є активна тирозиназа *Bcr-Abl*, що відіграє основну роль у патогенезі ХМЛ (Specchia G. et al., 1995, 2005; Глузман Д. Ф., 2008). Дані, отримані за останні роки, все більше дозволяють припускати вирішальну роль не лише гемопоетичних стовбурових клітин (ГСК), але й клітин-попередників кісткового мозку (КМ) як у виникненні, так і у прогресуванні захворювання. Однак інформації щодо функціональних особливостей гемопоетичних клітин-попередників кісткового мозку у різних фазах захворювання та за умов терапевтичного інгібування тирозинкінази *Bcr-Abl* на сьогодні недостатньо, а отримані дані суперечливі.

Виходячи з вищевикладеного, ми вважали за доцільне провести морфофункціональний аналіз кровотворних клітин-попередників, вилучених із кісткового мозку, в процесі перебігу ХМЛ. Аналіз отриманих результатів свідчив про здатність гемопоетичних клітин-попередників при ХМЛ до колонієутворення клітинних агрегатів у культурі з напіврідким агаром та до підтримання довготривалої суспензійної культури без додавання екзогенних ростових факторів в залежності від відповіді на вплив інгібітора тирозинкінази *Bcr-Abl* (ІТК). Доведено, що показники проліферативного потенціалу та клітинного складу колоній, утворених при культивуванні у напіврідкому агарі, можуть слугувати не лише для оцінки стану кровотворної системи на момент проведення дослідження, але і бути ранніми предикторами прогресування патологічного процесу. Показники морфофункціональних характеристик стовбурових клітин та їх нащадків (зокрема, рівень проліферативного потенціалу стовбурових клітин та клітин-попередників КМ, склад клітинних агрегатів) можуть стати підґрунтям для додаткової оцінки можливості прогресування ХМЛ.

Молекулярно-генетичні критерії прогнозування ефективності трансплантації гемопоетичних стовбурових клітин у хворих на множинну мієлому



Мінченко Ж. М.¹, Мішаріна Ж. А.², Дмитренко О. О.¹, Любарєць Т. Ф.¹, Хоменко В. І.³

¹ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України», Київ, Україна

²Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна

³Київський центр трансплантації кісткового мозку, Київ, Україна

МЕТА. Визначення молекулярно-генетичних критеріїв прогнозування ефективності трансплантації ТСКПК для вдосконалення алгоритму ведення хворих на ММ на різних етапах лікування.

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ. Обстежено 61 хворого на множинну мієлому. Дослідження проводились із використанням молекулярно-цитогенетичних, імуногенетичних, гематологічних та статистичних методів.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ. Світові набутки лікування множинної мієломи (ММ) із застосування трансплантації аутологічних стовбурових клітин периферичної крові (ауто-ТСКПК) свідчать про неоднорідність віддалених результатів трансплантації – досягнення і утримання повної ремісії, або прогресування процесу у найкоротші строки після терапії, що потребує індивідуального підходу при вирішенні питання про доцільність застосування методу. В цьому контексті велике значення має генетичний супровід хворих, оскільки патогенетичний субстрат захворювання в основному складають саме генетичні аномалії. Встановлено, що алелі *HLA-B*27*; *HLA-B*40*; *HLA-DRB1*04*; *HLA-DQB1*0302* хворих на ММ асоційовані з високим ризиком рефрактерності до високодозової ХТ, а позитивна відповідь на трансплантацію асоційована з носійством алелей *HLA-C*06* і *HLA-DQA1*0101*. Наявність у хворих двох та більше аномальних клонів, генетичної аномалії, хромосом 12 (трисомія), 13 (делеція 13q14, 13q34), транслокація t(4; 14), а також 17 (делеція 17p13.1) мають достовірний кореляційний зв'язок з частковою відповіддю на терапію (Ro Spirman = 0,41, p < 0,05) або з ускладненим перебігом захворювання.

ВИСНОВКИ. Отримані результати свідчать про доцільність внесення молекулярно-генетичного супроводу у протокол обстеження хворих на ММ на різних етапах лікування із застосуванням ауто-ТСКПК.

Перспективи клітинної терапії серцево-судинних захворювань



Кирик В. М.¹, Устименко А. М.¹, Шаблій В. А.², Немтінов П. І.², Руденко С. А.³, Бутенко Г. М.¹, Руденко А. В.³

¹ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

²Інститут клітинної терапії, Київ, Україна

³Національний Інститут серцево-судинної хірургії ім. М. М. Амосова НАМН, Київ, Україна

Захворювання серцево-судинної системи ішемічного генезу посідають одне з провідних місць за показниками інвалідазації та смертності серед працездатного населення, зокрема, є причиною 17,3 мільйона смертей за рік у світі. Прямі та непрямі витрати на лікування таких пацієнтів становлять більше 320 мільярдів доларів США. Навіть найсучасніші медикаментозні та хірургічні методи лікування не завжди дозволяють забезпечити компенсацію проявів прогресуючої серцевої недостатності і часто єдиною надією для таких пацієнтів залишається лише трансплантація серця.

У сучасній регенеративній медицині клітинні технології виходять на новий етап широкого клінічного застосування. Стовбурові клітини привертають особливий інтерес клініцистів як новий ефективний інструмент для регенерації пошкоджених тканин, в тому числі і міокарда. Мультипотентні стовбурові клітини та прогенітори з різних джерел можуть бути використані з метою покращення перфузії міокарду та підвищення скоротливої функції серця у пацієнтів з хронічною ішемічною хворобою серця, що супроводжується важкою серцевою недостатністю. У світлі етичних проблем, пов'язаних з використанням ембріональних і фетальних стовбурових клітин та недостатньою ефективністю технологій отримання індукованих плюрипотентних клітин доступними джерелами стовбурових клітин дорослого організму для регенерації міокарда можуть виступати кістковий мозок, жирова тканина, пуповинна кров, плацента.

Активно ведуться пошуки нових безпечних і ефективних методів отримання, культивування і трансплантації клітин при захворюваннях серцево-судинної системи. Враховуючи, що в патогенезі зниження скоротливої здатності міокарда значну роль відводять дисфункції резидентних прогеніторів, тому перспективними вважають підходи з виділення, нарощування та застосування саме тканино-специфічних стовбурових клітин серця – cardiac stem cells (CSCs). Численні попередні дослідження на тваринах продемонстрували високий регенеративний потенціал даного типу клітин та їх комбінації з іншими стовбуровими клітинами і стали передумовою перевірки їх ефективності у людей. Використання тканино-специфічних прогеніторів в комбінації з іншими типами клітин може підвищити ефективність їх регенеративного потенціалу та безпеки застосування.

В останнє десятиліття понад 5000 пацієнтів у всьому світі були залучені в клінічні випробування з оцінки ефективності клітинної терапії при різних серцево-судинних захворюваннях. Накопичені дані щодо клітинної терапії свідчать про її безпеку та ефективність не лише у дорослих пацієнтів з ішемічною хворобою серця, кардіоміопатіями, хронічною серцевою недостатністю, а й навіть у дітей з вродженими вадами серця. Розробка вітчизняних клітинних препаратів та технологій їх трансплантації з доведеною клінічною ефективністю дозволить значно покращити показники комплексного лікування пацієнтів з захворюваннями серцево-судинної системи, що має суттєве соціальне та економічне значення.

Ембріодні тільця – ефективна модель диференціювання плюрипотентних стовбурових клітин в кардіоміоцитарному напрямку



Будаш Г. В., Білько Д. І.
Національний університет «Кієво-Могилянська академія», Київ, Україна

Плюрипотентні стовбурові клітини мають властивість до самовідновлення та диференціювання в клітини трьох зародкових шарів. Одним з основних методів їх диференціювання є отримання ембріодних тілець. Ембріодні тільця – це тривимірні агрегати клітин, які нагадують ранні етапи розвитку ембріона. Формування ембріодних тілець впливає на процес диференціювання та проліферації клітин всередині агрегатів. Відомо, що розмір ембріодних тілець впливає на ефективність та спрямування процесу диференціювання плюрипотентних клітин. Тому важливим є контроль розміру утворених ЕТ у культурі клітин *in vitro* та забезпечення умов відтворення цього процесу.

Серце дорослої людини складається переважно з повністю диференційованих кардіоміоцитів. Клітини, які втрачаються з віком та внаслідок перенесених серцево-судинних захворювань, не можуть бути замінені новоутвореними. Отримання великої кількості кардіоміоцитів є необхідним для вирішення задач фундаментальної біології, фармацевтичної промисловості та регенеративної медицини. Кардіоміоцити, ефективність та безпека застосування яких перевірені та досліджені, є необхідною умовою для розвитку клітинної терапії. Одним з джерел отримання кардіоміоцитів є плюрипотентні стовбурові клітини. Відповідно до концепції трьох R дослідники прагнуть розробити нові моделі, які дозволять скоротити кількість досліджень з використанням живих тварин. Особливо це має значення для клінічних випробувань, де кількість використаних тварин є значною. Тому спостерігається значний попит та необхідність в розробці нових тривимірних моделей культури тканин, які можуть імітувати розвиток ембріона або давати можливість дослідити різні етапи процесу диференціювання клітин. Тривимірні моделі є значно кращими, ніж використання моношарових культур, адже під час їх формування відбувається утворення міжклітинного матриксу та формування міжклітинних взаємодій в більш природній спосіб, ніж в штучних умовах формування моношарових культур. В даний час найбільш популярним методом отримання тривимірних клітинних культур є агрегація клітин у сфероїди. Одним з таких методів є утворення ембріодних тілець.

В роботі була використана генетично модифікована лінія індукованих плюрипотентних клітин миші, отримана з фібробластів кінчика хвоста миші під дією індукуючих факторів *c-myc*, *Klf4*, *Sox2*, *Oct4*, *Nanog*. Клітини експресували пуроміцин-N-ацетил-трансферазу та IRES-зв'язаний зелений флуоресцентний протеїн (GFP) під контролем кардіоспецифічного α -MHC промотора. Для отримання гомогенних ЕТ певного визначеного розміру було застосовано спеціальні планшети, які дають можливість отримати ЕТ, які складаються з визначеної кількості клітин. Розмір сформованих ЕТ залежав від щільності посіву (250, 500, 750, 1000 та 2000 клітин) та суттєво впливав на ефективність диференціювання. Щільність посіву плюрипотентних стовбурових клітин в кількості 500 клітин виявилась оптимальною для отримання кардіоміоцитів з ЕТ. Цей феномен може бути пов'язаним з співвідношенням площі поверхні, вкритої ендодермальними клітинами, та шаром мезодермальних клітин в ЕТ, дифузією розчинних молекул та міжклітинною адгезією.

Біологічні властивості мезенхімальних стовбурових клітин Вартонового студня при культивуванні в газових сумішах з фізіологічними концентраціями кисню



Шувалова Н. С.¹, Топорова О. К.^{1,2}
¹ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна
²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) на сьогоднішній день вважаються перспективним інструментом клітинної терапії. Важливим об'єктом для дослідження у даній галузі є МСК Вартонового студня (МСК-ВС) пупкового канатика, через етичні причини та унікальні імунomodulatory та паракринні властивості.

Особливістю МСК, незалежно від джерела походження, є їх локалізація в ділянках тканини із зниженим вмістом кисню. Таким чином, загальноприйняті умови культивування є «гіпероксичними» для МСК, і є джерелом оксидативних пошкоджень, що призводять до старіння та втрати клітинами терапевтично значущих рис в процесі культивування. Численні дослідження показали, що культивування в умовах фізіологічних концентрацій кисню підвищує потенціал проліферації МСК та сповільнює їх старіння. Важливим методом збереження клінічно значущих властивостей МСК, що дозволяє розширити їх терапевтичний потенціал, є генетична модифікація МСК: трансдукція або трансфекція цільовими генами за допомогою різних вірусних або плазмідних конструкцій. Об'єднанню цих важливих технологічних засобів і присвячена доповідь.

Метою наших досліджень була оптимізація та дослідження ефектів культивування МСК-ВС при фізіологічних концентраціях кисню, у різних газових сумішах: на основі азоту та на основі інертного газу аргону, який, за відомими з літератури даними, має цитопротекторні властивості. Було показано, що МСК-ВС, культивовані при 3 % кисню, в обох сумішах мають вищий проліферативний потенціал та більш ефективно зберігають характерні морфологічні особливості МСК при субкультивуванні. Також було показано, що ефекти сумішей децю відрізнялись залежно від особливостей субкультивування культури. ▶

❑ Окремим завданням було оптимізувати метод невірусної трансфекції МСК-ВС в умовах культивування у газових сумішах із зниженою концентрацією кисню. Дослідження показало, що умови помірної гіпоксії дозволяють значно збільшити процент трансфікованих клітин і, таким чином, є перспективним методом підвищення ефективності невірусної трансфекції МСК.

Отримані нами дані свідчать про перспективність застосування фізіологічних концентрацій кисню як методу вирішення широкого спектру завдань культивування МСК-ВС.

Характеристика імуногенності трансплантованих МСК Вартонового студня пуповини людини у ксеногенних системах *in vivo*



Ковальчук М. В.^{1,2}, Шувалова Н. С.¹, Похолоенко Я. О.^{1,2}, Дерябіна О. Г.¹, Драгулян М. В.², Кордюм В. А.^{1,2}

¹ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

²Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) викликають підвищений інтерес в регенеративній медицині, оскільки вони мають здатність мігрувати в сайти пошкодження тканин, можуть диференціюватися в різні типи клітин, мають імуномодулюючі властивості, легко виділяються і масштабуються в умовах *ex vivo*. МСК модулюють імунні відповіді в організмі і змінюють перебіг різних запальних захворювань, тому часто терапевтичний ефект МСК здійснюється через їх імунорегуляторні функції. Той факт, що МСК *in vitro* можуть пригнічувати проліферацію як сингенних, так і алогенних лімфоцитів, а також уникати імунного нагляду при трансплантації, дав надію на те, що МСК можна використовувати в клініці як «універсальні» імунопривілейовані донори біологічно активних речовин, ігноруючи відмінності по головному комплексу гістосумісності (ГКГ). З іншого боку, дослідження на лабораторних тваринах показали, що алогенні МСК запускають донор-специфічні імунні реакції у реципієнта.

Оцінка імуногенності МСК людини, які використовуються для алогенної клітинної терапії, досить складна через відсутність адекватних моделей, які важко створити внаслідок технічних і етичних обмежень. Щоб тестувати імуногенність МСК людини *in vivo*, була створена модель «гуманізованої» миші. Проте, такі тварини не завжди можуть бути доступними для багатьох лабораторій. МСК Вартонового студня пуповини людини за літературними джерелами відносять до найбільш гіпо-імуногенних МСК. Ймовірно, що умови культивування, експансії, праймування *in vitro*, мікрооточення в тканинах реципієнта *in vivo* будуть впливати на імуногенність цих клітин та безпеку їх застосування.

Ми підійшли до вивчення імуногенності МСК Вартонового студня пуповини людини в умовах *in vivo*, визначаючи час збереження трансплантованих МСК у ксеногенних системах за допомогою детекції специфічних послідовностей ДНК людини та оцінюючи кількісні зміни в окремих популяціях лейкоцитів модельних тварин у часі. Були досліджені тварини зі змодельованим остеоартритом, експериментальним аутоімунним енцефаломієлітом, атрофічним ринітом. МСК вводили системно, локально шляхом ін'єкції суспензії клітин, а також підривно у складі колагенового матриксу.

Результати аналізу кількісних змін окремих популяцій лейкоцитів показали однозначне впізнавання МСК клітинами імунної системи реципієнта, про що свідчить збільшення пулу нейтрофілів в периферичній крові, що було відзначено і в інших роботах. Спостерігалось достовірне збільшення лімфоцитів в групі інтактних тварин після введення МСК. Аналіз специфічних послідовностей ДНК людини в тканинах модельних тварин показав вплив мікрооточення на виживання трансплантованих клітин *in vivo*, що опосередковано може свідчити про імуногенність МСК Вартонового студня пуповини людини та їх взаємодію з імунною системою. Колагеновий матрикс та інтракальне введення МСК сприяли більш тривалому виживанню клітин *in vivo*.

Визначення впливу різних кріоконсервантів на життєздатність та проліферативну активність МСК пуповини



Дерябіна О. Г.¹, Пічкур Л. Д.², Шувалова Н. С.¹, Вербовська С. А.², Маслова О. О.¹, Танасійчук І. С.³, Михайленко Л. П.³

¹ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

²ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова НАМН України», Київ, Україна

³ТОВ «Медичний центр «Гемафонд», Київ, Україна

Останнє десятиліття відрізняється активним розвитком технологій збереження клітин та тканин. Найчастіше для їх збереження застосовують метод кріоконсервування. Важливим питанням при кріоконсервуванні клітин є вибір кріопротектора – речовини, що забезпечує збереження властивостей клітини у незміненому вигляді протягом періоду кріоконсервації. На сьогодні найбільш широко використовується диметилсульфоксид (ДМСО), що має добре вивчені механізми дії. Цей кріоконсервант є стандартним і для комерційного збереження клітин, і для наукових досліджень. Однак, при застосуванні ДМСО як кріопротектора можливі певні небажані реакції ❑

і препарат не сертифікований для внутрішнього застосування в лікуванні пацієнтів. Вказані факти спонукали до пошуку альтернативних речовин, що можуть захищати клітину від ушкоджень, викликаних наднизькими температурами, та бути безпечними для подальших маніпуляцій з клітинами, у тому числі – для введення в організм пацієнта.

Зважаючи на перспективу клінічного застосування мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) пуповини людини, постає питання вибору оптимального методу їх тривалого зберігання (кріоконсервування) з урахуванням режиму заморожування, виду кріопротектора і часу зберігання. У зв'язку з цим нами проводиться робота по оптимізації умов кріоконсервації та кріозберігання цього типу клітин, перші результати якої представлені в даному повідомленні.

Проводили кріоконсервацію МСК з пуповини людини на рівні 2-го пасажу поза організмом. Клітини в кількості $1 \cdot 10^6$ заморожували на програмному заморожувачі зі швидкістю зниження температури 1°C на хвилину з використанням різних середовищ для кріоконсервування. Стандартне середовище, з яким порівнювали ефективність використання інших, містило 10 % ДМСО та 90 % фетальної бичачої сироватки (ФБС). У складі дослідних середовищ знаходився або ДМСО у меншій концентрації (3-4 %) з додаванням трегалози, сахарози, етиленгліколю чи їх комбінацій, та ФБС, або вищезазвані компоненти зовсім без ДМСО. Клітини зберігались в рідкому азоті протягом 4 тижнів, після чого були розморожені за стандартною методикою та проаналізовані на відсоток живих/мертвих клітин та на ефективність мультиплікації *in vitro*.

Було показано, що при використанні стандартного середовища з 10 % ДМСО життєздатними виявились 97 % кріоконсервованих МСК. Трохи нижчим (94 %) виявився даний показник при зберіганні клітин в середовищі, яке містило 4 % ДМСО + 6 % трегалози + 90 % ФБС. У всіх інших варіантах відсоток виживання клітин був більш низьким. Здатність до мультиплікації, яку визначали за ефективністю росту при однаковій дозі посіву клітин, корелювала з відсотком живих клітин після розморожування.

Був зроблений висновок про можливість зниження концентрації ДМСО при кріоконсервуванні МСК пуповини при умові додавання до середовища для заморожування трегалози. Наступні дослідження направлені на вивчення подальшого зниження концентрації ДМСО, а також збереження терапевтичних властивостей МСК після кріоконсервування в різних середовищах.

Обґрунтування і перспективи застосування культивованих клітин амніотичного епітелію в лікуванні стеатогепатиту і цирозів печінки



Манжалій Е. Г.^{1,3}, Губар О. С.^{3,4}, Зубов Д. О.^{2,3}, Васильєв Р. Г.^{2,3}, Злацька А. В.^{2,3}, Родніченко А. Є.^{2,3}, Грицик В. Ф.³

¹Національний медичний університет імені О. О. Богомольця, Київ, Україна

²ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

³Медична компанія *ilaya*®, Київ, Україна

⁴Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, Україна

Застосування клітинної терапії при захворюваннях печінки існує в регенеративній медицині вже понад 20 років, але дотепер дуже незначна кількість пацієнтів отримує таку експериментальну терапію. Причини незначного використання клітин за даної патології частково пов'язані з недоступністю гепатоцитів. Альтернативним клітинним джерелом виявились клітини амніотичного епітелію (КАЕ). Наразі показана їх ефективність у тварин в межах доклінічних досліджень при таких патологічних станах, як метаболічні захворювання печінки, гостра печінкова недостатність, фіброз [Strom S. C. et al., 2013]. КАЕ володіють терапевтичними властивостями, ймовірно, за рахунок ефекту заміщення необхідних печінкових ферментів та протеїнів, котрі ці клітини здатні продукувати при їх нестачі в цільовому органі. Також відомо, що позитивні результати доклінічних досліджень стимулюють розвиток галузі біобанкування цього клітинного типу за умов належної виробничої практики з метою подальшого використання цих клітин в клінічній практиці для лікування пацієнтів із захворюваннями печінки. Отже, низька імуногенність і відсутність реакції відторгнення, прискорення процесів епітелізації, пригнічення фіброзу і запалення, відновлення морфології печінки є істотними перевагами використання КАЕ в лікуванні стеатогепатитів і цирозів.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ. Нами наведено клінічний випадок лікування цирозу печінки з використанням культивованих КАЕ. Клінічний випадок: хворий Д., 49 р., діагноз – цироз печінки (вірус гепатиту С) з помірно вираженою печінково-клітинною недостатністю в стадії субкомпенсації клас С за Чайльд П'ю, портальна гіпертензія, гепатоспленомегалія, варикозне розширення вен стравоходу; печінкова енцефалопатія 1 ступеня. На первинній еластограмі показники еластичності паренхіми печінки склали в середньому $35,5 \pm 1,3$ кПа, що відповідає стадії фіброзних змін F4 за шкалою Metavir. У неврологічному статусі відмічались псевдобульбарні розлади у вигляді рефлексів орального автоматизму, пірамідної недостатності у вигляді пожвавлення сухожильних рефлексів і анізорефлексії; симптоми статико-локомоторної атаксії, зафіксовані порушення чутливості хворих у вигляді дистальної полінейропатії. Хворому введено внутрішньовенно 100 млн культивованих КАЕ (фенотип pan Cytokeratin⁺CD73⁺CD90⁺CD105⁺CD146⁺CD166⁺CD34⁺CD45⁻HLA⁻DR⁻).

РЕЗУЛЬТАТИ. Через місяць після клітинної терапії у хворого відмічалось покращення показників крові. На еластограмі показники еластичності паренхіми печінки зменшилися і склали в середньому $30,5 \pm 1,7$ кПа. Динаміка об'єктивних неврологічних симптомів у хворого свідчить про достовірне зменшення пірамідних, атактичних, чутливих порушень, але зберігались псевдобульбарні, екстрапірамідні порушення, що, ймовірно, можна пояснити стійкими морфологічними змінами речовини головного мозку під впливом гіпоксії.

ВИСНОВКИ. Внутрішньовенне введення культивованих КАЕ забезпечує корекцію метаболічних порушень при печінковій недостатності та сприяє покращенню структурних, біохімічних та клінічних показників і когнітивних функцій пацієнта. Також системна інфузія КАЕ здатна попередити розвиток такого ускладнення, як печінкова енцефалопатія, що робить клітинну терапію з використанням КАЕ перспективною в лікуванні гепатитів та цирозів.

Мышечные эмбриональные фибробласты в экспериментальной генной терапии опухолей



Захарук Е. А., Вагина И. Н., Чащина Л. И., Вагин Ю. В., Кашуба В. И.
Институт молекулярной биологии и генетики НАН Украины, Киев, Украина

Одним из наиболее перспективных направлений в противоопухолевой терапии является использование генетически модифицированных клеток в качестве векторов для передачи различных терапевтических агентов. Такие «клеточные векторы» включают в себя – модифицированные *ex vivo* клетки, обладающие определенным тропизмом к опухоли, рекомбинантный вектор и гены, кодирующие терапевтический агент.

В последнее время возрастает интерес к исследованию возможностей применения эмбриональных и фетальных фибробластов, в частности, мышечных эмбриональных фибробластов (МЭФ) в модельных экспериментах по регенеративной и клеточной терапии. Появилось несколько сообщений о том, что МЭФ фенотипически, генотипически и функционально подобны мезенхимальным стволовым клеткам. Эти уникальные особенности делают МЭФ привлекательной моделью для дальнейшего исследования в качестве потенциального источника для конструирования клеточных векторов, обеспечивающих доставку терапевтических агентов непосредственно в опухолевое микроокружение. Модифицируя клетки *in vitro*, можно контролировать эффективность доставки в них генетической информации, уровень экспрессии целевых генов и секреции белка еще до введения в организм, что повышает безопасность переноса генетического материала. Для доставки целевых генов в МЭФ использовались векторы, сконструированные нами на основе вирусов ядерного полиодроза насекомых. Бакуловирусы в качестве векторов (БВ) для генной терапии имеют ряд преимуществ: широкий спектр трансдуцируемых типов клеток при отсутствии выраженной цитотоксичности; неспособность вирусов реплицироваться в клетках млекопитающих; возможность инфицировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки; способность, благодаря структуре генома, включать большие фрагменты гетерологичной ДНК; отсутствие патогенности для человека и животных.

В качестве активных веществ, используемых в противоопухолевой терапии, нами исследовались цитокины – интерферон- β (*IFN- β*) и интерлейкин-21 (*IL-21*). При этом изучалось влияние эмбриональных фибробластов мыши (*C57Fb*), трансдуцированных рекомбинантными бакуловирусами с генами мышечного *lfn- β* , или *IL-21* человека, на выживаемость и пролиферацию злокачественных клеток меланомы мыши B16 *in vitro*. Эффективность трансдукции определяли по количеству клеток, экспрессирующих светящийся белок, с использованием флуоресцентного микроскопа и цитофлуориметра. Для изучения возможного антипролиферативного эффекта МЭФ, трансдуцированных БВ с геном мышечного *lfn- β* либо с геном *IL21* человека, на пролиферацию злокачественных клеток меланомы B16 проводили их совместное культивирование *in vitro* в соотношении 1:10. Клетки в контрольных и опытных группах рассеивали в равном количестве и соотношении. Все клетки культивировали в течение 5 суток в стандартных условиях, затем их снимали с культуральных чашек и фиксировали количество клеток. Для оценки динамики экспрессии гена мышечного *lfn- β* в клетках *C57Fb*, трансдуцированных БВ, проводили ПЦР анализ в реальном времени. Выделение РНК и синтез кДНК проводили по стандартной методике.

Показано, что интерферон- β и интерлейкин-21, синтезируемые эмбриональными фибробластами, трансдуцированными БВ с генами мышечного *lfn- β* и *IL21*, ингибировали пролиферацию клеток B16 при их совместном культивировании *in vitro*. Изучение динамики экспрессии гена *lfn- β* в трансдуцированных МЭФ выявило, что на уровне мРНК ген *lfn- β* стабильно экспрессируется в течение 5 суток. Полученные результаты указывают на перспективность использования модифицированных эмбриональных фибробластов для трансплантации экспериментальным животным с целью проверки полученного эффекта *in vivo*.

Інноваційне застосування стовбурових клітин для терапії цукрового діабету та його ускладнень




Тронько М. Д., Болгарська С. В., Соколова Л. К., Орленко В. Л., Ковзун О. І., Пастер І. П.
ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України», Київ, Україна

Цукровий діабет (ЦД) є хронічним захворюванням, яке вражає генетично схильних осіб, в яких інсулін-секретуючі β -клітини острівців Лангерганса підшлункової залози вибірково і незворотно зруйновані в результаті аутоімунної «атаки» організму.

Впровадження нових наукових досягнень в клінічну практику спрямовано на оптимізацію лікування ЦД і його ускладнень, що істотно покращує якість життя багатьох хворих. Генна терапія, яка швидко розвивається в результаті досягнень в галузі молекулярної біології та проекту геному людини, тепер є найбільш обнадійливою технологією XXI століття. Генна терапія все частіше розглядається як альтернативний підхід для лікування ЦД, оскільки здатна індукувати фізіологічну секрецію інсуліну, дає змогу хворим уникнути ін'єкцій інсуліну і підтримувати еуглікемію при широких варіаціях харчового раціону.

З 2010 року в ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України» у співпраці з Інститутом молекулярної біології та генетики НАН України проводяться експериментальні дослідження терапевтичних ефектів рекомбінантних молекул ДНК, які містять цільовий ген препроінсуліну людини. Показана ефективність введення конструкції в різних дозах в паренхіму печінки шуриів лінії Вістар із стрептозотоцин-індукованим діабетом: поява в крові тварин значимих рівнів інсуліну людини і С-пептиду, а також вірогідне зниження рівня глюкози в їх крові та менш виразне зниження маси тварин порівняно з моделлю ЦД.

В той же час в комплексному лікуванні хворих з хронічними облітеруючими захворюваннями артерій нижніх кінцівок застосовується метод аутоотрансплантації кістково-мозкового аспірата. Однак клінічне використання кісткового мозку як джерела мезенхімальних стовбурових клітин не знайшло поширення через досить складну процедуру і малий вихід активних клітин. В зв'язку з цим вельми перспективним є застосування клітин ембріо-фетального походження. 

❑ **МЕТА РОБОТИ** – оцінка клінічної ефективності застосування препаратів кріоконсервованих мононуклеарних клітин пуповинної крові людини, кріоконсервованих мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин, виділених з плаценти людини та кріоконсервованої амніотичної мембрани людини, окремо та їх комбінацій в комплексному лікуванні пацієнтів з ЦД I типу, ускладненим периферичною нейропатією, периферичним ураженням артерій та трофічними виразками нижніх кінцівок.

Отримані позитивні рішення Координаційного центру трансплантації органів, тканин і клітин МОЗ України, Комісії з етики ТОВ «Інститут клітинної терапії», Комісії з біоетики Національного інституту хірургії та трансплантології ім. О. О. Шалімова НАМН України та Комісії з біоетики ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України». Від кожного пацієнта буде отримана письмова інформована згода. На всіх етапах буде проводитися контроль якості та контроль безпеки, а також оцінка безпечності щодо сторонніх мікроорганізмів.

Ефективність терапії будуть визначати за критеріями Американської діабетичної асоціації (American Diabetes Association), Європейської асоціації вивчення цукрового діабету (European Association for the Study of Diabetes) і Української діабетологічної асоціації.

Таким чином, проведення запланованих клінічних випробувань дозволить оцінити ефективність інноваційного методу лікування ускладнень ЦД з використанням стовбурових клітин.

Комплексное лечение гнойных ран конечностей у больных с сахарным диабетом с использованием светового воздействия, гемопоэтических стволовых клеток и тромбоцитарного фактора роста



Климова Е. М.¹, Иванова Ю. В.¹, Коробов А. М.², Лавинская Е. В.¹, Быченко Е. А.¹

¹ГУ «Институт общей и неотложной хирургии им. В. Т. Зайцева НАМН Украины», Харьков, Украина

²Харьковский национальный университет им. В. Н. Каразина, Харьков, Украина

Использование антибиотикотерапии для лечения больных с гнойными ранами трофическими язвами на фоне сахарного диабета в условиях стационара при экспансии внутригоспитальной инфекции малоэффективно. Актуальным является поиск новых методов лечения сахарного диабета, осложненного ангиопатией у больных с незаживающими трофическими язвами. В лечении гнойных ран у пациентов с сахарным диабетом используют различные комбинированные подходы, в том числе электромагнитные и световые воздействия, спектры которых усиливают метаболические процессы и резистентность. Для лечения гнойных ран использовали различные режимы светового воздействия, трансфузии стволовых клеток и факторы роста, что способствовало усилению местного эффекта очистки ран и нормализации метаболических нарушений. Целью настоящего исследования было выяснение механизмов нормализации общей резистентности организма после действия различных волновых диапазонов светового воздействия в сочетании с клеточной терапией и применением фактора роста.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ. В работе обследовали пациентов с сахарным диабетом, осложненным наличием гнойных ран конечностей ($n = 11$). Использовали комбинированные подходы с применением светового воздействия различных длин волн ($\lambda = 440, 530, 660$ нм), аппликацией аутотромбоцитарного фактора роста и внутривенного введения гемопоэтических стволовых клеток кордовой крови. Методами иммуноферментного анализа, проточной цитофлуориметрии, спектрофотометрии, световой микроскопии исследовали концентрацию глюкозы, гликозилированного гемоглобина, С-пептида, показатели кислороднезависимого и кислородзависимого фагоцитоза нейтрофилов, показатели гуморального иммунитета (концентрация циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) и пептидов средней молекулярной массы (ПСММ), степень лимфоцитотоксичности, концентрация IgE), степень экспрессии кластеров дифференцировки (CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD28⁺, CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD19⁺, CD20⁺, CD34⁺).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ. Поэтапное воздействие на раневую поверхность света, аппликации тромбоцитарного фактора роста (ТФР) и гемопоэтических стволовых клеток (ГСК) позволили добиться очистки раны, стимуляции регенеративных процессов и заживления раны в короткие сроки на фоне коррекции иммунного дисбаланса и нормализации метаболических показателей.

На первом этапе лечения после светового воздействия красным ($\lambda = 660$ нм) и зеленым светом ($\lambda = 530$ нм) выявили стимуляцию фагоцитарных клеток. Концентрация ЦИК до воздействия была снижена, что не соответствовало клиническому состоянию пациентов, за счет снижения аффинитета и опсонизирующей функции иммуноглобулинов при образовании комплекса антиген-антитело. На фоне светового воздействия наблюдали возрастание уровня ЦИК, представляющих собой продукты взаимодействия комплекса антигена-антитело-комплемент, образующиеся на фоне хронической инфекции. Константа ЦИК увеличивалась до нормальных значений у пациентов после светового воздействия, что свидетельствует об уменьшении патогенности иммунных комплексов. Уровень аутоиммунных антител в тесте лимфоцитотоксичности позитивно снижался в среднем на 7 % у пациентов с трофическими язвами после комбинированного воздействия.

На втором этапе после применения ТФР и ГСК выявили снижение концентрации глюкозы, гликозилированного гемоглобина HbA1c (до 4,1 г/л) в среднем в 2 раза; отмечали позитивное возрастание в 8 раз концентрации С-пептида. Также после сочетанного лечения нормализовалась концентрация сывороточных ферментов (АЛТ, АСТ, ЛДГ) до референтных значений. На фоне комбинированного лечения пациентов с гнойными ранами выявили увеличение количества Т-лимфоцитов, экспрессирующих костимулирующие молекулы CD4⁺CD28⁺ в среднем до 35 % и регуляторные молекулы CD4⁺CD25⁺ в среднем до уровня 1,2 %. Экспрессии CD34⁺ возрастала в 2 раза (до 8 %). Степень экспрессии кластеров CD23⁺ активированных клеток и CD54⁺, характеризующих адгезивные свойства Т-лимфоцитов, нормализовалась после воздействия красным светом ($\lambda = 660$ нм). ❑

■ Концентрація ЦИК, образуються на фоні розвитку трофічних ран і високого вмісту аутоантигенів, після процедури трансфузії знижалась в 12 раз; також спостерігали значне зниження (в 3 рази) концентрації IgE. Виявили в середньому 2-кратне зниження концентрації аутоімунних антител (к ANCA, кардіомиоцитам, ткани легких, гепатоцитам) у пацієнтів з гнійними ранами кінцівок на фоні сахарного діабету.

Таким чином, що стосується механізмів комплексного впливу застосовуваних методів лікування, то вони спричиняють активацію бар'єрної функції фагоцитоза, функціональної активності Т-лімфоцитів, синтезу макроергічних сполук в формі АТФ, що посилює загальну резистентність організму до інфекційних антигенів, нормалізує вуглеводний обмін, периферичне кровообігання, посилює регенерацію і прискорює повноцінне заживлення ран.

Генотерапевтична корекція порушень ліпідного обміну у кролів з помірно експериментальним діабетом 1 типу



Топорова О. К.^{1,2}, Моргунов П. В.^{1,2}, Іродов Д. М.^{1,2}, Холодкова О. Л.³, Бубнов Р. В.⁴, Кордюм В. А.^{1,2}

¹Інститут молекулярної біології і генетики НАН України, Київ, Україна;

²ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна;

³Одеський національний медичний університет, Одеса, Україна;

⁴Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України, Київ, Україна

МЕТА: оцінити ефективність генної корекції експериментального атеросклерозу за умов стрептозотцин-індукованого цукрового діабету 1 типу у кролів.

МЕТОДИ. Модель інсулінозалежного цукрового діабету у поєднанні з екзогенним холестеринним навантаженням одержували на статевозрілих самцях кролів масою тіла $2,5 \pm 0,3$ кг. Діабет у тварин індукували триразовим (у дозі 50 мг/кг маси тіла) внутрішньовенним введенням стрептозотцину. Стан глюкозного гомеостазу оцінювали щотижня за динамікою базальної глікемії. Експериментальну гіперхолестеринемію у кролів з помірно експериментальним діабетом (гіперглікемія – до 14 ммоль/л глюкози у крові) моделювали додаванням у харчовий раціон холестерину (2 %) та соняшникової олії (15 %) протягом 5 тижнів. Порушення ліпідного обміну діагностували за оцінкою ліпідного спектру сироватки крові, а саме за вмістом загального холестерину (ЗХС), ХС ліпопротеїдів низької щільності, ХС ліпопротеїдів дуже низької щільності та ХС ліпопротеїдів високої щільності у крові експериментальних тварин. Функціональний стан печінки оцінювали за зміною активності аланін- та аспартатаміно-трансферази, а також лужної фосфатази. Після закінчення експерименту проводили патогістологічні дослідження органів і тканин.

Для доставки повнорозмірного гена аполіпопротеїну А1 (apoA1) людини у клітини печінки експериментальних тварин використовували сконструйований плазмідний вектор pTRArо, в якому цільовий ген знаходиться у складі експресійної касети, фланкованої інвертованими термінальними повторами аденоасоційованого вірусу (ААВ) людини. Для забезпечення конститутивної експресії гена apoA1 використаний промотор ранніх генів цитомегаловірусу людини. Поліплекси плазмідної векторної ДНК з розгалуженим поліетиленіміном (25 кД) вводили одноразово прямою ін'єкцією у паренхіму печінки тварин під контролем УЗД на ультразвуковій діагностичній системі SONOSITE TURBO і ATL HDI 3500.

РЕЗУЛЬТАТИ. Одержана комбінована модель холестеринової гіперліпідемії на тлі хронічної гіперглікемії у кролів. Розроблена модель є високоатерогенною, про що свідчить збільшення показників коефіцієнта атерогенності в середньому до 13 вже через 5 тижнів від початку холестеринного навантаження. Аналіз ліпідного спектру крові діабетичних тварин протягом періоду моделювання дозволив констатувати швидко прогресуючий характер змін, притаманних діабетичній дисліпідемії.

Внутрішньопечінкове введення гена apoA1 людини призводить до появи у крові експериментальних тварин не менш 20 мг/дл аполіпопротеїну А1 людини протягом трьох тижнів, що супроводжується підвищенням рівня ХС ліпопротеїдів високої щільності у сироватці крові, зниженням вмісту атерогенної фракції ХС ліпопротеїдів низької щільності, зниженням показників індексу атерогенності до норми, регресією атеросклеротичних бляшок аорти і нормалізацією функціонального стану печінки та нирок.

ВИСНОВКИ. Показано, що створені ДНК-поліплекси, які містять ген аполіпопротеїну А1 людини, мають антиатерогенні властивості. Проведена генотерапевтична корекція експериментальної дисліпідемії на тлі цукрового діабету 1 типу у кролів є ефективною. Одержані результати свідчать про певні перспективи застосування методів генної терапії у лікуванні судинних ускладнень діабету 1 типу.

Біологічна активність і терапевтичні ефекти рекомбінантних молекул ДНК, які містять цільовий ген препроінсуліну людини, у щурів із стрептозотцин-індукованим діабетом



Тронько М. Д.¹, Кордюм В. А.², Ковзун О. І.¹, Топорова О. К.², Калинська Л. М.¹, Гулько Т. П.², Пастер І. П.²

¹ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України», Київ, Україна

²Інститут молекулярної біології та генетики НАН України, Київ, Україна

Цукровий діабет (ЦД) є хронічним захворюванням, яке вражає генетично схильних осіб, в яких інсуліносекретуючі β-клітини острівців Лангерганса підшлункової залози вибірково і незворотно зруйновані в результаті аутоімунної «атаки» організму. ■

Впровадження нових наукових досягнень в клінічну практику спрямовано на оптимізацію лікування ЦД і його ускладнень, що істотно покращує якість життя багатьох хворих. Генна терапія, яка швидко розвивається в результаті досягнень в галузі молекулярної біології та проекту генома людини, тепер є найбільш обнадійливою технологією XXI століття. Генна терапія все частіше розглядається як альтернативний підхід для лікування ЦД, оскільки здатна індукувати фізіологічну секрецію інсуліну, дає змогу хворим уникнути ін'єкцій інсуліну і підтримувати еуглікемію при широких варіаціях харчового раціону.

Мета роботи – дослідити терапевтичні ефекти рекомбінантних молекул ДНК, що містять цільовий ген препроінсуліну людини (ДНК-ЦГППЛ), у щурів зі стрептозотоцин-індукованим діабетом (СТД).

Експериментальні дослідження проводили на самцях щурів лінії Вістар з масою тіла 180–220 г. Модель СТД отримували шляхом одноразового внутрішньоочеревинного введення щурам стрептозотоцину (*Sigma*, США) в дозі 50 мг/кг маси тіла тварини.

Біологічну активність ДНК-ЦГППЛ визначали за рівнем інсуліну людини і С-пептиду в сироватці крові щурів імуноферментним методом з використанням наборів реактивів «Insulin ELISA» (*DRG Instruments GmbH*, Німеччина), «C-Peptide» (*Monobind Inc.*, США) і «C-Peptide ELISA» (*DRG Instruments GmbH*, Німеччина) на імуноферментному аналізаторі «Stat Fax 3200» (*Awareness Technology Inc.*, США).

Терапевтичні ефекти ДНК-ЦГППЛ визначали за рівнем глюкозурії та рівнем глікемії натще. Рівень глюкози в крові щурів визначали глюкозооксидазним методом за допомогою глюкометра «Accu-Chek Active» (*Accu-Chek*, Німеччина) та на аналізаторі «Super GL» (*Dr. Muller*, Німеччина) через 4 години після останнього прийому їжі.

До початку дослідження було отримано позитивне рішення Комісії з біоетики ДУ «Інститут ендокринології та обміну речовин ім. В. П. Комісаренка НАМН України». Всі дослідження проводилися відповідно до національних «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», що узгоджуються з положеннями «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для дослідницьких та інших наукових цілей». Отримані дані опрацьовані стандартними методами варіаційної статистики з використанням критерію t Стьюдента і коефіцієнта кореляції Пірсона.

Введення ДНК-ЦГППЛ в дозі 25–60 мкг на тварину в паренхіму печінки щурів лінії Вістар із СТД призводить до появи в їх крові значимих рівнів інсуліну людини і С-пептиду через 14 і 28 діб. Вірогідне зниження рівня глюкози в крові щурів протягом 28–56 діб та менш виразне зменшення маси тіла тварин протягом майже 4 місяців порівняно з контролем свідчить про здатність ДНК-ЦГППЛ нівелювати негативний вплив стрептозотоцину на глікемічний профіль і масу тіла щурів. Виявлена висока позитивна кореляція між показниками рівнів інсуліну людини і С-пептида в сироватці крові щурів з СТД через 14 і 28 діб після ін'єкційного введення препарату. Нетривала дія ДНК-ЦГППЛ свідчить про необхідність подальших наукових досліджень з метою підвищення ефективності застосування препарату.

Вплив генетичного поліморфізму на перебіг вагітності у жінок з гестаційним цукровим діабетом



Літвінов С. К.¹, Авраменко Т. В.², Россоха З. І.³

¹Вінницький національний медичний університет ім. М. І. Пирогова, Вінниця, Україна

²ДУ «Інститут педіатрії, акушерства та гінекології НАМН України», Київ, Україна

³ДЗ «Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України», Київ, Україна

Під терміном «гестаційний діабет» (ГД) в сучасній діабетології розуміють гіперглікемію, яка вперше виявлена під час вагітності та не відповідає критеріям маніфестного цукрового діабету. Розповсюдженість ГД в загальній популяції різник країн становить від 1 до 14 % і залежить від етнічного складу населення та використання діагностичних тестів. ГД – це гетерогенний розлад. Генетична тенденція щодо виникнення ГД пов'язана з впливом різних генів. Генетично опосередкований цитокиновий каскад, пов'язаний з дисфункцією ендотелію, призводить до несприйняття вуглеводів. Головним у цьому шляху є надмірна активація цитокинів в ліпідній тканині. Взаємодія генів *ACE* (I/D), *TNF-α* (308G/A), *TLR4* (399 C/T), *PNPLA3* (10109 C/G) може визначати описаний раніше процес патогенів. Метою даного дослідження було визначення комбінації поліморфних варіантів генів у пацієнток з ГД, яким з метою компенсації діабету було достатньо дотримуватися дієти, та пацієнток, у яких виникла потреба в інсуліні.

МЕТОДИ. У дослідженні брали участь 38 жінок з ГД. Середній вік становив 30,68 ± 6,05 років. Пацієнтки мали індекс маси тіла 28,07 ± 6,26. Всім хворим призначали спеціальну дієту. Але 10 пацієнток з ГД мали несприятливий перебіг з потребою в інсуліні (група 1). У 28 пацієнток з ГД призначення спеціальної дієти впродовж всієї вагітності (група 2) не супроводжувалося додатковим призначенням інсуліну. Усім пацієнткам було проведено молекулярно-генетичне дослідження генів *ACE* (I/D), *TNF-α* (308 G/A), *TLR4* (399 C/T), *PNPLA3* (10109 C/ G) за допомогою алель-специфічних PCR та RFLP PCR. Аналіз частоти генотипів між групами проводився за допомогою хі-квадрат тесту. Міжгенну взаємодію в оцінці індивідуальної потреби в інсуліні досліджували в програмі MDR (версія 3.0.2).

РЕЗУЛЬТАТИ. Частота генотипів у 38 пацієнток з ГД, була наступною: I/I – 15,79 %, I/D – 42,11 %, D/D – 42,11 % для гена *ACE* (rs 4646994); 308 G/G – 73,68 %, 308 G/A – 23,68 %, 308 A/A – 2,63 % для гена *TNF-α* (rs 1800629); 399 C/C – 92,11 %, 399 C/T – 7,89 %, 399 T/T – 0,0 % для гена *TLR4* (rs 4986791); 10109 C/C – 45,71 %, 10109 C/G – 14,29 %, 10109 G/G – 40 % для гена *PNPLA3* (rs 738409). Визначені частоти генотипів не відрізнялися в порівнянні з населенням. Частота генотипів досліджених генів не мала суттєвої різниці між групою 1 та групою 2. Достовірною моделлю виникнення потреби в інсуліні у вагітних з ГД, була трилокусна, яка включала взаємодію генів *TNF-α* (308G/A)/*ACE*(I/D)/*TLR4*(399 C/T). Прогностична цінність встановленої моделі становила 63 %, специфічність – 100 %.

ВИСНОВКИ. Нами визначено генетичні особливості пацієнток з ГД, схильних до несприятливого перебігу вагітності та виникнення потреби в інсуліні. Комбінації поліморфних варіантів генів *TNF-α* (308 G/A), *ACE* (I/D), *TLR4* (399 C/T) сприяють несприятливому перебігу ГД та необхідності призначення інсуліну. Вплив міжгенних взаємодій на перебіг ГД у вагітних потребує подальших досліджень. Перспективним підходом є індивідуальний підбір дози Омега-3 в залежності від комбінацій виявлених нами генотипів враховуючи *TLR4* (399 C/T). Омега-3 жирні кислоти здатні інгібувати генетично опосередкований цитокиновий каскад. А індивідуальне профілактичне призначення Омега-3 відповідно до генетичних особливостей у поєднанні зі спеціальною дієтою може зменшити ризик розвитку ГД впродовж вагітності.

Поліморфні зміни генів-регуляторів метаболізму фолатів можуть бути фактором ризику раннього розвитку гострих порушень мозкового кровообігу у популяції осіб, що проживають на території України



Цимбалюк В. І., Васильєва І. Г., Костюк М. Р., Чопик Н. Г., Галанта О. С., Цюбко О. І., Олексенко Н. П., Дмитренко А. Б., Макарова Т. А., Сніцар Н. Д.
ДУ «Інститут нейрохірургії ім. А. П. Ромоданова НАМН України», Київ, Україна

З кожним роком збільшується частота випадків виникнення гострих порушень мозкового кровообігу у людей працездатного віку. Генетична складова є одною з головних серед причин розвитку хвороби. Пошук генів-кандидатів, поліморфні варіанти яких змінюють функціональні властивості білків, які вони кодуєть, є основною стратегією для виявлення спадкової схильності до інсультів та попередження їх виникнення при своєчасній терапії. На цей час найбільша увага вчених зосереджена на дослідженні компонентів фолатного циклу, порушенні функціонування фолат-залежного одно-вуглецевого метаболізму і, як наслідок, накопичення агресивної по відношенню до ендотелію судин сполуки – гомоцистеїну, зміни процесів метилювання ДНК та синтезу пуринових основ.

Метою дослідження стало визначення розподілу поліморфних локусів генів, що кодуєть такі регуляторні ферменти фолатного циклу, як ген 10-формілтетрагідрофолат дегідрогенази (ALDH1L1, rs10934753), цистатіонін-β-синтази (CBS, rs5742905), гліцин-N-метилтрансферази (GNMT, rs11752813) у популяції осіб, що проживають на території України, та виявлення їх зв'язку із ризиком раннього розвитку гострих порушень мозкового кровообігу.

Генетичний аналіз було проведено 54 хворим (19 жінок та 35 чоловіків), що перенесли ішемічний або геморагічний інсульт та 35 особам популяційного контролю (17 жінок та 18 чоловіків), що не мали тяжких серцево-судинних захворювань. Середній вік пацієнтів експериментальної групи становив $51,8 \pm 8,2$ року, групи контролю $56,8 \pm 11,3$ року.

Поліморфні ДНК-локуси генів досліджували методом ПЛР у реальному часі з використанням тест-системи TagMan SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, США) у зразках венозної крові пацієнтів контрольної та експериментальної груп.

Було отримано наступні розподіли поліморфних локусів для досліджуваних генів: ген ALDH1L1 (однонуклеотидна заміна A/G, алель ризику A) у групі хворих AA – 25 %, AG – 62 %, GG – 12 %, у групі контролю AA – 14 %, AG – 14 %, GG – 72 %; ген CBS (однонуклеотидна заміна T/C, алель ризику C) у групі хворих TT – 78 %, TC – 22 %, у групі контролю TT – 86 %, TC – 14 %. Гомозиготи по алелю ризику для гену CBS на даному етапі дослідження виявлені не були. Для гену GNMT (однонуклеотидна заміна C/G, алель ризику G) у групі хворих було отримано наступний розподіл: CC – 25 %, CG – 50 %, GG – 25 %, у групі контролю CC – 42 %, CG – 26 %, GG – 32 %. Статистична обробка даних на даному етапі роботи не проводилася через недостатню кількість випадків для статистичного аналізу популяційної генетики, проте вже зараз можна зробити висновки, що поліморфні варіанти ферментів-регуляторів фолатного циклу є перспективними мішенями у дослідженні генетичних причин раннього розвитку гострих порушень мозкового кровообігу.

Перспективи молекулярно-генетичного тестування поліморфізму генів TLR у жінок з репродуктивними розладами



Самбор І. Ю., Россоха З. І., Горовенко Н. Г.

¹ДЗ «Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України», Київ, Україна

²ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

Тривалі запальні процеси органів жіночої репродуктивної системи сприяють розвитку безпліддя за рахунок появи морфологічних змін – розростання сполучної тканини та звуження маточних труб. Перенесені запальні процеси незалежно від ступеня морфологічних змін підвищують ризик ускладненого перебігу вагітності, у тому числі і ризик позаматкової вагітності. Провідна роль в хронізації запальних інфекційних процесів, за даними наукових досліджень, належить дисбалансу в генетично детермінованому цитокиновому каскаді. Саме дисбаланс між прозапальними та антизапальними цитокінами лежить в основі підвищення ризику невиношування вагітності.

Сигнальні мембранні рецептори індуюють продукцію клітинами імунної системи комплексу цитокинів. Toll-like receptors (TLR) відносяться до сигнальних мембранних рецепторів. TLR експресуються на поверхні та в цитоплазматичних гранулах різних клітин організму. TLR представлені на мієлоїдних клітинах крові, перед усім на моноцитах та макрофагах. У людини TLR представлені 10 різними білками, які при активації запускають реакції вродженої імунної системи. Імунна відповідь реалізується шляхом продукції прозапальних цитокинів, які контролюються підконтрольними TLRs факторами транскрипції NF-κB й факторами з родини IRF. Передача сигналів через TLRs здійснюється із залученням 5 адапторних білків, що зв'язуються з цитоплазматичним доменом: MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM й SARM. TLRs, виключаючи TLR3, передають сигнал через MyD88-залежний шлях. В ньому поступово активуються IRAK, NF-κB й MAPKs. Одночасна активація NF-κB й MAPKs сприяє транскрипції прозапальних генів, TNF-L, IL-1, IL-6, IL-8 й IL-12. TLR3 передає сигнал MyD88-незалежним шляхом, в якому цитоплазматичний TIR-домен взаємодіє з адапторним білком TRIF. Для підтримання балансу цитокинів необхідна регулююча функція TLRs, оскільки як гіпо-, так і гіперекспресія призводить до патологічних станів. Наприклад, гіперекспресія TLRs призводить до дисбалансу цитокинового каскаду, що характерно для аутоімунних станів та хронічних запальних процесів.

В сучасній практиці для профілактики запальних станів та забезпечення повноцінного розвитку плоду у вагітних призначають різноманітні нутрієнти, серед яких важливе місце належить, зокрема, і Омега-3. Вживання природнього джерела Омега-3, а саме морських продуктів, зокрема риби, рекомендовано вагітним із застереженням, що пов'язано із високим вмістом ртуті, за даними ВООЗ. Омега-3 жири – поліненасичені жирні кислоти, що відносяться до родини ненасичених жирних кислот, представлені на фармацевтичному ринку як докозагексаєнова кислота, ейкозапентаєнова кислота, альфа-ліноленова кислота та докозапентаєнова кислота. Перераховані Омега-3 пригнічують сигнальні шляхи TLR та подальший розвиток хронічних запальних реакцій. Зокрема, Омега-3 зменшують продукцію прозапальних цитокінів, включаючи родину цитокінів IL-12. Інгібування експресії IL-12 опосередкована активацією PPAR γ та інгібуванням ядерної транслокації NF κ B.

Відомо про наявність різних поліморфних варіантів генів TLRs, які ведуть до змін в регуляторних частинах та впливають на кількість продукту генів. Таким чином, залежно від індивідуальних генетичних особливостей, вживання Омега-3 може мати негативний вплив у зв'язку із гіперекспресією генів та порушенням внаслідок цього процесів апоптозу і нейрогенезу. Тому необхідні додаткові дослідження, які б враховували інтенсивність імунокоригуючого впливу Омега-3 залежно від наявних поліморфних варіантів генів TLRs, виходячи з яких необхідно розраховувати корисну дозу Омега-3, або взагалі не рекомендувати їх до вживання.

Поліморфізм гену рецептору лептину (LEPR) та рівень лептину в крові жінок з надлишковою масою тіла



Дроздовська С. Б., Палладіна О. Л., Кукурудзяк Р. В., Гончаров С. В., Досенко В. Є.
Національний університет фізичного виховання і спорту України, Київ, Україна
Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця, Київ, Україна

Присутність несприятливих алелей у гені рецептора лептину вважається однією з причин виникнення лептинової резистентності і, як наслідок, формування надлишкової маси тіла. Одним з найбільш ймовірних поліморфізмів цього гену, що можуть впливати на його експресію, є Q223R (rs1137101) поліморфізм, що полягає у заміні аденіну на гуанін та призводить до заміни гліцину на аргінін у 223 положенні білку (Gln223Arg).

МЕТА – встановити частоту генотипів та алелей цього поліморфізму у жінок з надлишковою масою тіла та дослідити взаємозв'язок між вказаним поліморфізмом, рівнем лептину та морфометричними показниками жінок з надлишковою масою тіла, які займаються оздоровчим фітнесом.

МЕТОДИ. Обстежено 39 жінок, які займаються оздоровчим фітнесом, з надмірною масою тіла (ІМТ становив $30,3 \pm 5,1$), та 30 осіб з нормальною масою тіла (ІМТ – $21,2 \pm 3,7$). ДНК виділяли з венозної крові. Q223R поліморфізм визначали методом ПЛР. Рівень лептину у венозній крові визначали методом ELISA. Композиційний склад тіла визначали методом біоімпедансу.

РЕЗУЛЬТАТИ. Частота розподілу генотипів та алелей у групі не відрізнялась від контрольної вірогідно. Рівень лептину у сироватці крові жінок з надлишковою масою тіла не асоційований з Q223R поліморфізмом гену LEPR. Найвищими показниками ІМТ та відсотку жирової маси відрізнялись жінки з генотипом G/G, що суперечить початковій гіпотезі. Це свідчить про те, що вказаний поліморфізм не можна використовувати як маркер дефіциту рецепторів лептину чи схильності до розвитку надлишкової маси тіла.


Дослідження асоціації поліморфних варіантів гена FGB з рівнем фібриногену у жінок з репродуктивними розладами



Россоха З. І.^{1,2}, Медведева Н. Л.¹, Кир'яченко С. П.^{1,2}, Горovenko Н. Г.²
¹ДЗ «Референс-центр з молекулярної діагностики МОЗ України», Київ, Україна
²ДУ «Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН», Київ, Україна

Проблема репродуктивних втрат залишається актуальною для клінічної медицини. За даними ВООЗ, кожна четверта пара в розвинутих країнах має безпліддя, і така тенденція залишається незмінною впродовж останнього десятиріччя. За окремими даними, внесок спадкової тромбофілії в розвиток репродуктивних розладів займає від 40 до 80 %. В клінічній практиці найбільшу загрозу становлять приховані спадково обумовлені дефекти гемостазу, які при несвоєчасній діагностиці і відсутності лікування можуть сприяти ускладненому перебігу вагітності і репродуктивним втратам.

Фібриноген є важливим коагуляційним фактором згортальної системи крові. За його рівнем діагностують стан згортання системи крові та гострої фази імунної відповіді, оцінюють ризик гемостатичних розладів та критичних станів. Ген фібриногену (FGB) кодує амінокислотну послідовність бета-ланцюга фібриногену. Найбільш дослідженими поліморфними варіантами даного гену є -455G/A (rs1800790) та C148T (rs1800787). В деяких дослідженнях була виявлена залежність між вказаними варіантами гена та невиношуванням вагітності, що відбувається за рахунок дисфібриногенемії (як підвищення, так і зниження рівня фібриногену).

Метою роботи було дослідити взаємозв'язок між поліморфними варіантами гена FGB (-455G/A; C148T) та рівнем фібриногену в плазмі крові у жінок з обтяженим репродуктивними розладами анамнезом, враховуючи інші клініко-лабораторні показники. 

❏ Для обстеження було залучено 177 жінок з репродуктивними розладами, у яких було проаналізовано клініко-лабораторні показники, включаючи попередній репродуктивний анамнез. Середній вік обстежених пацієнок склав $33,7 \pm 0,38$ року (22–47 років). Вага пацієнок коливалася в межах 44–108 кг ($63,9 \pm 1,17$ кг), а середній зріст – $165,4 \pm 0,5$ см (152–180 см).

Загальну групу обстежених пацієнок розділили на 2 підгрупи: групу А (n = 90) – склали пацієнтки з невиношуванням вагітності, а групу В (n = 87) – пацієнтки з первинним безпліддям. Також обстежених пацієнок було поділено на 3 підгрупи за рівнем фібриногену в плазмі крові: група 1 (n = 22) – пацієнтки зі зниженим рівнем фібриногену (< 2 г/л), група 2 (n = 13) – з підвищеним рівнем фібриногену (> 4 г/л) та група 3 (n = 117) – з рівнем фібриногену в межах референтних показників (2–4 г/л).

Відхилення у рівні фібриногену спостерігалися у 23 % обстежених пацієнок: підвищений рівень (> 4 г/л) було виявлено у 8,5 % пацієнок, а у 14,5 % пацієнок рівень був зниженим (< 2 г/л). Рівень фібриногену у обстежених не був асоційованим з віком, індексом маси тіла та поліморфними варіантами гена *FGB* (-455G/A; C148T). У 84 % обстежених пацієнок було виявлено гемостатичні розлади (зміни показників активного часткового тромбoplastинового часу, протромбінового часу та індексу, тромбінового часу). Генотип -455AA та комбінація генотипів -455AA/148TT за геном *FGB* були асоційовані зі зниженням рівня фібриногену (< 2 г/л) у пацієнок, що мали інші відхилення у гемостатичних показниках. Коливання рівня фібриногену є важливою патогенетичною ланкою гемостатичних порушень у пацієнок з репродуктивними розладами, тому за наявності генотипу -455AA та комбінації генотипів -455AA/148TT за геном *FGB* необхідно регулярно проводити визначення цього показника.



ARTICLE ON THE SITE
TRANSPLANTOLOGY.ORG